



การสังเคราะห์และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของอนุพันธ์ไซราเฟนิบที่มีวงไตรเอโซลเป็นแกนกลาง



โดย
นายสิทธิศักดิ์ เอิกเชื้อ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การสังเคราะห์และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของอนุพันธ์โซราเฟนิบที่มีวงไตรเอโซลเป็น
แกนกลาง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

SYNTHESIS AND CYTOTOXICITY TOWARDS CANCER CELL LINES OF
SORAFENIB DERIVATIVES WITH TRIAZOLE AS A CORE STRUCTURE



By
MR. Sittisak OEKCHUAE

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (CHEMISTRY)
Department of CHEMISTRY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2020
Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	การสังเคราะห์และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของอนุพันธุ์ไซราเฟ นิบที่มีวงไตรเอโซลเป็นแกนกลาง
โดย	สิทธิศักดิ์ เอิกเชื้อ
สาขาวิชา	เคมี แผนก ก แบบ ก 2 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุพันธ์ ลิ้มปชยาพร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)	
พิจารณาเห็นชอบโดย	
.....	ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกอร ระย้านิล)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพันธ์ ลิ้มปชยาพร)	
.....	ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัลลภ คั่นธิยงค์)	
.....	ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ดร.จุฑาทิพ บุญสมบัติ)	

61317203 : เคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต

คำสำคัญ : อนุพันธ์โซราเฟนิบ, ไตรเอโซล, ตัวยับยั้งไคเนส, ยารักษาโรคมะเร็งแบบจำเพาะเจาะจง

นาย สิทธิศักดิ์ เอิกเชื้อ: การสังเคราะห์และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของอนุพันธ์โซราเฟนิบที่มีวงไตรเอโซลเป็นแกนกลาง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุพันธ์ ลิ้มปชยาพร

โซราเฟนิบ (Sorafenib) เป็นยาชนิดแรกที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration of the United States, US FDA) เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งตับ และต่อมาได้รับการรับรองให้ใช้รักษามะเร็งไต และมะเร็งไทรอยด์ในระยะลุกลาม โดยมีกลไกในการยับยั้งไคเนสหลายชนิด (multikinase inhibitor) โดยเฉพาะ B-Raf และ VEGFR-2 อย่างไรก็ตาม sorafenib ยังมีความสามารถในการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดต่ำและมีผลข้างเคียงมาก งานวิจัยนี้จึงมุ่งสังเคราะห์อนุพันธ์ sorafenib ชนิดใหม่เพื่อพัฒนาสมบัติทางเภสัชและลดผลข้างเคียงของยา โดยแทนที่ส่วน phenoxy ring ที่เป็นแกนกลาง และ picolinamide ring ของ sorafenib ด้วยวง 1,2,3-triazole ที่เชื่อมต่อกับวงแหวนเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ชนิดต่าง ๆ โดยสามารถสังเคราะห์ sorafenib derivative โดยผ่านปฏิกิริยา nucleophilic addition และ 1,3-dipolar cycloaddition ได้อนุพันธ์ทั้งหมด 49 โมเลกุลที่มีร้อยละผลผลิตสูง (ผลงานวิจัยเบื้องต้นของ 13 โมเลกุลถูกรายงานในวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรี)

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2, เซลล์มะเร็งปอด A549, เซลล์มะเร็งถุงน้ำดี HuCCA-1, เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว MOLT-3 และ HL-60 และเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D และ MDA-MB-231 ด้วยวิธี MTT และ XTT assay พบว่า sorafenib derivative มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D ได้ดีที่สุด แต่อนุพันธ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดอื่นได้ไม่ดึ้นก โดยโมเลกุล 12e (R = *o*-Cl), 12y (R = *p*-CF₃), 12i' (R = *o*-isopropyl) และ 12m' (R = *p*-*t*-Bu) มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 เทียบเท่ากับ sorafenib ต้นแบบ โดยมี half-maximal inhibitory activities (IC₅₀) เท่ากับ 5.02±2.07, 5.97±2.14, 5.40±0.35 และ 5.57±0.91 µM ตามลำดับ (sorafenib มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 5.97±0.71 µM) แต่มีฤทธิ์ยับยั้งน้อยกว่า doxorubicin ประมาณ 8-10 เท่า (doxorubicin มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.59±0.10 µM) ส่วนการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D นั้น sorafenib derivative 12g (R = *p*-Cl), 12j (R = *p*-Br), 12h' (R = *p*-Et) และ 12p' (R = *p*-NHAc) มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 5.10±0.80, 6.00±0.06, 10.59±2.03 และ 11.28±0.42 µM ตามลำดับ มีความสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D ได้ดีกว่า sorafenib สูงที่สุดประมาณ 3 เท่า (sorafenib มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 14.80±0.43 µM)

แต่น้อยกว่า doxorubicin น้อยที่สุดประมาณ 8 เท่า (doxorubicin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.67 ± 0.07 μM) จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าลักษณะโครงสร้างของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง HepG2 และ T47-D ได้ดี โดยเฉพาะหมู่แอลคิล (alkyl) บนวงแหวนเบนซีนที่เชื่อมต่อกับวง 1,2,3-triazole ที่มีขนาดใหญ่ และฮาโลเจน (halogen) และหมู่ไตรฟลูออโรเมทิล (CF_3) จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น และการแทนที่ของหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง *para* จะทำให้โมเลกุลมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีอย่างมีนัยสำคัญ

จากการศึกษาค่าดัชนีความจำเพาะเจาะจง (Selectivity Index, SI) ได้ศึกษาผ่านเซลล์เยื่อบุผิวปอด MRC-5 พบว่า sorafenib derivative มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ได้จำเพาะเจาะจงมากที่สุด โดยที่โมเลกุล 12m' และ 12e มีค่า SI สูงที่สุด ซึ่งมากกว่ายาทั้งสอง 3.2-4.4 เท่า ในการศึกษา binding mechanism ของ sorafenib derivative 12e และ 12m' ในโพรงโปรตีน B-Raf และ VEGFR-2 เทียบกับ sorafenib พบว่าสารทั้งสองสามารถเกิด interaction ในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกับ sorafenib ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า sorafenib derivative 12m' และ 12e มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง HepG2 ได้ดีและมีความปลอดภัยกว่า sorafenib ต้นแบบและ doxorubicin จึงเป็นโมเลกุลที่จะนำไปศึกษาสมบัติทางเภสัช และสามารถพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคมะเร็งตับต่อไป



61317203 : Major (CHEMISTRY)

Keyword : sorafenib derivative, triazole, kinase inhibitor, targeted cancer drug therapy

MR. SITTISAK OEKCHUAE : SYNTHESIS AND CYTOTOXICITY TOWARDS CANCER CELL LINES OF SORAFENIB DERIVATIVES WITH TRIAZOLE AS A CORE STRUCTURE

THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR PANUPUN LIMPACHAYAPORN, Dr.rer.nat.

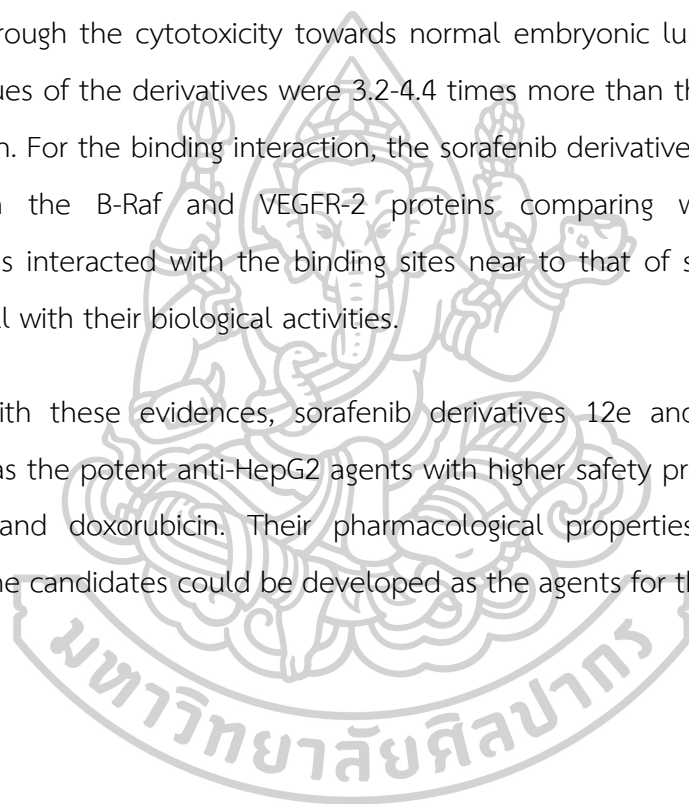
Sorafenib is the first drug approved by the Food and Drug Administration of the United States (US FDA) for treatment of advanced liver. Later, it was approved for the treatment of advanced kidney, and thyroid cancers. Sorafenib inhibits various kinases, in particular B-Raf and VEGFR-2. However, sorafenib has low bioavailability and many side effects. This research aimed to synthesize new sorafenib derivatives which the core phenoxy and picolinamide ring of sorafenib were replaced with a 1,2,3-triazole ring linked with a substituted aromatic ring. Forty-nine analogues were synthesized successfully *via* nucleophilic addition and 1,3-dipolar cycloaddition with excellent yields (The preliminary results of 13 analogues were reported previously in my undergraduate thesis).

Their inhibitory properties of HepG2 liver cancer cells, A549 lung cancer cells, HuCCA-1 gallbladder cancer cells, MOLT-3 and HL-60 blood cell carcinoma cells, and T47-D and MDA-MB-231 breast cancer cells were investigated by MTT and XTT assays. It was found that the sorafenib derivatives expressed excellent inhibitory effects on HepG2 liver cancer cells and T47-D breast cancer cells, whereas they showed moderate to poor inhibitory activities against other tested cell lines. Among the synthetic derivatives, compounds 12e (R = *o*-Cl), 12y (R = *p*-CF₃), 12i' (R = *o*-isopropyl), and 12m' (R = *p*-*t*-Bu) exhibited best inhibitory effects on HepG2 similar to the original sorafenib, with the IC₅₀ values of 5.02±2.07, 5.97±2.14, 5.40±0.35, and 5.57±0.91 μM, respectively (Sorafenib had IC₅₀ value of 5.97±0.71 μM), but they inhibited approximately 8-10 folds less than doxorubicin (Doxorubicin had IC₅₀ value of 0.59±0.10 μM). For inhibitory activity towards T47-D, the targets 12g (R = *p*-Cl), 12j (R = *p*-Br), 12h' (R = *p*-Et), and 12p' (R = *p*-NHAc) possessed the IC₅₀ values of 5.10±0.80, 6.00±0.06, 10.59±2.03, and 11.28±0.42 μM, respectively, which were up to 3-fold superior and 8-fold inferior to sorafenib (Sorafenib had an IC₅₀ value of

14.80±0.43 μ M), and doxorubicin (Doxorubicin had an IC₅₀ value of 0.67±0.07 μ M), respectively.

The structure-activity relationships indicated that the substitution on aromatic ring linking a triazole with large alkyl groups, halogen and trifluoromethyl group (CF₃) enhanced their cytotoxicity against HepG2 and T47-D. *para*-Substituted version showed higher inhibitory activities significantly. Furthermore, it was evident that 12e and 12 m' exhibited the highest selectivity index (SI) towards HepG2, which studied through the cytotoxicity towards normal embryonic lung fibroblast (MRC-5). The SI values of the derivatives were 3.2-4.4 times more than those of sorafenib and doxorubicin. For the binding interaction, the sorafenib derivatives 12m' and 12e were studied in the B-Raf and VEGFR-2 proteins comparing with sorafenib. Both compounds interacted with the binding sites near to that of sorafenib. The results agreed well with their biological activities.

With these evidences, sorafenib derivatives 12e and 12 m' have been identified as the potent anti-HepG2 agents with higher safety profile than the original sorafenib and doxorubicin. Their pharmacological properties should be further studied. The candidates could be developed as the agents for the HCC therapy.



กิตติกรรมประกาศ

ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพันธ์ ลิ้มชยาพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา แนวความคิด และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ แก่ข้าพเจ้า ตลอดจนการตรวจสอบ และแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในรายงานฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ ด้วยความดูแลเอาใจใส่อย่างดียิ่งตลอดการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ดร.จุฑาทิพ บุญสมบัติ และสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่ให้คำปรึกษาในการทำ วิทยานิพนธ์ รวมถึงให้ความอนุเคราะห์ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด A549, เซลล์มะเร็งถุงน้ำดี HuCCA-1, เซลล์มะเร็งเม็ดเลือด MOLT-3 และ HL-60 และเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D และ MDA-MB-231 ตลอดจนอำนวยความสะดวกในด้านสารเคมี และอุปกรณ์ต่าง ๆ รวมถึงเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR), เครื่อง Infrared Spectroscopy (IR) และ เครื่อง High Resolution Mass Spectroscopy (HRMS) ที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณเภสัชกร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปุรินทร์ เจริญสุขใส และเภสัชกร ผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร. ปวีศ วงษ์ประยูร และนางสาวอุษา ญัฐพลวัฒน์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย ศิลปากร ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และให้ คำปรึกษาตลอดการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกอร ระย้านิล ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการในการ สอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัลลภ คັນธิยงค์ ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบ วิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ นายโยธิน มาตะโก, นางสาวศรินทร์ญา ปาลคเชนทร์, นางสาวยุพา ปู่แดงอ่อน, นางสาววิริญญา สุทัศนวิชานนะ, นายกิตติศักดิ์ ธรรมมาภิชัย, นางสาวสลิล สว่างพลอย และนายภัทรศักดิ์ คำสังฆะ ที่ให้คำปรึกษา และความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงขอขอบคุณอาจารย์ และ เจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือ การอำนวยความสะดวก และสนับสนุนสถานที่ สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่อง NMR ตลอดการทำวิทยานิพนธ์

สิทธิศักดิ์ เอิกเชื้อ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฌ
สารบัญตาราง.....	ด
สารบัญรูปภาพ.....	ต
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์	8
1.3 สมมติฐานของงานวิจัย.....	8
1.4 ขอบเขตงานวิจัย	8
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
2.1 ยาโซราเฟนิบ (Sorafenib) ¹⁴	10
2.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยา sorafenib (Mechanism of action of Sorafenib).....	11
2.3 Binding mechanism และ structural features ของยา sorafenib	12
2.4 งานวิจัยและเอกสารที่เกี่ยวข้องกับอนุพันธ์ sorafenib (sorafenib derivatives).....	14
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	26
3.1 การออกแบบโครงสร้างของอนุพันธ์ sorafenib	26
3.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ sorafenib ที่มีวง 1,2,3-triazole เป็นแกนกลางแทนวง phenoxy 12a-12p'	30

3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activities) และการศึกษาความสัมพันธ์ของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพเชิงโครงสร้าง (Structure-Activity Relationships, SARs) ของอนุพันธ์ sorafenib	34
3.4 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะเจาะจง (targeted cancer drug) ผ่านการหาค่าดัชนีความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Selectivity Index (SI)) ของอนุพันธ์ sorafenib	48
3.5 การศึกษากลไกการเกิด Binding Mechanism ของอนุพันธ์ sorafenib เทียบกับโมเลกุลยา sorafenib ต้นแบบ	49
บทที่ 4 วิธีการทดลอง	54
4. Experimental	54
4.1. Chemicals, Materials and Methods.....	54
4.2 Apparatus and Instruments.....	54
4.3 Chemistry	55
4.3.1. The procedure for preparation of ureido alkyne 9.....	56
4.3.2. General procedure A for preparation of phenyl azide 11a-11p ³⁹	57
4.3.2.1. azidobenzene (11a).....	57
4.3.2.2. 1-azido-2-fluorobenzene (11b).....	58
4.3.2.3. 1-azido-3-fluorobenzene (11c).....	58
4.3.2.4. 1-azido-4-fluorobenzene (11d).....	58
4.3.2.5. 1-azido-2-chlorobenzene (11e).....	59
4.3.2.6. 1-azido-3-chlorobenzene (11f).....	59
4.3.2.7. 1-azido-4-chlorobenzene (11g).....	60
4.3.2.8. 1-azido-2-bromobenzene (11h).....	60
4.3.2.9. 1-azido-3-bromobenzene (11i)	61
4.3.2.10. 1-azido-4-bromobenzene (11j).....	61

4.3.2.11. 1-azido-2-iodobenzene (11k)	61
4.3.2.12. 1-azido-3-iodobenzene (11l).....	62
4.3.2.13. 1-azido-4-iodobenzene (11m).....	62
4.3.2.14. 2-azidophenol (11n).....	63
4.3.2.15. 3-azidophenol (11o).....	63
4.3.2.16. 4-azidophenol (11p).....	63
4.3.2.17. 1-azido-2-methoxybenzene (11q).....	64
4.3.2.18. 1-azido-3-methoxybenzene (11r).....	64
4.3.2.19. 1-azido-4-methoxybenzene (11s)	65
4.3.2.20. 1-azido-2-methylbenzene (11t).....	65
4.3.2.21. 1-azido-3-methylbenzene (11u).....	65
4.3.2.22. 1-azido-4-methylbenzene (11v)	66
4.3.2.23. 1-azido-2-(trifluoromethyl)benzene (11w)	66
4.3.2.24. 1-azido-3-(trifluoromethyl)benzene (11x).....	67
4.3.2.25. 1-azido-4-(trifluoromethyl)benzene (11y)	67
4.3.2.26. 2-azidobenzonitrile (11z)	67
4.3.2.27. 3-azidobenzonitrile (11a').....	68
4.3.2.28. 4-azidobenzonitrile (11b')	68
4.3.2.29. 1-azido-2-nitrobenzene (11c')	69
4.3.2.30. 1-azido-3-nitrobenzene (11d').....	69
4.3.2.31. 1-azido-4-nitrobenzene (11e').....	69
4.3.2.32. 1-azido-2-ethylbenzene (11f')	70
4.3.2.33. 1-azido-3-ethylbenzene (11g').....	70
4.3.2.34. 1-azido-4-ethylbenzene (11h').....	71

4.3.2.35. 1-azido-2-isopropylbenzene (11i')	71
4.3.2.36. 1-azido-3-isopropylbenzene (11j')	71
4.3.2.37. 1-azido-4-isopropylbenzene (11k')	72
4.3.2.38. 1-azido-3-(tert-butyl)benzene (11l')	72
4.3.2.39. 1-azido-4-(tert-butyl)benzene (11m')	73
4.3.2.40. 3-azidobenzoic acid (11n')	73
4.3.2.41. 4-azidobenzoic acid (11o')	73
4.3.2.42. N-(4-azidophenyl)acetamide (11p')	74
4.3.3. General procedure B for preparation of sorafenib derivatives 12a-12p' ⁴⁰	74
4.3.3.1. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-phenyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12a)	75
4.3.3.2. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-fluorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12b)	75
4.3.3.3. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-fluorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12c)	76
4.3.3.4. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-fluorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12d)	77
4.3.3.5. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-chlorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12e)	77
4.3.3.6. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-chlorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12f)	78
4.3.3.7. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-chlorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12g)	78
4.3.3.8. 1-((1-(2-bromophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (12h)	79

4.3.3.9. 1-((1-(3-bromophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (12i)	80
4.3.3.10. 1-((1-(4-bromophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl methyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (12j)	80
4.3.3.11. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-iodophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12k).....	81
4.3.3.12. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-iodophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12l)	81
4.3.3.13. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-iodophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12m).....	82
4.3.3.14. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-hydroxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12n).....	83
4.3.3.15. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-hydroxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12o).....	83
4.3.3.16. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-hydroxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12p).....	84
4.3.3.17. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12q).....	84
4.3.3.18. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12r).....	85
4.3.3.19. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12s).....	86
4.3.3.20. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(o-tolyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12t).....	86
4.3.3.21. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(m-tolyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12u).....	87

- 4.3.3.22. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(p-tolyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12v). 87
- 4.3.3.23. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12w) . 88
- 4.3.3.24. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12x) .. 89
- 4.3.3.25. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12y) .. 89
- 4.3.3.26. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-cyanophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12z)..... 90
- 4.3.3.27. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-cyanophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12a')..... 90
- 4.3.3.28. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-cyanophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12b')..... 91
- 4.3.3.29. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12c')..... 92
- 4.3.3.30. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12d')..... 92
- 4.3.3.31. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12e')..... 93
- 4.3.3.32. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-ethylphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12f')..... 93
- 4.3.3.33. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-ethylphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12g') 94
- 4.3.3.34. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-ethylphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12h')..... 95

4.3.3.35. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-isopropylphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12i')	95
4.3.3.36. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-isopropylphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12j')	96
4.3.3.37. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-isopropylphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (12k')	97
4.3.3.38. 1-((1-(3-(tert-butyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (12l')	97
4.3.3.39. 1-((1-(4-(tert-butyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (12m')	98
4.3.3.40. 3-(4-((3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)benzoic acid (12n')	98
4.3.3.41. 4-(4-((3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)benzoic acid (12o')	99
4.3.3.42. N-(4-(4-((3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)acetamide (12p')	100
4.3.4. General procedure C for preparation of sorafenib derivatives 12q'-12s' ⁴¹	100
4.3.4.1. 1-((1-(2-aminophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (12q')	101
4.3.4.2. 1-((1-(3-aminophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (12r')	101
4.3.4.3. 1-((1-(4-aminophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (12s')	102
4.3.5. General procedure D for preparation of sorafenib derivatives 12t' and 12u'	103

4.3.5.1. N-(2-(4-((3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)acetamide (12t').....	103
4.3.5.2. N-(3-(4-((3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)acetamide (12u').....	104
4.3.6. General procedure E for preparation of sorafenib derivatives 12v' and 12w' ⁴²	104
4.3.6.1. 3-(4-((3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N-methylbenzamide (12v').....	105
4.3.6.2. 4-(4-((3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N-methylbenzamide (12w').....	105
4.4. Biology.....	106
4.4.1. Biological activity methods for HepG2 cancer cell lines.....	106
4.4.2. Biological activity methods for A549, HuCCA-1, T47-D, and MDA-MB-231 cancer cell lines and for MRC-5 cells.....	107
4.4.3. Biological activity methods for MOLT-3 and HL-60 cancer cell lines.....	107
4.5. Molecular modeling.....	107
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	109
รายการอ้างอิง.....	111
ภาคผนวก.....	116
ประวัติผู้เขียน.....	241

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การศึกษาโมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของคุณ Ke Tang และคณะ ²⁷	16
ตารางที่ 2 ตารางสรุปค่า binding energy, Van der Waals, hydrogen bond, amino acid interactions และ hydrogen bond length ของอนุพันธ์โซราเฟนิบที่มีวง 1,2,3-triazole เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล M1-M5 ในโปรตีน B-Raf โดยเปรียบเทียบกับโมเลกุลโซราเฟนิบต้นแบบ ..	29
ตารางที่ 3 ตารางสรุปค่า binding energy, Van der Waals, hydrogen bond, amino acid interactions และ hydrogen bond length ของอนุพันธ์โซราเฟนิบที่มีวง 1,2,3-triazole เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล M1-M5 ในโปรตีน VEGFR-2 โดยเปรียบเทียบกับโมเลกุลโซราเฟนิบต้นแบบ ..	30
ตารางที่ 4 แสดง functional group ที่แตกต่างกัน (R) และร้อยละผลผลิต (%yield) ของ phenyl azide 11a-11p' และ target molecules 12a-12p'	31
ตารางที่ 5 ความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ร้อยละ 50 (IC ₅₀ (μM)), ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 25 μM (%Cell viability) และค่าดัชนีต่อความจำเพาะเจาะจง (Selectivity Index [SI]) ของอนุพันธ์ sorafenib 12a-12w' เทียบกับยา sorafenib ต้นแบบและยา doxorubicin	39
ตารางที่ 6 พลังงานในการเกิด interaction (kcal/mol) กับกรดอะมิโนในโปรตีน B-Raf และ VEGFR-2 ของอนุพันธ์ sorafenib 12e (o-Cl), 12m' (p-t-Bu) และยา sorafenib (BAX) ด้วยวิธีการทำ molecular docking.....	51

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 กราฟแสดงจำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งทั่วโลก ¹	1
ภาพที่ 2 แผนภูมิวงกลมแสดงจำนวนและร้อยละการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลก 9,555,027 คน ด้วยโรคมะเร็ง จำแนกตามกลุ่มภูมิภาค ในปี พ.ศ. 2561 ²	2
ภาพที่ 3 แผนภูมิวงกลมแสดงจำนวนและร้อยละการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลกด้วยโรคมะเร็ง จำแนกตามชนิดของมะเร็ง ในปี พ.ศ. 2561 ²	2
ภาพที่ 4 กราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบอัตราการเสียชีวิตในประเทศไทยต่อประชากร 100,000 คน ในปี พ.ศ. 2557 และ 2561 จำแนกตามสาเหตุที่สำคัญ ³	3
ภาพที่ 5 จำนวนผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งในประเทศไทยในรอบ 10 ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548-2558 ¹	3
ภาพที่ 6 กราฟเส้นแสดงอัตราการเสียชีวิตในประเทศไทย ต่อประชากร 100,000 คน ของแต่ละปี จำแนกตามกลุ่มโรคมะเร็ง ในปี 2557 ถึง 2561 ³	4
ภาพที่ 7 ระยะเวลาของการเกิดเซลล์มะเร็ง ⁴	5
ภาพที่ 8 โครงสร้างของยา doxorubicin	6
ภาพที่ 9 โครงสร้างยาที่องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (US FDA) ยอมรับให้ใช้ในการยับยั้ง kinase ในเซลล์มะเร็ง	7
ภาพที่ 10 โครงสร้างของยา sorafenib โดยแสดงองค์ประกอบส่วนต่าง ๆ ของโมเลกุล	11
ภาพที่ 11 กลไกการออกฤทธิ์ของยา sorafenib ผ่านการยับยั้ง kinases ใน MAPK pathway ^{18, 22}	12
ภาพที่ 12 ภาพแบบ 2 มิติ และ 3 มิติ ของโครงสร้างผลึกระหว่างยา sorafenib และโปรตีน VEGFR- 2 ^{21, 23}	13
ภาพที่ 13 ภาพแบบ 2 มิติ และ 3 มิติ ของโครงสร้างผลึกระหว่างยา sorafenib และโปรตีน B-Raf ^{23,} 24	14
ภาพที่ 14 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของคุณ Wenhui Zhan และคณะ ²⁵	15
ภาพที่ 15 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของคุณ Cui-rong Zhao และคณะ ²⁶	15
ภาพที่ 16 โครงสร้างโมเลกุลเลียนแบบ sorafenib HLC-080 ²⁷	16

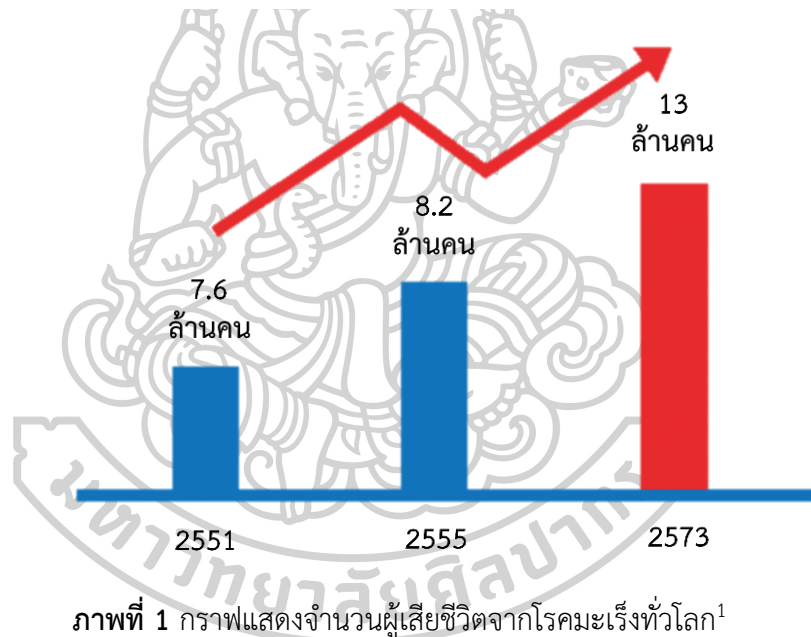
ภาพที่ 17 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของคุณ Chunjiang Wu และคณะ ²⁸	17
ภาพที่ 18 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของ Mahmoud M. และคณะ ²⁹	18
ภาพที่ 19 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของคุณ Chunjiang Wu และคณะ ³⁰	19
ภาพที่ 20 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของ Mingze Q. และคณะ ¹⁹	20
ภาพที่ 21 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของคุณ El-Damasy และคณะ ³¹	21
ภาพที่ 22 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของคุณ Min Wang และคณะ ³²	22
ภาพที่ 23 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของ Shaofeng Sun และคณะ ³³	23
ภาพที่ 24 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของคุณ Mohamed A. Zeidan และคณะ ²¹	24
ภาพที่ 25 แนวคิดในการออกแบบโมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ที่มีไตรเอโซลเป็นแกนกลางของ ผู้วิจัย	28
ภาพที่ 26 อนุพันธ์ไฮราซีนที่มีวง 1,2,3-triazole เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล M1-M5	29
ภาพที่ 27 เส้นทางการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ที่มีไตรเอโซลเป็นแกนกลาง	31
ภาพที่ 28 แสดงการสังเคราะห์และร้อยละผลผลิตของโมเลกุลเป้าหมาย 12q'-12s'	33
ภาพที่ 29 แสดงการสังเคราะห์และร้อยละผลผลิตของโมเลกุลเป้าหมาย 12t' และ 12u'	33
ภาพที่ 30 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์และร้อยละผลผลิตของโมเลกุลเป้าหมาย 12v' และ 12w'	34
ภาพที่ 31 กลไกการเกิด interaction ของโมเลกุล 12e (o-Cl); (สีม่วง), 12m' (p-t-Bu); (สีฟ้า) และ โมเลกุลยา sorafenib ต้นแบบ (BAX); (สีส้ม) ในโพรงโปรตีน B-Raf (PDB ID: 1UWH)	50
ภาพที่ 32 กลไกการเกิด interaction ของโมเลกุล 12e (o-Cl); (สีม่วง), 12m' (p-t-Bu); (สีฟ้า) และ โมเลกุลยา sorafenib ต้นแบบ (BAX); (สีส้ม) ในโพรงโปรตีน VEGFR-2 (PDB ID: 4ASD)	52

บทที่ 1

บทนำ

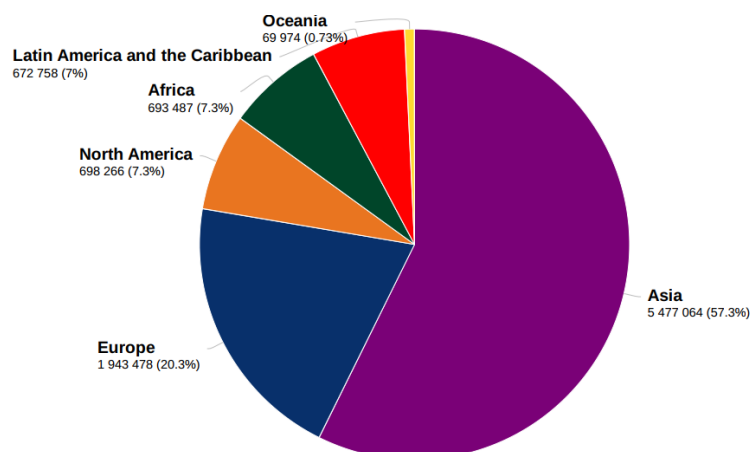
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

โรคมะเร็งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของทุกประเทศ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตอันดับต้นๆ ของผู้คนทั่วโลก และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในทุกปี โดยเมื่อย้อนกลับไปในปี พ.ศ. 2551 พบว่ามีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งทั่วโลกประมาณ 7.6 ล้านคน ต่อมาในปี พ.ศ. 2555 มีจำนวนของผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งทั่วโลกประมาณ 8.2 ล้านคน นอกจากนี้ยังมีการคาดการณ์ว่าประมาณปี พ.ศ. 2573 จะมีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งทั่วโลกเพิ่มขึ้นเป็นจำนวน 13 ล้านคน¹ ดังแสดงในภาพที่ 1

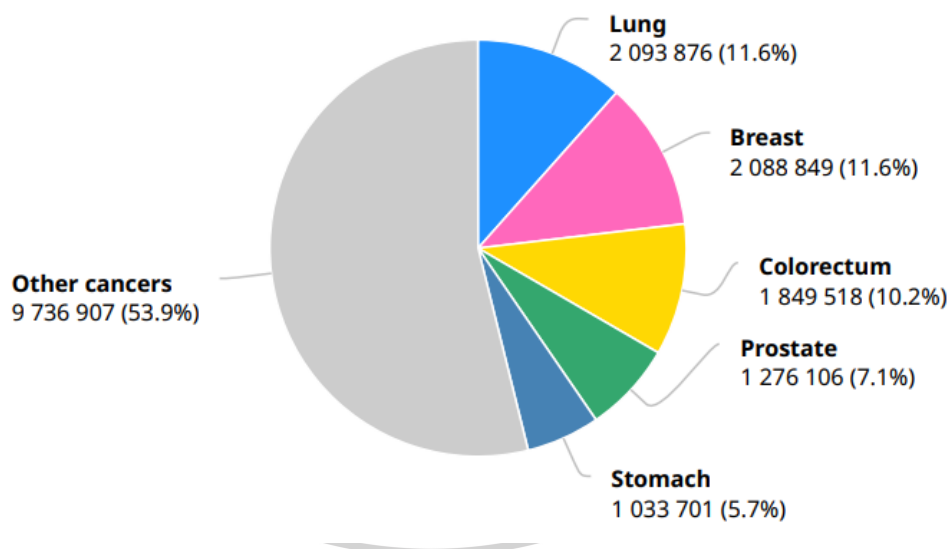


ภาพที่ 1 กราฟแสดงจำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งทั่วโลก¹

ในปี พ.ศ. 2561 องค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) ได้รายงานผลการสำรวจการเสียชีวิตของประชากรในทุกทวีปทั่วโลกจากโรคมะเร็ง พบว่าการเสียชีวิตของประชากรโลกจากโรคมะเร็ง 3 อันดับแรก คือ ทวีปเอเชียมีการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งสูงที่สุดจากทุกทวีปทั่วโลก ร้อยละ 57.3 อันดับที่ 2 คือ ทวีปยุโรปมีการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งร้อยละ 20.3 และอันดับที่ 3 คือ ทวีปอเมริกาเหนือมีการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งร้อยละ 7.3 ดังแสดงในภาพที่ 2 นอกจากนี้ยังรายงานชนิดของมะเร็ง 5 อันดับแรกที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของประชากรในโลก ได้แก่ มะเร็งปอดร้อยละ 11.6, มะเร็งเต้านมร้อยละ 11.6, มะเร็งลำไส้ร้อยละ 10.2, มะเร็งต่อมลูกหมากร้อยละ 7.1 และมะเร็งกระเพาะอาหารร้อยละ 5.7 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3



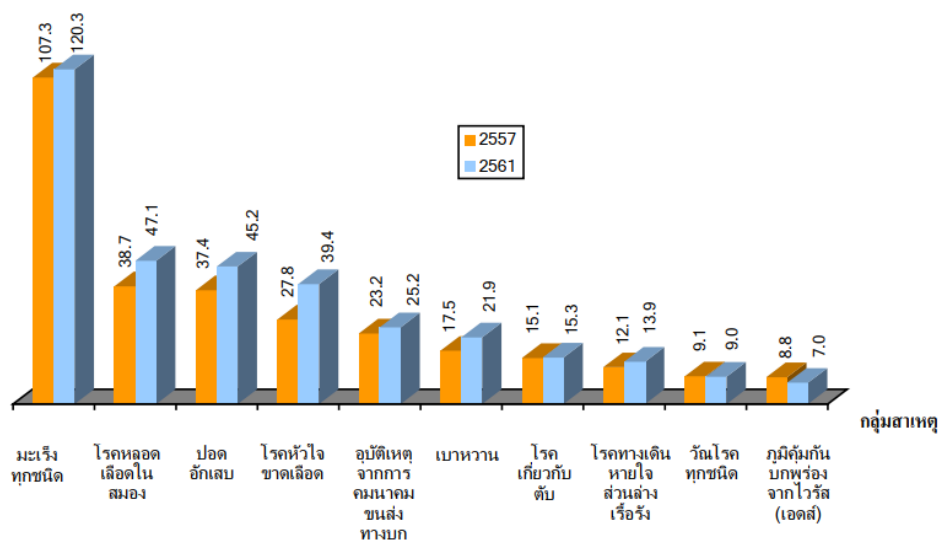
ภาพที่ 2 แผนภูมิวงกลมแสดงจำนวนและร้อยละการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลก 9,555,027 คน ด้วยโรคมะเร็ง จำแนกตามกลุ่มภูมิภาค ในปี พ.ศ. 2561²



ภาพที่ 3 แผนภูมิวงกลมแสดงจำนวนและร้อยละการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลกด้วยโรคมะเร็ง จำแนกตามชนิดของมะเร็ง ในปี พ.ศ. 2561²

จากข้อมูลของกองยุทธศาสตร์และแผนงาน สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุขได้รายงานข้อมูลการเสียชีวิตของประชากรไทยโดยเปรียบเทียบระหว่างปี พ.ศ.2557 และปี พ.ศ. 2561 พบว่าสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญ ได้แก่ โรคมะเร็งทุกชนิด, โรคหลอดเลือดในสมอง, ปอดอักเสบ, โรคหัวใจขาดเลือด และอุบัติเหตุจากการคมนาคมขนส่งทางบก โดยจากข้อมูลที่แสดงพบว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุหลักอันดับหนึ่งของการเสียชีวิตของประชากรไทย ดังแสดงในภาพที่ 4³ และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นในทุก ๆ ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548-2558¹ ดังแสดงในภาพที่ 5 เนื่องจากอาการของโรคมะเร็งในระยะเริ่มต้นจะไม่แสดงอาการหรือไม่พบความผิดปกติ ทำให้มักตรวจพบมะเร็งในระยะลุกลาม

(invade) หรือในระยะสุดท้าย ทำให้การรักษาไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร ปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุในการเกิดโรคมะเร็งที่แน่ชัดและยังไม่มีวิธีที่สามารถวินิจฉัยโรคที่แน่นอนจน ทำให้สามารถทำการรักษาได้ยาก



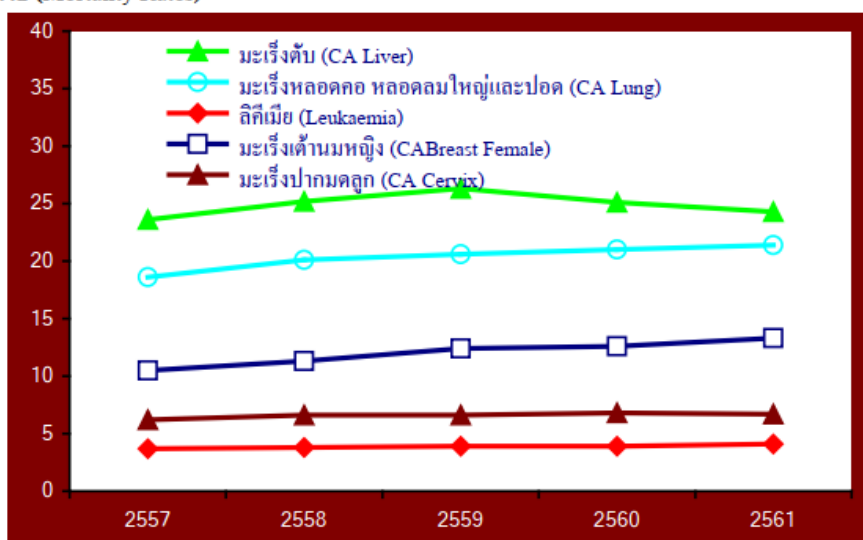
ภาพที่ 4 กราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบอัตราการเสียชีวิตในประเทศไทยต่อประชากร 100,000 คน ในปี พ.ศ. 2557 และ 2561 จำแนกตามสาเหตุที่สำคัญ³



ภาพที่ 5 จำนวนผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งในประเทศไทยในรอบ 10 ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548-2558¹
นอกจากนี้ได้มีการรายงานผลการจัดอันดับอัตราการเสียชีวิตจำแนกตามกลุ่มโรคมะเร็งของประชากรไทย โดยสำรวจจากประชากร 100,000 คน ของแต่ละปีระหว่างในปี พ.ศ. 2557 ถึงปี พ.ศ. 2561 พบว่าโรคมะเร็งตับเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของประชากรไทย ตามด้วยมะเร็งหลอด

คอ หลอดลมใหญ่และปอด, มะเร็งลิคีเมีย, มะเร็งเต้านมหญิง และมะเร็งปากมดลูก ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 6³

อัตราการตาย (Mortality Rates)



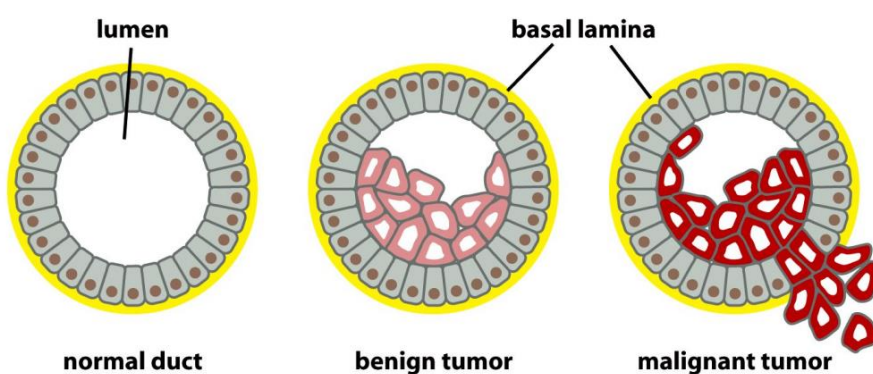
พ.ศ.

ภาพที่ 6 กราฟเส้นแสดงอัตราการเสียชีวิตในประเทศไทย ต่อประชากร 100,000 คน ของแต่ละปี จำแนกตามกลุ่มโรคมะเร็ง ในปี 2557 ถึง 2561³

การเกิดโรคมะเร็งทั่วไปคาดว่าเกิดจากความผิดปกติ (mutation) ของยีนซ้ำในทีเดิมหลายครั้งก่อให้เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรมในระดับยีน ซึ่งสามารถส่งต่อทางพันธุกรรมได้ และเมื่อเกิดความผิดปกติของยีนขึ้นจะทำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ที่ผิดปกติจนเกิดเป็นเซลล์มะเร็งโดยมีการเจริญเติบโตอย่างไม่มีการจำกัดที่ไม่สามารถควบคุมได้ รวมถึงมีการลุกลาม (invade) และรุกราน (colonize) เซลล์อื่นในร่างกาย การเกิดเซลล์มะเร็งสามารถเกิดได้จากเซลล์สองชนิดในร่างกาย คือ เซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) ซึ่งเมื่อเกิดเป็นเซลล์มะเร็งจะถูกเรียกว่าคาร์ซิโนมา (Carcinomas) และเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissues) ซึ่งเมื่อเกิดเป็นเซลล์มะเร็งจะถูกเรียกว่าซาร์โคมา (Sarcomas) นอกจากนี้เซลล์มะเร็งยังสามารถเกิดจากเซลล์ชนิดอื่นได้ เช่น เกิดจากเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukemias), ต่อมน้ำเหลือง (lymphomas) เป็นต้น ซึ่งโดยส่วนมากเซลล์มะเร็งเกิดจากเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) เนื่องจากสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมมากกว่าเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งสิ่งแวดล้อม เช่น การสัมผัสกับสารก่อมะเร็ง (chemical carcinogens) หรือ รังสี (radical carcinogens) อาจส่งผลทำให้เซลล์ปกติเกิดการกลายพันธุ์จนเกิดเป็นเซลล์มะเร็งได้ จึงนำมาสู่การศึกษาด้านมะเร็ง (oncology) ทำให้ทราบระยะของการผิดปกติของเซลล์จนนำมาสู่การเกิดเป็นเซลล์มะเร็ง โดยสามารถแบ่งได้เป็น 4 ระยะ ดังแสดงในภาพที่ 7 ดังนี้

1. ระยะเนื้องอก (tumor) เป็นระยะที่เกิดความผิดปกติของเซลล์ปกติขึ้น โดยในระยะนี้จะยังไม่สามารถตรวจพบความผิดปกติได้

2. ระยะการขยายขนาดหรือเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ผิดปกติ (benign) เป็นระยะที่เซลล์ที่ผิดปกติเกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น ซึ่งในระยะนี้จะเป็นเนื้องอกปกติที่ยังไม่เป็นเนื้อร้าย แต่สามารถตรวจพบได้ยาก โดยหากสามารถตรวจพบและกำจัดออกได้ทันเวลา จะยังไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย
3. ระยะลุกลาม (malignant) เป็นระยะที่เนื้องอกเริ่มกลายเป็นเนื้อร้าย โดยเนื้องอกในระยะที่ 2 (benign) ที่เพิ่มจำนวนขึ้นจนเต็มบริเวณที่เกิดจนไม่มีพื้นที่ให้เพิ่มจำนวนได้อีกต่อไป จึงเริ่มลุกลามไปยังเซลล์อื่น โดยในระยะนี้จะเป็นระยะที่สามารถตรวจพบได้ แต่ยากที่จะกำจัดเซลล์ดังกล่าว
4. ระยะแพร่กระจาย (metastases) เป็นระยะที่เซลล์มะเร็งในระยะลุกลาม (malignant) ลุกลามและไปเจริญเติบโตที่อวัยวะข้างเคียงหรืออื่น ๆ ในร่างกาย ทำให้ยากต่อการรักษา

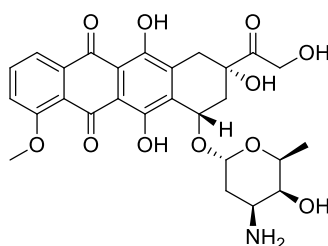


ภาพที่ 7 ระยะของการเกิดเซลล์มะเร็ง⁴

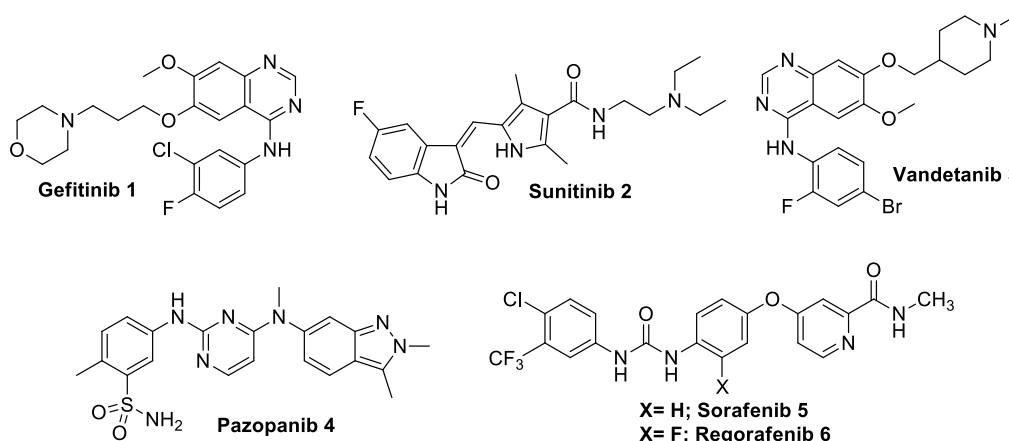
นอกจากนี้การเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งอาจเกิดจากปัจจัยอื่นได้ เช่น ความผิดปกติในส่วนของ การส่งสัญญาณในการเจริญเติบโตของเซลล์ (signal transduction) ซึ่งมักผิดปกติในส่วนของ receptor tyrosine kinase ในส่วนของ Ras และ Raf protein ใน MAP kinase pathway ที่เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ไป ทำให้เกิดการส่งสัญญาณการเจริญเติบโตไม่หยุดและเกิดการแบ่งเซลล์อย่างไม่มีขีดจำกัด ทั้งยังอาจเกี่ยวข้องกับ receptor tyrosine kinase อื่นที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่ในเซลล์มะเร็ง (angiogenesis) เช่น Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR) และ Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) ซึ่งส่วนใหญ่ receptor ดังกล่าวมักพบในเซลล์มะเร็งหลายชนิด และหากสามารถยับยั้งการทำงานของ receptor ดังกล่าวได้ จะทำให้สามารถยับยั้งการเกิดและการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้

การรักษาโรคมะเร็งสามารถทำได้ยาก เนื่องจากในระยะเริ่มต้นผู้ป่วยจะยังไม่แสดงอาการของโรค แต่เมื่อผู้ป่วยทราบถึงอาการของโรคมักอยู่ในระยะลุกลาม หากสามารถตรวจพบมะเร็งใน

ระยะแรกได้ สามารถรักษาด้วยวิธี การผ่าตัดนำเนื้อร้ายออก, การใช้รังสีเพื่อฆ่าเซลล์มะเร็ง, การรักษา มะเร็งแบบจำเพาะเจาะจง, การใช้ฮอร์โมนบำบัด และการทำเคมีบำบัด (chemotherapy) เพื่อหยุด การลุกลามและการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ซึ่งวิธีที่เป็นที่นิยมมาก คือ วิธีการทำเคมีบำบัด โดยมี ยาหลายชนิดที่นิยมใช้ในการรักษา เช่น ซิสพลาติน (Cisplatin), ด็อกโซรูบิซิน (Doxorubicin), ไอริโน ทีแคน (Irinotecan) เป็นต้น โดยยาที่นิยมใช้ในการรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัดมากในปัจจุบัน คือ ด็อกโซ รูบิซิน (Doxorubicin) มีชื่อทางการค้าว่า Adriamycin เป็นยาที่สามารถแยกได้จากแบคทีเรีย *Streptomyces peuceitius*⁵ ซึ่งเป็นยารักษามะเร็งในกลุ่มยาเคมีบำบัด (chemotherapy) ที่ สหรัฐอเมริการับรองให้ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านม, มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ, มะเร็งผิวหนัง และมะเร็งเม็ดเลือด ในปี 1974⁶ ต่อมาได้ใช้ในการรักษามะเร็งกระเพาะอาหาร, มะเร็งปอด, มะเร็งรัง ไข่, มะเร็งไทรอยด์ และมะเร็งอื่น ๆ อีกหลายชนิด^{7, 8} โดยมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโต และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในระยะ S-phase (DNA synthetic phase) ซึ่งเป็นระยะที่มี การเพิ่มจำนวน DNA เป็น 2 เท่า ที่มีลักษณะเหมือนกัน เพื่อแบ่งให้เกิดเป็นเซลล์ 2 เซลล์ใหม่⁹ ทำให้ สามารถยับยั้งแบ่งตัวหรือเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ โดยวิธีดังกล่าวใช้ยาในการรักษาที่มี ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำให้ยาสามารถเข้าไปเซลล์อื่น ๆ ในร่างกายได้ ส่งผลให้มีผลข้างเคียงมากต่อผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา เช่น มีแผลในปากหรือคอ, คลื่นไส้, อาเจียน, ท้องเสีย, ผม่วรง, เวียนศีรษะ และระคายเคืองตา เป็นต้น¹⁰ ทำให้ร่างกายของผู้ป่วยทรุดลงอย่าง รวดเร็ว ในปัจจุบันจึงนิยมใช้การรักษาโดยใช้ targeted drug therapy ซึ่งเป็นการใช้ยาในการรักษา โรคมะเร็งแบบจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง ส่งผลให้มีผลข้างเคียงน้อย และให้ประสิทธิภาพการ รักษาที่ดี โดยมียาหลายชนิดที่สามารถใช้รักษาได้ เช่น gefitinib 1, sunitinib 2, vandetanib 3, pazopanib 4, sorafenib 5 และ regorafenib 6 เป็นต้น ซึ่งแสดงโครงสร้างในภาพที่ 9 แม้ว่ายาที่ มีการรักษาแบบจำเพาะเจาะจงจะมีผลข้างเคียงที่น้อย แต่ยาทุกชนิดล้วนมีสมบัติทางเภสัช ผลข้างเคียง และให้ผลการรักษาแตกต่างกัน ทำให้มีนักวิจัยสนใจพัฒนายาที่มีประสิทธิภาพในการ รักษาโรคมะเร็งอย่างจำเพาะเจาะจงให้มากขึ้น เพื่อให้มีประสิทธิภาพการรักษาที่ดี และมีผลข้างเคียง น้อยที่สุด



ภาพที่ 8 โครงสร้างของยา doxorubicin



ภาพที่ 9 โครงสร้างยาที่องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (US FDA) ยอมรับให้ใช้ในการยับยั้ง kinase ในเซลล์มะเร็ง

ยาที่เป็น targeted cancer drug และได้รับความนิยมสูงในปัจจุบัน คือ ยาโซราเฟนิบ (Sorafenib) เนื่องจากมีผลข้างเคียงน้อยและมีประสิทธิภาพในการรักษา และเป็นยาตัวแรกที่ได้รับ การรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration of the United States, US FDA) ให้ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งตับในระยะลุกลาม ต่อมาได้ถูกรับรองให้ใช้ในการรักษามะเร็งไต และมะเร็งไทรอยด์ในระยะลุกลามเช่นกัน sorafenib เป็น multikinase inhibitor มีฤทธิ์ยับยั้ง Receptor Tyrosine Kinase (RTKs) และ kinase ต่าง ๆ ได้หลายชนิด โดยเฉพาะ B-Raf และ VEGFR-2 ซึ่งสามารถพบได้ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด ส่งผลให้สามารถยับยั้ง กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ในเซลล์มะเร็ง (angiogenesis) และการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด (cell proliferation) ทำให้ยา sorafenib สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งอื่น ๆ ได้ด้วย แต่ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งตับโดยใช้ยา sorafenib สามารถใช้ทำการรักษาให้ผู้ป่วยมีอายุยืนยาวขึ้นเพียง 7-8 เดือนหลังจากได้รับการรักษาเท่านั้น¹¹ และแม้ว่า sorafenib จะช่วยยืดอายุของผู้ป่วยได้ แต่ยา sorafenib มีราคาสูงมาก ทำให้ผู้ป่วยทั่วไปไม่สามารถเข้ารับการรักษาได้ นอกจากนี้การรักษาด้วยยานี้ยังมีผลข้างเคียง¹² ทั้งยังถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด (Bioavailability) ได้เพียง 38-49% ทำให้ต้องใช้ยาในปริมาณที่มาก¹³ จึงทำให้ยา sorafenib มีความน่าสนใจนำมาเป็นต้นแบบในการพัฒนาโครงสร้างเพิ่มประสิทธิภาพการรักษามะเร็งหลายชนิด ซึ่งนำไปสู่ยารักษามะเร็งชนิดใหม่ต่อไป

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีความสนใจในการพัฒนาโครงสร้างโมเลกุลยา sorafenib ให้มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งให้ดียิ่งขึ้น ลดผลข้างเคียงของยา เพิ่มการการดูดซึมยาให้ดียิ่งขึ้น และค้นหาประสิทธิภาพการยับยั้งมะเร็งชนิดอื่น ๆ โดยผู้วิจัยมุ่งหวังให้งานวิจัยนี้เป็นแนวทางในการพัฒนาโมเลกุลยาในการรักษาโรคมะเร็งต่อไปจนอาจนำไปสู่การผลิตยารักษาโรคมะเร็งได้เองใน

ประเทศ ซึ่งจะเป็นการลดการนำเข้ายา และอาจส่งผลทำให้ยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งมีราคาลดลง เพื่อให้ผู้ป่วยทั่วไปสามารถจะเข้ารับการรักษาได้

1.2 วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ของ sorafenib ที่มีวงไตรเอโซลเป็นแกนกลางที่มีแนวโน้มมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง
- 2) เพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพ (Structural-Activity Relationship (SAR)) ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง
- 3) ศึกษาการเกิด interaction ของอนุพันธ์ sorafenib ที่มีการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีในหลอดทดลอง โดยการทำให้โมเลกุลาร์ด็อกกิ้ง (molecular docking) เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนายาต่อไป
- 4) เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ และคำนวณค่า selectivity index (SI) ของเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ซึ่งจะสะท้อนประสิทธิภาพและความปลอดภัยของยาที่สังเคราะห์ได้

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

อนุพันธ์ของ sorafenib ที่ออกแบบและสังเคราะห์มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ใกล้เคียงหรือดีกว่าโมเลกุลยา sorafenib ต้นแบบหรือยา doxorubicin

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

1) ออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ของ sorafenib ที่วง phenoxy ในแกนกลางและส่วนวงพีโคลีนาไมด์ของโมเลกุล sorafenib ต้นแบบถูกแทนที่ด้วยวง 1,2,3-triazole ซึ่งต่อกับวงเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ชนิดต่าง ๆ ที่ตำแหน่งต่าง ๆ บนวงเบนซีน โดยสังเคราะห์ผ่านปฏิกิริยา 1,3-ไดโพลาร์ไซโคลแอดดิชัน (1,3-dipolar cycloaddition) หรือปฏิกิริยาคลิก (Click reaction)

2) ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเบื้องต้นกับเซลล์มะเร็งตับ (HepG2), มะเร็งปอด (A549), มะเร็งถุงน้ำดี (HuCCA-1), มะเร็งเม็ดเลือดขาว (MOLT-3 และ HL-60) และมะเร็งเต้านม (T47-D และ MDA-MB-231) ในหลอดทดลอง ด้วยเทคนิค MTT หรือเทคนิค XTT assay โดยเตรียมสารที่สังเคราะห์ได้ที่ความเข้มข้นหนึ่ง และนำมาทดสอบและหาค่า %inhibition หรือค่า %cell viability โดยถ้าสารที่สังเคราะห์ได้มีฤทธิ์ดีจะนำไปทดสอบเพื่อหาค่า IC_{50} เทียบกับ sorafenib ต้นแบบหรือยาที่ใช้ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ๆ ต่อไป

3) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพ (Structural-Activity Relationship (SAR)) ของอนุพันธ์ของ sorafenib ที่ออกแบบและสังเคราะห์ได้ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

4) ศึกษาการเกิด interaction ของอนุพันธ์ sorafenib ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีในหลอดทดลอง โดยการทำให้ molecular docking ในโปรตีน B-Raf และ VEGFR-2

5) ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อปิวปอด (normal embryonic lung fibroblast (MRC-5)) และคำนวณหาค่าดัชนีความจำเพาะจงในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Selectivity Index (SI)) เพื่อประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งกับความปลอดภัยของอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้



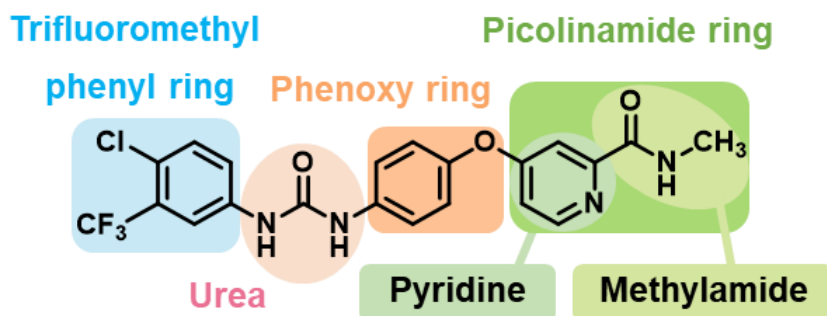
บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ยาโซราเฟนิบ (Sorafenib)¹⁴

โซราเฟนิบ (Sorafenib) มีชื่อทางการค้าว่า Nexavar[®] เป็นยาชนิดแรกที่องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (US FDA) รับรองให้ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งระดับ (hepatocellular carcinoma หรือ HCC), มะเร็งไต (Renal carcinoma, RCC) และมะเร็งไทรอยด์ในระยะลุกลาม โดยเป็นยาในกลุ่ม Multikinase inhibitor ที่ใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Targeted cancer therapy) ซึ่งสามารถยับยั้ง receptor หลายชนิดในกลุ่ม Receptor Tyrosine kinase (RTKs) โดยการออกฤทธิ์สามารถยับยั้งกระบวนการส่งสัญญาณผ่าน Ras-Raf-Mek-Erk pathway ใน MAP kinase pathway และ Receptor ที่เกี่ยวข้องในกลุ่ม pro-angiogenic RTKs (VEGFRs, PDGFR β , FGFR1, c-Kit, Flt-3 และ RET) ซึ่งเป็นการยับยั้งกลไกการเกิดมะเร็งอย่างจำเพาะเจาะจง (Molecular targeted therapy) ส่งผลให้เกิดการต้าน cell proliferation และ angiogenesis ซึ่งเป็นกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ ทำให้เซลล์มะเร็งขาดออกซิเจนและอาหารหล่อเลี้ยงเซลล์ ทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถเจริญเติบโตและแพร่กระจายไปยังอวัยวะส่วนอื่นได้¹⁵⁻¹⁷

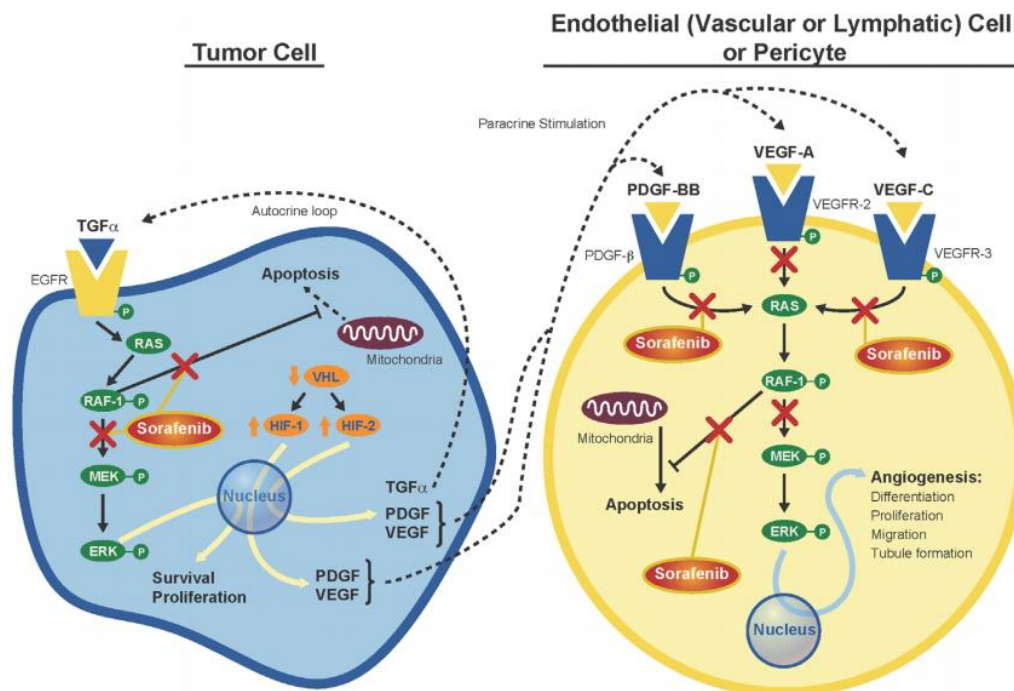
นอกจากนี้ sorafenib ยังเกิดอันตรกิริยากับยาอื่นได้ค่อนข้างน้อย จึงสามารถใช้ร่วมกับยาตัวอื่น เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ดังนั้น sorafenib จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งระดับและมะเร็งชนิดอื่นในระยะลุกลามที่ไม่สามารถรับการรักษาโดยวิธีอื่น เช่น การผ่าตัดและการใช้เคมีบำบัด แต่อย่างไรก็ตามผู้ป่วยมะเร็งระดับระยะลุกลามที่ได้รับการรักษาด้วยยา sorafenib ยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ ซึ่งทำได้เพียงยืดอายุให้อยู่ได้นาน 7-8 เดือนหลังจากได้รับการรักษาเท่านั้น¹¹ และถึงแม้ว่ายา sorafenib จะสามารถช่วยยืดอายุของผู้ป่วยได้ แต่ทั้งนี้เนื่องด้วยยา sorafenib มีราคาที่สูง จึงทำให้ผู้ป่วยหลายรายไม่สามารถเข้าถึงการรักษานี้ได้ และยา มีความสามารถในการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด (bioavailability) ได้เพียง 38-49% ทำให้ต้องใช้ยาในปริมาณที่มาก¹³ นอกจากนี้ยา sorafenib ยังมีผลข้างเคียงที่พบได้บ่อย คือ มือและเท้าบวมแดงและเจ็บ (Hand foot syndrome) ความดันโลหิตสูง มีภาวะเลือดออกง่าย ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน และเบื่ออาหาร เป็นต้น¹² ทั้งนี้ยังต้องมีการติดตามผลของยาในระยะยาวต่อไป¹⁸⁻²⁰



ภาพที่ 10 โครงสร้างของยา sorafenib โดยแสดงองค์ประกอบส่วนต่าง ๆ ของโมเลกุล

2.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยา sorafenib (Mechanism of action of Sorafenib)

กลไกการออกฤทธิ์ของ sorafenib จะเป็นการยับยั้งการทำงานของ Receptor tyrosine kinase (RTKs) หลายชนิด เช่น Vascular endothelium growth factor receptor (VEGFR), Platelet derived growth factor receptor (PDGFR), stem cell factor receptor (c-Kit) และ Fit-3 โดย RTKs เหล่านี้จะมีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่ควบคุมการสื่อสารภายในเซลล์และระหว่างผ่าน Signal transduction ซึ่งในบรรดา RTKs นี้ VEGFR-2 ถือเป็นโปรตีนที่นักวิจัยสนใจที่จะยับยั้ง เนื่องจากเป็นโปรตีนเริ่มต้นของ signal transduction cascade ในกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ซึ่งเป็นกระบวนการหลักที่ทำให้เกิดมะเร็ง ดังนั้นการป้องกันหรือควบคุมการส่งสัญญาณ signal transduction ถือเป็นแนวทางที่เหมาะสมในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง^{15, 16, 21} หลายปีที่ผ่านมาได้มีนักวิจัยคิดค้นยาที่จะใช้เป็น tyrosine kinase inhibitor ในการไปจับกับ receptor VEGFR เพื่อหยุดยั้งกระบวนการส่งสัญญาณ นอกจากนั้นยา sorafenib ยังยับยั้ง kinase อื่น คือ Raf serine/threonine kinase ที่เกิดการกลายพันธุ์ไป ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในกระบวนการส่งสัญญาณ ผ่าน MAPK cascade (mitogen-activated protein kinase) ทำให้กระบวนการ auto-phosphorylation ไม่สามารถเกิดขึ้นต่อไปได้ ทำให้ลดจำนวนของเซลล์มะเร็ง (proliferation), เพิ่มการตายของเซลล์มะเร็ง (apoptosis) และหยุดกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ที่ไปเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ส่งผลให้เซลล์มะเร็งขาดออกซิเจนและอาหารหล่อเลี้ยงเซลล์ ทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถเจริญเติบโตและแพร่กระจายไปยังอวัยวะส่วนอื่นได้¹⁸⁻²⁰ ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 กลไกการออกฤทธิ์ของยา sorafenib ผ่านการยับยั้ง kinases ใน MAPK pathway^{18, 22}

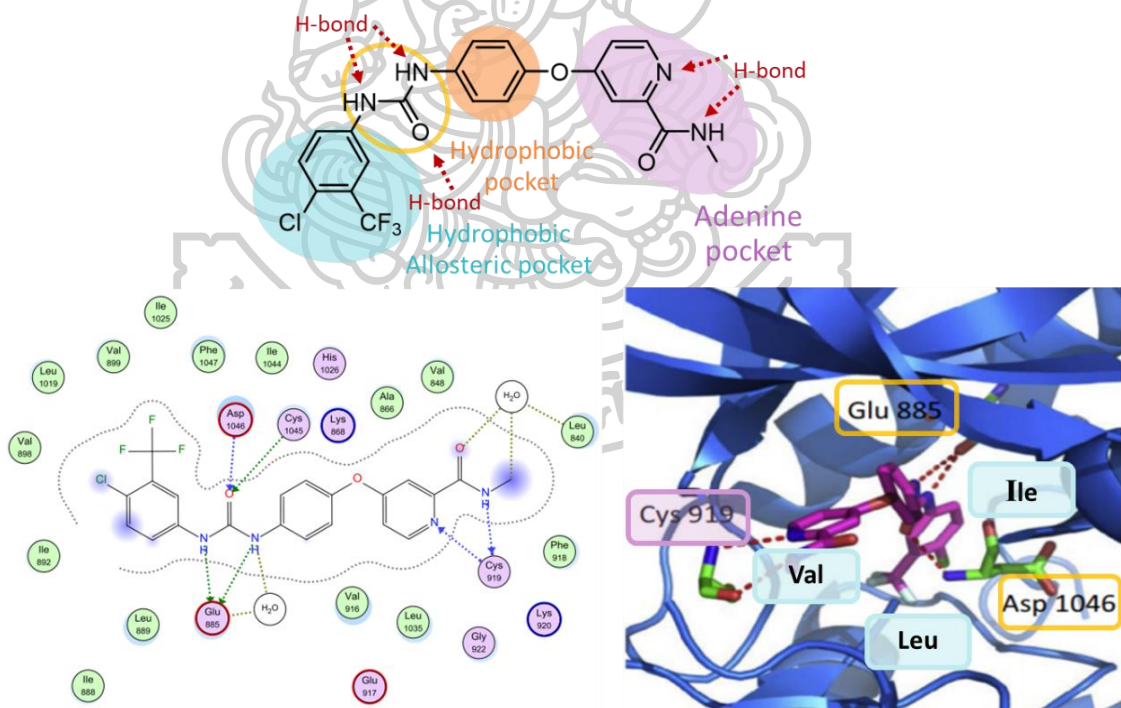
2.3 Binding mechanism และ structural features ของยา sorafenib

ในปี ค.ศ. 2015 Peng Wu และคณะ²³ ได้ศึกษากลไกการจับกับโมเลกุลเป้าหมายของยา sorafenib โดยการตกผลึกยา sorafenib ในโปรตีน VEGFR-2²⁴ และ B-Raf²¹ ซึ่งพบว่ายา sorafenib มีส่วน binding site ที่สำคัญ 4 ส่วน ดังแสดงในภาพที่ 12 และ 13 ดังนี้

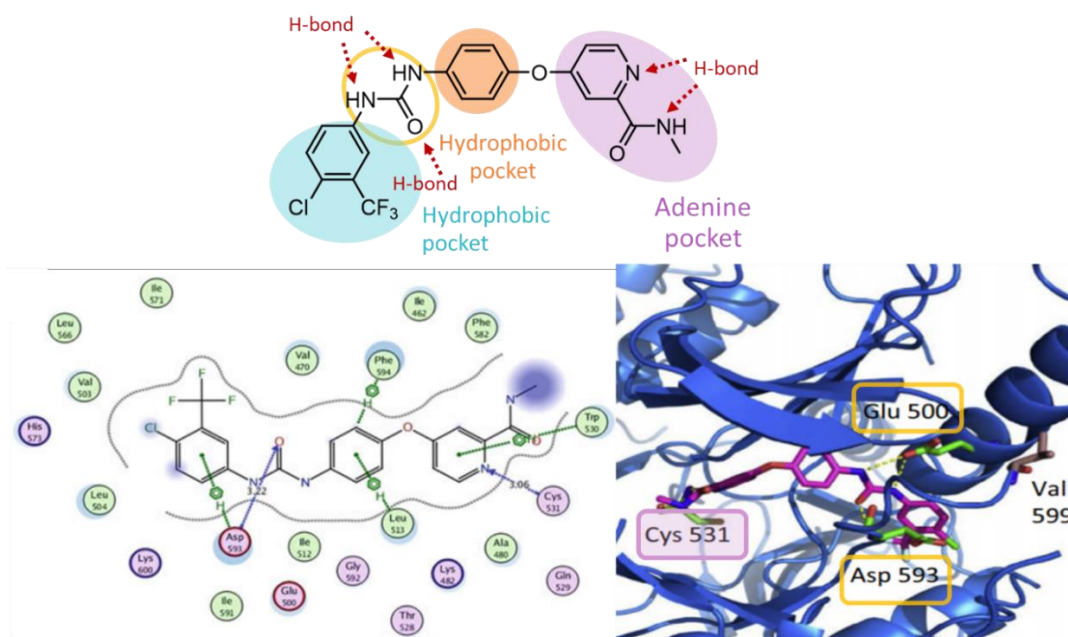
1. Allosteric pocket หรือส่วน trifluoromethyl phenyl ring ในส่วน interaction ของ VEGFR-2 พบว่าเกิด interaction กับกรดอะมิโนที่เป็น hydrophobic ที่ล้อมรอบในโพรงโปรตีน ส่วน interaction ของ B-Raf พบว่าเกิด π - π interaction กับ Asp593 และในส่วนอื่นจะถูกล้อมรอบด้วยกรดอะมิโนที่เป็น hydrophobic
2. Hydrogen bond pocket หรือส่วน urea moiety ในส่วน interaction ของ VEGFR-2 พบว่าเกิด interaction กับ Glu885, Asp1046, Cys1045 และโมเลกุลน้ำในโปรตีน ส่วน interaction ของ B-Raf พบว่าเกิด interaction กับ Asp593
3. Hydrophobic pocket หรือส่วน phenoxy ring ในส่วน interaction ของ VEGFR-2 พบว่าไม่เกิด interaction เนื่องจากอาจเป็นเพียงส่วนของ linker เท่านั้น ส่วน interaction ของ B-Raf พบว่าเกิด π - π stacking และ hydrophobic interaction กับ Phe594 และ Leu 513

4. Adenine pocket หรือส่วน picolinamide ring ในส่วน interaction ของ VEGFR-2 พบว่าเกิด H-bond interaction กับ Cys919 และโมเลกุลน้ำในโปรตีน ส่วน interaction ของ B-Raf พบว่าเกิด π - π interaction กับ Try530 และเกิด H-bond interaction กับ Cys531

จากผลการศึกษา interaction ของโมเลกุลยา sorafenib ในโปรตีนโปรตีน VEGFR-2 และโปรตีน B-Raf พบว่าทุกส่วนในโมเลกุลยา sorafenib นั้นมีความสำคัญ แต่หากจะทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลยา sorafenib สามารถเปลี่ยนแปลงได้ทุกส่วน ซึ่งการเลือกเปลี่ยนแปลงในส่วนที่มี interaction ที่น้อยอาจจะยังคงความสามารถในการเกิด interaction ในโปรตีน B-Raf และ VEGFR-2 ไว้ดั้งเดิม ทำให้อาจเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งให้ดียิ่งขึ้นได้ โดยจะเห็นได้ว่าส่วน phenoxy ring เป็นส่วนที่มีความน่าสนใจในการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากในส่วนดังกล่าวเป็นเพียง linker ในโปรตีน VEGFR-2 แต่มี interaction ใน B-Raf เป็น π - π interaction ซึ่งการเปลี่ยนแปลงส่วนดังกล่าวสามารถนำวง heterocyclic ที่ยังคงส่วนของความเป็นวง aromatic ไว้มาแทนที่ในส่วนดังกล่าวได้ เพื่อเพิ่ม interaction กับกรดอะมิโนอื่น ๆ ในโปรตีนทั้งสองให้ดียิ่งขึ้น



ภาพที่ 12 ภาพแบบ 2 มิติ และ 3 มิติ ของโครงสร้างผลึกระหว่างยา sorafenib และโปรตีน VEGFR-2^{21, 23}



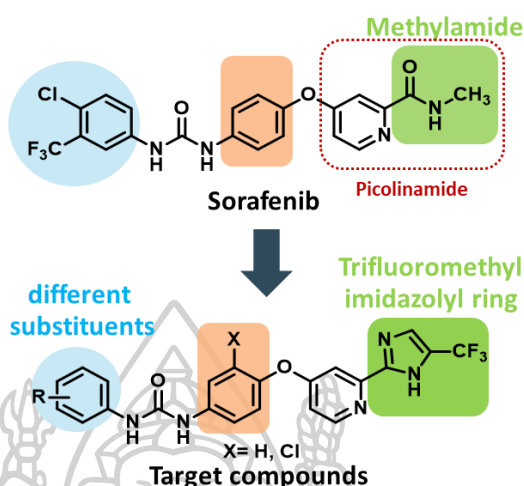
ภาพที่ 13 ภาพแบบ 2 มิติ และ 3 มิติ ของโครงสร้างผลึกระหว่างยา sorafenib และโปรตีน B-Raf²³,

24

2.4 งานวิจัยและเอกสารที่เกี่ยวข้องกับอนุพันธ์ sorafenib (sorafenib derivatives)

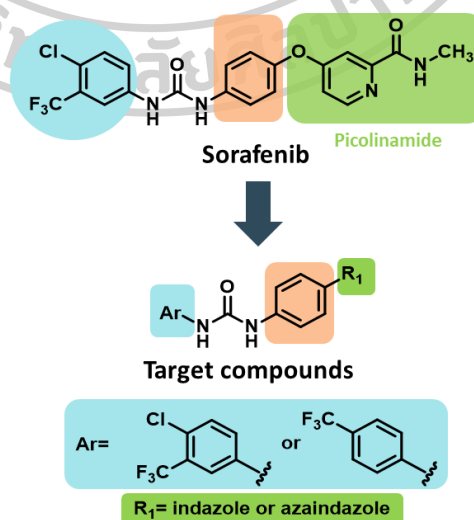
ในปี ค.ศ. 2012 Wenhui Zhan และคณะ²⁵ ได้ทำการออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib โดยมีการเปลี่ยนแปลงทั้งหมด 3 บริเวณ ซึ่งเปลี่ยนแปลงส่วน phenoxy ring โดยเพิ่มหมู่ halogen ลงบนวง aromatic นอกจากนั้นยังเปลี่ยนแปลงในส่วน picolinamide ring โดยแทนที่หมู่ methyl amide ด้วยวง trifluoromethyl imidazolyl และในส่วนสุดท้ายที่ทำการเปลี่ยนแปลง คือ ส่วน trifluoromethyl phenyl ring โดยเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันและตำแหน่งการแทนที่บนวง aromatic ดังแสดงในภาพที่ 14 จากนั้นนำโมเลกุลเลียนแบบที่สังเคราะห์ได้มาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231, BGC-823 และ SMMC-7721 และ c-Raf kinase พบว่าโมเลกุลเลียนแบบมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งน้อยกว่าโมเลกุล sorafenib ต้นแบบ แต่เมื่อยังคงส่วนของ trifluoromethyl phenyl ring ไว้ดั้งเดิม จะมีความสามารถในการยับยั้งที่เทียบเท่าหรือดีกว่า โดยโมเลกุลที่ยังคงอะตอมคลอรีนและหมู่ trifluoromethyl ไว้ในตำแหน่งเดิมหรือเปลี่ยนหมู่ trifluoromethyl เป็นอะตอมคลอรีน โดยคงตำแหน่งการแทนที่เดิมจะมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231 ได้ดีกว่ายา sorafenib 2-6 เท่า และดีกว่าในเซลล์มะเร็ง SMMC-7721 มากกว่ายา sorafenib 2 เท่า โดยที่ความสามารถในการยับยั้ง

เซลล์มะเร็ง BGC-823 เทียบเท่ากับยา sorafenib โดยจะเห็นได้ว่า trifluoromethyl phenyl ring และตำแหน่งในการแทนที่มีส่วนสำคัญในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อย่างชัดเจน



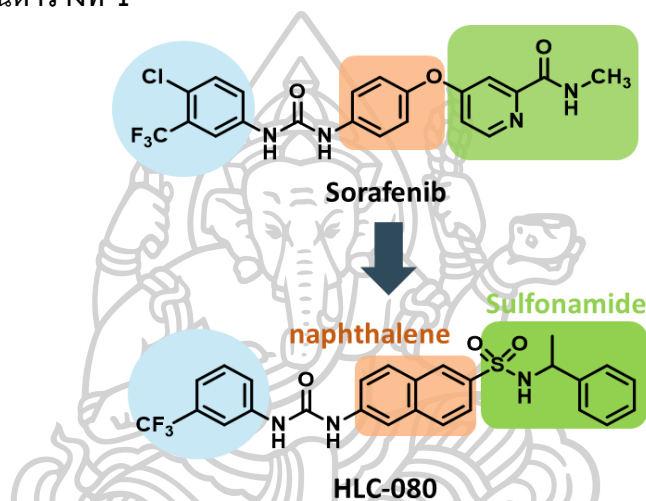
ภาพที่ 14 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของคุณ Wenhui Zhan และคณะ²⁵

ในปี ค.ศ. 2013 Cui-rong Zhao และคณะ²⁶ ได้ทำการออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib โดยเปลี่ยนแปลงส่วนของ picolinamide ring ในส่วนของ R₁ ซึ่งแทนที่ด้วย indazole และ azaindazole นอกจากนี้ยังทำการเปลี่ยนแปลงส่วนของ trifluoromethyl phenyl ในส่วนของ Ar เป็น *p*-trifluoromethylphenyl ring ดังแสดงในภาพที่ 15 จากนั้นนำโมเลกุลเลียนแบบที่สังเคราะห์ได้มาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง HepG2 และ Bel-7402 พบว่าโมเลกุลเลียนแบบมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งน้อยกว่าโมเลกุล sorafenib ต้นแบบ



ภาพที่ 15 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของคุณ Cui-rong Zhao และคณะ²⁶

ในปี ค.ศ. 2014 Ke Tang และคณะ²⁷ ได้ศึกษาโมเลกุลเลียนแบบ sorafenib HLC-080 ที่ทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ sorafenib สามส่วนโดยเฉพาะในส่วนของ phenoxy ring ที่นำวง naphthalene มาแทนที่ ส่วนใน trifluoromethyl phenyl ring ได้ทำการตัดอะตอมของคลอรีน ออก และเปลี่ยนแปลงส่วนของ picolinamide ring ไปเป็นส่วนหนึ่งของ sulfonamide ที่แตกต่างกันออกไป ดังแสดงในภาพที่ 16 พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิดที่ดีกว่าโมเลกุลยา sorafenib ต้นแบบหลายเท่า โดยเฉพาะในมะเร็งลำไส้ที่โมเลกุล HLC-080 มีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดีกว่า sorafenib 3-5 เท่า และมะเร็งตับที่โมเลกุล HLC-080 มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีกว่า sorafenib 2-4 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 1

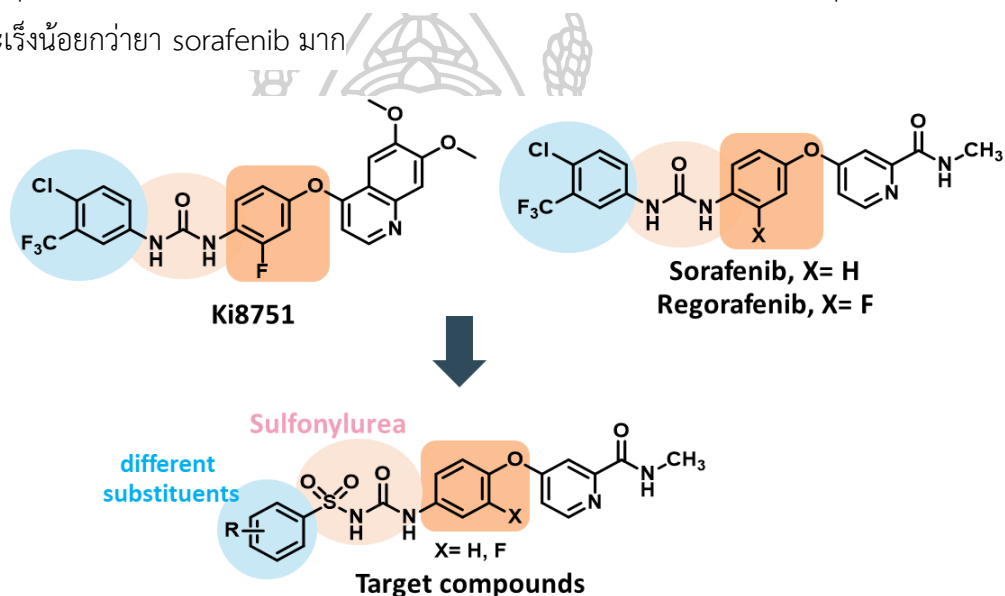


ภาพที่ 16 โครงสร้างโมเลกุลเลียนแบบ sorafenib HLC-080²⁷

Cell lines	Organs	IC ₅₀ (μM)	
		HLC-080	Sorafenib
U251	Brain	20.81±3.51	33.24±5.23
SH-SY5Y	Brain	45.36±5.24	32.70±5.81
MGC803	Stomach	15.68±3.95	20.83±4.18
BGC823	Stomach	26.94±4.75	37.26±5.41
Ketr3	Kidney	7.96±2.07	16.01±4.18
HT-29	Colon	1.83±0.35	9.37±1.18
HCT-8	Colon	5.53±1.29	18.27±3.52
HCT-116	Colon	5.66±0.96	12.93±2.89
HepG2	Liver	4.10±1.29	17.03±3.42
SMMC-7721	Liver	7.48±1.88	16.40±3.63
Bel7402	Liver	15.73±3.61	12.59±3.49
A549	Lung	27.64±4.77	29.60±4.61
A2780	Ovary	14.12±3.21	22.04±3.63
HELFL	Normal lung	23.77±2.11	25.53±2.51

ตารางที่ 1 การศึกษาโมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของคุณ Ke Tang และคณะ²⁷

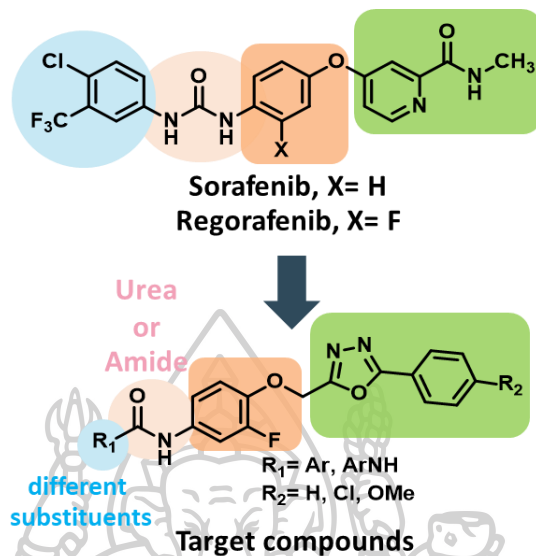
ในปี ค.ศ. 2015 Chunjiang Wu และคณะ²⁸ ได้ออกแบบโมเลกุลเพื่อใช้ต้านเซลล์มะเร็ง จากโมเลกุลยา sorafenib , โมเลกุลยา regorafenib และโมเลกุลยา Ki8751 ซึ่งยาทั้งสามโมเลกุลนี้ ออกฤทธิ์ในการยับยั้ง VEGFR-2, c-Kit, PDGFR α และ FGFR-2 โดยโมเลกุลที่ออกแบบใหม่ได้ทำการเปลี่ยนแปลงส่วนของ phenoxy ring ของ sorafenib โดยเติมอะตอมของ fluorine เข้าไปในตำแหน่ง *meta*-position กับ urea moiety ซึ่งต่างจากโมเลกุล regorafenib ที่เติมในตำแหน่ง *ortho*-position นอกจากนี้ยังเปลี่ยนแปลงชิ้นส่วน urea ไปเป็น sulfonylurea และเปลี่ยน trifluoromethyl phenyl ring เป็นวง aromatic ที่มีการเปลี่ยนแปลงหมู่แทนที่และตำแหน่งบนวง aromatic ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 17 จากนั้นนำโมเลกุลที่ออกแบบและสังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง A549, HeLa, MCF-7 และ PC-3 พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งน้อยกว่ายา sorafenib มาก



ภาพที่ 17 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของคุณ Chunjiang Wu และคณะ²⁸

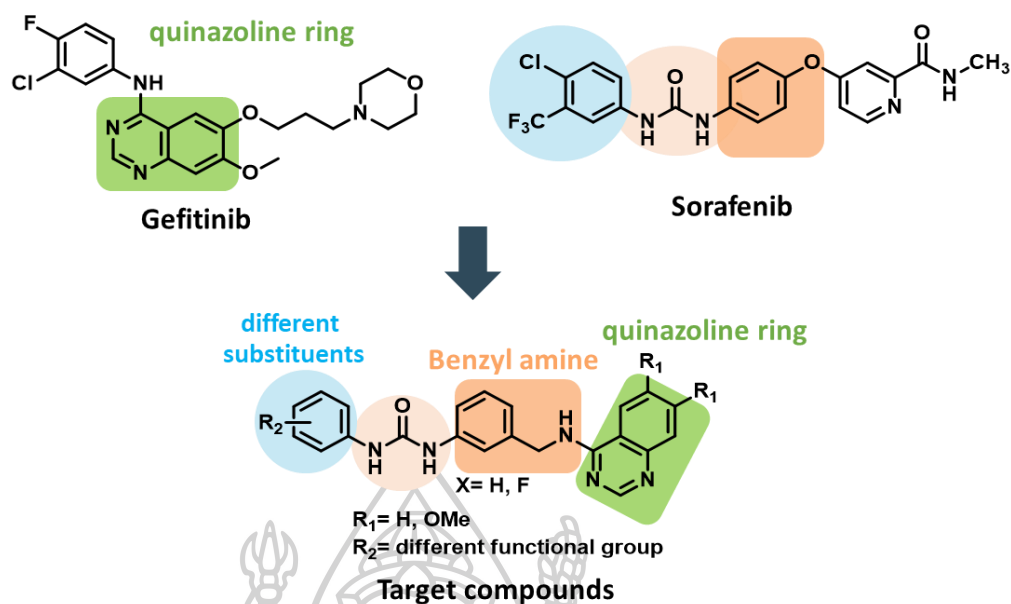
ในปี ค.ศ. 2015 คุณ Mahmoud M. และคณะ²⁹ ได้ทำการออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib จากโมเลกุล sorafenib และโมเลกุล regorafenib โดยเปลี่ยนแปลงส่วนของ phenoxy ring โดยเติม fluorine atom ที่ *meta*-position กับส่วนของ urea moiety และเปลี่ยนแปลงส่วนของ picolinamide ring เป็น 1,3,4-oxadiazole ที่เชื่อมต่อกับวง aromatic นอกจากนี้ยังเปลี่ยนแปลงส่วนของ trifluoromethyl phenyl ring ร่วมกับส่วน urea โดยมีที่ยังคง urea ไว้ดังเดิม และทำการเปลี่ยนแปลงเป็น amide ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงหมู่แทนที่และตำแหน่งบนวง aromatic ดังแสดงในภาพที่ 18 จากนั้นนำโมเลกุลเลียนแบบที่สังเคราะห์ได้มาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง HCT-116, ACHN, SNB-75, PC-3, HOP-92, MDA-MB-468, KM12, SK MEL และ OVCAR-3 พบว่าโมเลกุลเลียนแบบมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งน้อยกว่า

โมเลกุล sorafenib ต้นแบบ โดยเฉพาะโมเลกุลที่ทำการเปลี่ยนแปลงส่วน urea แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของหมู่ urea และวง trifluoromethyl



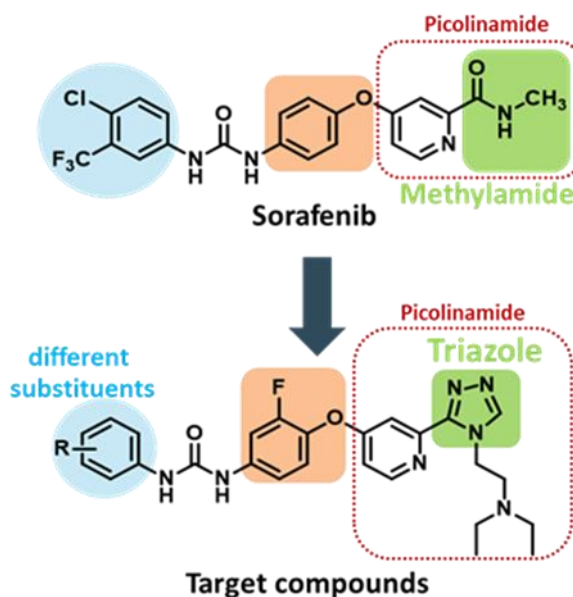
ภาพที่ 18 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของ Mahmoud M. และคณะ²⁹

ในปี ค.ศ. 2016 Chunjiang Wu และคณะ³⁰ ได้ออกแบบโมเลกุลเพื่อใช้ต้านเซลล์มะเร็งจากโมเลกุลยา sorafenib และโมเลกุล gefitinib โดยโมเลกุลที่ออกแบบใหม่ได้ทำการเปลี่ยนแปลงส่วนของ phenoxy ring ที่เป็น linker ของ sorafenib เป็น benzyl amine และเปลี่ยนแปลง picolinamide ring เป็น quinazoline ring ตามส่วนของเจทิทินิบ โดยทำการแทนที่หมู่ R_1 บริเวณดังกล่าวด้วยอะตอมไฮโดรเจนหรือกลุ่ม methoxy นอกจากนั้นยังเปลี่ยนแปลงส่วนของ trifluoromethyl phenyl ring เป็นหมู่แทนที่ในตำแหน่งต่าง ๆ ของวง aromatic ดังแสดงในภาพที่ 19 หลังจากนั้นนำโมเลกุลที่ออกแบบและสังเคราะห์ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง HepG2, MGC-803 และ A549 พบว่าโมเลกุลที่มีหมู่แทนที่ในตำแหน่ง R_1 เป็นอะตอมไฮโดรเจน และ R_2 เป็น *p*-tert-butyl, *p*-nitro และไฮโดรเจน มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งใกล้เคียงและดีกว่าในบางเซลล์เมื่อเทียบกับ sorafenib และ gefitinib ส่วนโมเลกุลที่มีหมู่แทนที่ในตำแหน่ง R_1 เป็นกลุ่ม methoxy และ R_2 เป็น *o*-methoxy, *p*-tert-butyl, *p*-nitro มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งใกล้เคียงและดีกว่าโมเลกุล sorafenib 2-3 เท่าในเซลล์มะเร็ง A549 เมื่อเทียบกับ sorafenib ซึ่งดีที่สุดเมื่อหมู่แทนที่ในตำแหน่ง R_1 *o*-methoxy และหมู่แทนที่ในตำแหน่ง R_2 ที่เป็น *p*-tert-butyl ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ดีกว่า sorafenib และ gefitinib ในทุกเซลล์ โดยดีกว่า sorafenib ประมาณ 1-2 เท่า และ gefitinib ประมาณ 2-4 เท่า



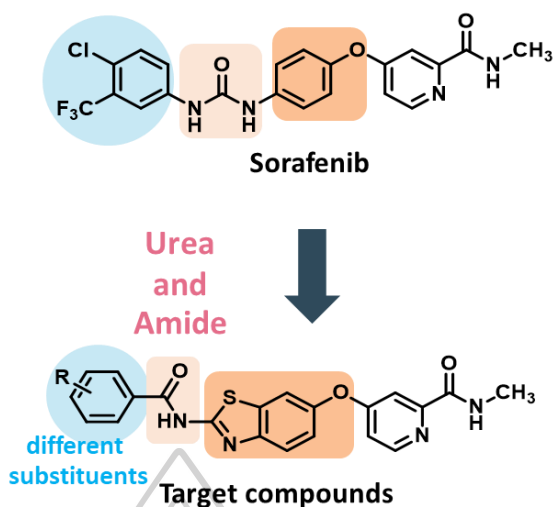
ภาพที่ 19 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของคุณ Chunjiang Wu และคณะ³⁰

ในปี ค.ศ. 2016 Mingze Q. และคณะ¹⁹ ได้ทำการออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib โดยเปลี่ยนแปลงส่วนของ phenoxy ring โดยเติม fluorine atom ที่ *meta*-position กับส่วนของ urea moiety และเปลี่ยนแปลงส่วนของ picolinamide ring เป็นวง pyridine ที่มีวง 1,2,4-triazole มาเชื่อมต่อที่ตำแหน่ง 2 ของ pyridine นอกจากนี้ยังเปลี่ยนแปลงส่วนของ trifluoromethyl phenyl ring ที่เปลี่ยนแปลงหมู่แทนที่และตำแหน่งบนวง aromatic ดังแสดงในภาพที่ 20 จากนั้นนำโมเลกุลเลียนแบบที่สังเคราะห์ได้มาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง HT-29, H460 และ MDA-MB-231 พบว่าโมเลกุลเลียนแบบมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งใกล้เคียงกับโมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ต้นแบบ โดยหากคงส่วนของ trifluoromethyl phenyl ring ไว้ดั้งเดิมจะทำให้โมเลกุลเลียนแบบมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าโมเลกุล sorafenib ต้นแบบประมาณ 2-4 เท่า



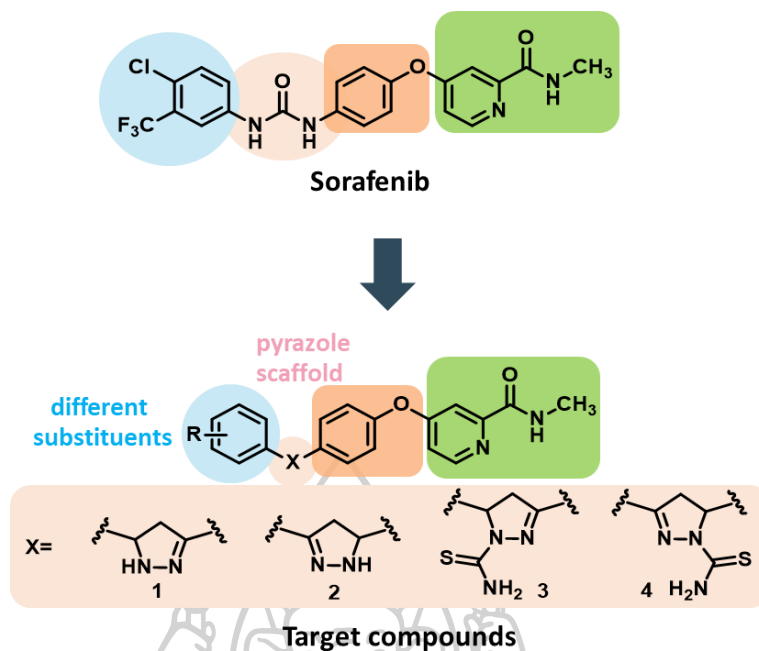
ภาพที่ 20 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของ Mingze Q. และคณะ¹⁹

ในปี ค.ศ. 2016 El-Damasy และคณะ³¹ ได้ออกแบบโมเลกุลและพัฒนานุพันธ์ของ sorafenib ซึ่งได้ทำการเปลี่ยนแปลงส่วน phenoxy ring โดยแทนที่ส่วนดังกล่าวด้วยวง benzo[d]thiazole และออกแบบโมเลกุลใหม่สองแบบ คือ แบบที่เปลี่ยนแปลงส่วน urea moiety เป็น amide และแบบที่ยังคงส่วนของ urea moiety ไว้ดั้งเดิม และเปลี่ยนแปลงหมู่แทนที่และตำแหน่งบนวง trifluoromethyl phenyl ring ดังแสดงในภาพที่ 21 หลังจากนั้นนำโมเลกุลที่ออกแบบและสังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง HCT-116 และ SK-BR-3 พบว่าโมเลกุลแบบที่เปลี่ยนแปลงส่วน urea moiety เป็น amide มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งใกล้เคียงยา sorafenib โดยเป็นส่วนที่ยังคงวง trifluoromethyl phenyl ring ไว้ดั้งเดิม และส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงหมู่แทนที่ที่เป็น 3,5-bis-trifluoromethylphenyl และ 3,5-bis-chlorophenyl ส่วนโมเลกุลแบบที่ยังคงส่วนของ urea moiety ไว้ดั้งเดิมจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ใกล้เคียงกับ sorafenib แต่ส่วนที่ยังคงส่วนของ urea moiety ไว้ดั้งเดิมจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าแบบที่เปลี่ยนแปลงส่วน urea moiety เป็น amide นอกจากนี้ยังทดสอบการยับยั้ง enzyme ใน B-Raf^{V600E} และ C-Raf kinase พบว่าโมเลกุลที่ออกแบบทั้งสองแบบที่มีหมู่แทนที่ที่เป็น 3,5-bis-trifluoromethylphenyl มีฤทธิ์ในการยับยั้งที่ใกล้เคียงกับ sorafenib มาก



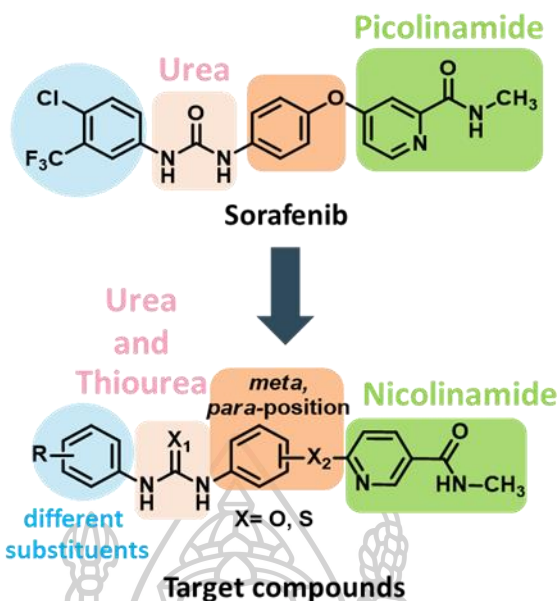
ภาพที่ 21 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของคุณ El-Damasy และคณะ³¹

ในปี ค.ศ. 2017 Min Wang และคณะ³² ได้ทำการออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib โดยยังคงส่วนของ phenoxy ring และ picolinamide ring แต่ได้ทำการเปลี่ยนแปลงโมเลกุล sorafenib ในส่วน urea moiety ไปเป็นโมเลกุล pyrazole ซึ่งได้ออกแบบมาทั้งหมด 4 แบบ และได้ทำการเปลี่ยนแปลงส่วนของ trifluoromethyl phenyl ring โดยเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันและตำแหน่งของการแทนที่บนวง aromatic ดังแสดงในภาพที่ 22 จากนั้นนำโมเลกุลเลียนแบบที่สังเคราะห์ได้มาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง A549, HepG2, MCF-7 และ PC-3 พบว่าโมเลกุลแบบที่มีหมู่แทนที่บนวง aromatic เป็น bromine ในตำแหน่ง *meta*-position โดยที่มี pyrazole scaffold เป็นแบบที่ 1 มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง A549, HepG2 และ MCF-7 ได้ดีกว่า sorafenib ต้นแบบ โดยมีค่า IC_{50} คือ $2.84 \pm 0.78 \mu\text{M}$, $1.85 \pm 0.03 \mu\text{M}$ และ $1.96 \pm 0.28 \mu\text{M}$ ตามลำดับ โดยที่ sorafenib มีค่า $2.92 \pm 0.68 \mu\text{M}$, $3.44 \pm 0.50 \mu\text{M}$ และ $3.18 \pm 0.18 \mu\text{M}$ ตามลำดับ



ภาพที่ 22 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของคุณ Min Wang และคณะ³²

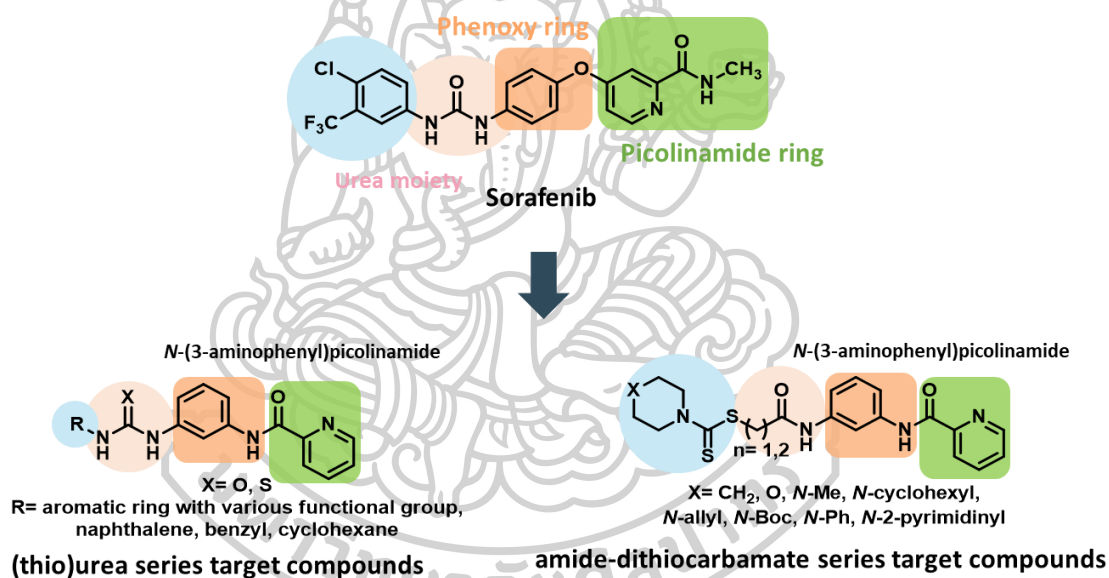
ในปี ค.ศ. 2018 Shaofeng Sun และคณะ³³ ได้ออกแบบโมเลกุลและพัฒนาอนุพันธ์ของ sorafenib โดยได้ทำการเปลี่ยนแปลงส่วน oxygen atom ของ phenoxy ring ในโมเลกุล sorafenib เป็น sulfur atom ซึ่งได้ออกแบบการแทนที่ของ sulfur atom สองแบบ คือ แทนที่ในตำแหน่ง *para*- และ *meta*-position กับ urea moiety ซึ่งได้มีการเปลี่ยนแปลง urea moiety เป็น thiourea นอกจากนั้นยังเปลี่ยนแปลงส่วนของ picolinamide ring เป็น nicotinamide ring และยังเปลี่ยนแปลงส่วนของ trifluoromethyl phenyl ring โดยเปลี่ยนแปลงหมู่แทนที่และตำแหน่งการแทนที่บนวง aromatic ดังแสดงในภาพที่ 23 หลังจากนั้นได้นำโมเลกุลที่ออกแบบและสังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งสองชนิด คือ HCT-116 และ B16BL6 พบว่าสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งสองชนิดได้ดีกว่า sorafenib ประมาณ 2 เท่า นอกจากนั้นผู้วิจัยได้นำโมเลกุลที่สังเคราะห์ได้ไปยับยั้ง multikinase enzyme ซึ่งประกอบไปด้วย B-Raf, B-Raf^{V600E} และ VEGFR-2 พบว่าสามารถยับยั้ง kinase enzyme ดังกล่าวได้ใกล้เคียงกับ sorafenib มาก โดยพบว่าโมเลกุลที่มีฤทธิ์ดีกว่า sorafenib เป็นโมเลกุลที่ยังคงส่วน trifluoromethyl phenyl ring ไว้ ส่วนการเปลี่ยนแปลงเป็นหมู่อื่นจะทำให้มีฤทธิ์การยับยั้งที่น้อยกว่าหรือค่อนข้างใกล้เคียงเท่านั้นทั้งในส่วนของ *para*- และ *meta*-position กับ urea moiety



ภาพที่ 23 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของ Shaofeng Sun และคณะ³³

ในปี ค.ศ. 2019 Mohamed A. Zeidan และคณะ²¹ ได้ออกแบบโมเลกุลและพัฒนานอนุพันธ์ของ sorafenib ซึ่งได้ทำการออกแบบโมเลกุลใหม่สองแบบ โดยแบบแรกเปลี่ยนแปลงส่วนของ phenoxy ring เป็น *N*-(3-aminophenyl)picolinamide และเปลี่ยนแปลงส่วนของ trifluoromethyl phenyl ring ที่มีหมู่แทนที่บนวง aromatic ที่แตกต่างกัน, วง naphthalene, benzyl และวง cyclohexane นอกจากนั้นยังได้เปลี่ยนแปลงในส่วนของ urea moiety เป็นสองแบบ คือแบบที่ยังคงส่วน urea ไว้ดั้งเดิม และแบบที่เปลี่ยนแปลงเป็น thiourea ส่วนแบบที่สองได้เปลี่ยนแปลงส่วนของ phenoxy ring เป็น *N*-(3-aminophenyl)picolinamide เช่นกัน แต่ทำการเปลี่ยนแปลง trifluoromethyl phenyl ring ร่วมกับส่วน urea เป็น amide dithiocarbamate ดังแสดงในภาพที่ 24 หลังจากนั้นนำโมเลกุลที่ออกแบบและสังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง A549 พบว่าโมเลกุลที่ออกแบบในแบบแรกที่มียังคง urea moiety ไว้ดั้งเดิมที่มีหมู่แทนที่บนวง aromatic เป็น *p*-NO₂, *p*-Me และการแทนที่วง trifluoromethyl phenyl ring ด้วย naphthalene มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า sorafenib โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งมากกว่า sorafenib 2, 38 และ 3 เท่า ตามลำดับ แต่ส่วนที่เปลี่ยนแปลงเป็น thiourea โมเลกุลที่มีหมู่แทนที่เป็น *p*-NO₂ จะมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า sorafenib เพียงหมู่เดียว โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งมากกว่า sorafenib 2 เท่า ส่วนโมเลกุลที่ออกแบบในแบบที่สองจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า sorafenib ในหลากหลายหมู่ฟังก์ชัน คือ แบบที่มี $n=1$ และมี $X = \text{CH}_2, \text{O}, N\text{-cyclohexyl}, N\text{-allyl}, N\text{-Boc}, N\text{-phenyl}$ และ $N\text{-2-pyrimidinyl}$ โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งมากกว่า sorafenib 2, 15, 2, 4, 4, 1 และ 19 เท่า ตามลำดับ และส่วนแบบที่มี $n=2$ และมี $X = N\text{-2-pyrimidinyl}$ ที่มีฤทธิ์

ในการยับยั้งได้ดีกว่า sorafenib โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งมากกว่า sorafenib 2 เท่า นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้นำโมเลกุลที่ออกแบบทั้งสองแบบไปทดสอบการยับยั้ง VEGFR-2 ในเซลล์มะเร็ง A549 พบว่าโมเลกุลที่ออกแบบในแบบแรกที่ยังคง urea moiety ไว้ดั้งเดิมที่มีหมู่แทนที่บนวง aromatic เป็น *p*-cyclohexyl มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า sorafenib โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งมากกว่า sorafenib 2 เท่า แต่ส่วนที่เปลี่ยนแปลงเป็น thiourea โมเลกุลที่มีหมู่แทนที่เป็น hydrogen จะมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า sorafenib ส่วนโมเลกุลที่ออกแบบในแบบที่สองจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีมากกว่า sorafenib ในหลากหลายหมู่ฟังก์ชัน คือ แบบที่มี $n=1$ และมี $X=CH_2$, *N*-Boc และ *N*-phenyl โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งมากกว่า sorafenib 7, 2 และ 2 เท่า ตามลำดับ และส่วนแบบที่มี $n=2$ และมี $X=N$ -phenyl ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดีกว่า sorafenib โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งมากกว่า sorafenib 2 เท่า



ภาพที่ 24 โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ของคุณ Mohamed A. Zeidan และคณะ²¹

จากการศึกษาอนุพันธ์ของ sorafenib ในงานวิจัยที่ได้มีรายงานไว้หลายฉบับ มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ sorafenib หลากหลาย และพบว่าอนุพันธ์เหล่านั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด จากการสังเกตพบว่าการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลยา sorafenib ที่มี phenoxy ring ที่เป็นแกนกลางของโมเลกุลของยา sorafenib และ picolinamide ring นั้น ยังคงรักษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายชนิดได้ และในหลายกรณีโมเลกุลเลียนแบบมีฤทธิ์ดีกว่า sorafenib ต้นแบบ ต่างจากการเปลี่ยนแปลงส่วนของ trifluoromethyl phenyl ring และ urea moiety ที่มีการเปลี่ยนแปลงแล้วทำให้มีการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ดีและไม่ดีซึ่งไม่แน่นอน จึงควรคงส่วน trifluoromethyl phenyl ring และ urea moiety ไว้ แต่ส่วนของ

phenoxy ring ที่เป็นแกนกลางและ picolinamide ring ของ sorafenib เป็นส่วนที่สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง เพื่อหวังให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้นและหลากหลายชนิดขึ้นได้ต่อไป



บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การออกแบบโครงสร้างของอนุพันธ์ sorafenib

จากการศึกษาการเกิด interaction จาก X-ray crystallography ของยา sorafenib ในโปรตีน VEGFR-2 และโปรตีน B-Raf^{21, 23, 24} พบว่าทุกส่วนในโมเลกุลยา sorafenib นั้นมีความสำคัญต่อการเกิด interaction โดยโครงสร้างของโมเลกุลยา sorafenib สามารถแบ่งเป็น 4 ส่วน ได้แก่ trifluoromethyl phenyl ring, urea moiety, phenoxy ring และ picolinamide ring ดังแสดงในภาพที่ 10 โดยแนวคิดในการออกแบบอนุพันธ์ sorafenib ผู้วิจัยได้ทำการคงส่วน trifluoromethyl phenyl ring ไว้ดั้งเดิม ซึ่งเป็นส่วน allosteric pocket โดยเป็นส่วนที่ถูกล้อมรอบด้วยกรดอะมิโนที่เป็น hydrophobic และเป็นส่วนที่ไม่ควรเปลี่ยนแปลง เนื่องจาก trifluoromethyl phenyl ring มีความเป็น lipophilicity ที่ดีอยู่แล้วจากการแทนที่ด้วยอะตอม chlorine และ trifluoromethyl บนวงแหวนเบนซีน ซึ่งจะช่วยให้การผ่านเข้าออกของยาในกระบวนการ metabolism ได้³⁴ นอกจากนี้ยังสามารถเกิด interaction กับ Asp593 ได้ ซึ่งจากงานวิจัยที่มีรายงานไว้ถึงการเปลี่ยนแปลงส่วน trifluoromethyl phenyl ring พบว่าทำให้โมเลกุลเลียนแบบยา sorafenib มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ^{25, 29} ซึ่งจากงานวิจัยที่ได้รายงานไว้พบว่านักวิจัยได้ให้ความสำคัญกับการคงส่วนนี้ไว้ เนื่องจากจะทำให้มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับยา sorafenib จึงเป็นชิ้นส่วนสำคัญที่ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ส่วน urea moiety เป็นส่วนที่สามารถเกิด H-bond interaction กับน้ำและกรดอะมิโนที่มีขั้วในโปรตีนได้ คือ Glu885, Asp1046 และ Cys1045 ในโปรตีน VEGFR-2 และ Asp593 ในโปรตีน B-Raf งานวิจัยส่วนใหญ่แสดงให้เห็นว่าการมีหมู่ urea ในโมเลกุลจะช่วยให้โมเลกุลเลียนแบบมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิดได้ดี^{27, 30, 31} นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การเปลี่ยนแปลงส่วน urea moiety ทำให้โมเลกุลเลียนแบบมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งต่ำลง^{28, 29, 31} จึงไม่ควรเปลี่ยนแปลงส่วนโมเลกุลส่วนนี้

ส่วน phenoxy ring ที่เป็นแกนกลางของโมเลกุลยา sorafenib เป็นส่วนที่สามารถเกิด π - π stacking และ hydrophobic interaction กับ Phe594 และ Leu 513 ในโปรตีน B-Raf เพียงชนิดเดียว ส่วนในโปรตีน VEGFR-2 phenoxy ring เป็นเพียง linker เท่านั้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าส่วนดังกล่าวนี้มี interaction กับโปรตีน VEGFR-2 น้อย จึงง่ายต่อการเปลี่ยนเป็นวงหรือหมู่อื่น ๆ ที่

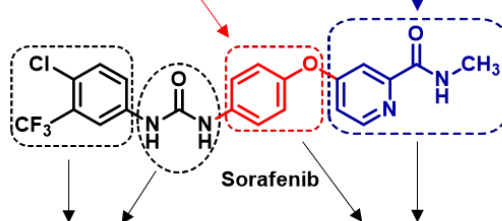
สามารถสร้าง π - π stacking interaction เพื่อหาวงที่สามารถเกิด interaction ที่มากกว่าวง phenoxy ซึ่งหากทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของความเป็นวงแหวนเบนซีนไว้เพื่อเกิด π - π stacking และ hydrophobic interaction กับ Phe594 และ Leu 513 ในโปรตีน B-Raf โดยอาจทำการเปลี่ยนแปลงเป็นกลุ่ม heteroaromatic ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น วง triazole³⁵ เป็นต้น เพื่อส่งเสริมให้โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีมากยิ่งขึ้น โดยจากงานวิจัยที่มีรายงานไว้ถึงการเปลี่ยนแปลงส่วน phenoxy ring ที่เป็นแกนกลางของโมเลกุลยา sorafenib พบว่าการเปลี่ยนแปลงส่วนดังกล่าว เช่น เปลี่ยนแปลงเป็น naphthalene ring, benzylamine, เปลี่ยนตำแหน่งการแทนที่ของ phenoxy ring จาก *para*- เป็น *meta*-, heteroaromatic ring และ *N*-(3-aminophenyl)picolinamide เป็นต้น จะทำให้โมเลกุลเลียนแบบยา sorafenib มีฤทธิ์ที่ดีขึ้น^{21, 27, 30, 31, 33} จึงเป็นส่วนที่สามารถทำการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลยา sorafenib แล้วอาจส่งผลให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีขึ้น

ส่วน picolinamide ring เป็นส่วนที่สามารถเกิด H-bond interaction กับน้ำและกรดอะมิโนที่มีขั้วในโปรตีนได้ คือ Cys919 ในโปรตีน VEGFR-2 และ Cys531 ในโปรตีน B-Raf นอกจากนั้นยังสามารถเกิด π - π interaction กับ Trp530 ในโปรตีน B-Raf ได้ ซึ่งในส่วนนี้เป็นส่วนที่สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นวงแหวนเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ที่แตกต่างได้ เนื่องจากยังสามารถเกิด π - π interaction กับ Trp530 ในโปรตีน B-Raf ได้ โดยจากงานวิจัยที่มีรายงานไว้ถึงการเปลี่ยนแปลงส่วน picolinamide ring พบว่าการเปลี่ยนแปลงส่วนดังกล่าว เช่น เปลี่ยนแปลงเป็น sulfonamide, quinazoline ring และ nicotinamide ring เป็นต้น จะทำให้โมเลกุลเลียนแบบยา sorafenib มีฤทธิ์ที่ดีขึ้น^{27, 30, 33} แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างในส่วนนี้มีความยืดหยุ่นสูง สามารถเปลี่ยนเป็นส่วนหรือลักษณะโมเลกุลได้หลากหลาย จึงเป็นส่วนที่สามารถทำการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลยา sorafenib แล้วอาจส่งผลให้ยังคงรักษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเซลล์มะเร็งได้และอาจมีฤทธิ์ที่ดีขึ้น (เราจึงมีแนวความคิดจะใส่ substituted phenyl ring ซึ่งหมู่ดังกล่าวน่าจะเหมาะสมเนื่องจากสามารถสร้าง π - π interaction ได้และหมู่แทนที่จะสามารถสร้าง H-bond ได้)

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงทำการออกแบบโมเลกุลอนุพันธ์ของ sorafenib โดยคงส่วนของ trifluoromethyl phenyl ring และส่วน urea moiety ไว้ดั้งเดิม เนื่องจากเป็นส่วนที่สำคัญต่อการออกฤทธิ์ของโมเลกุลยา sorafenib ดังที่ได้กล่าวไปข้างต้น แต่ได้ทำการเปลี่ยนแปลงส่วน phenoxy ring ที่เป็นแกนกลางของโมเลกุลยา sorafenib และส่วน picolinamide ring ร่วมกัน โดยแทนที่ด้วยวง 1,2,3-triazole ที่เป็น heteroaromatic เนื่องจากยังคงส่วนของวงแหวนเบนซีนไว้เพื่อเกิด π - π stacking กับ Phe594 และ Leu513 และเกิด interaction อื่น ๆ ในโปรตีน B-Raf ได้ นอกจากนั้น

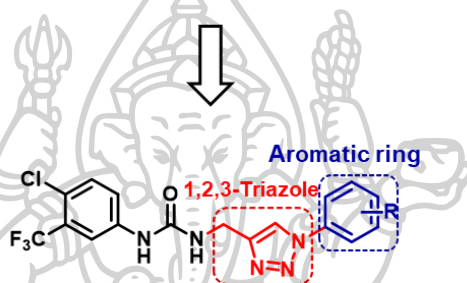
Phenoxy ring สามารถเปลี่ยนเป็น heteroarene ring เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง [16],[18],[19],[20],[21]

Picolinamide ring สามารถเปลี่ยนเป็น aromatic ring โดยศึกษาผลของ functional group และผลของการแทนที่ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน [16],[18],[19]



การเปลี่ยนแปลง trifluoromethyl phenyl ring และชิ้นส่วน urea จะทำให้โมเลกุลมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลดลง ดังนั้นควรคงส่วนนี้ไว้ดั้งเดิม [17],[20],[22],[24]

การเปลี่ยนแปลง phenoxy ring และ picolinamide ring สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีมากยิ่งขึ้น ดังนั้นจึงสามารถเปลี่ยนแปลงสองส่วนนี้ได้

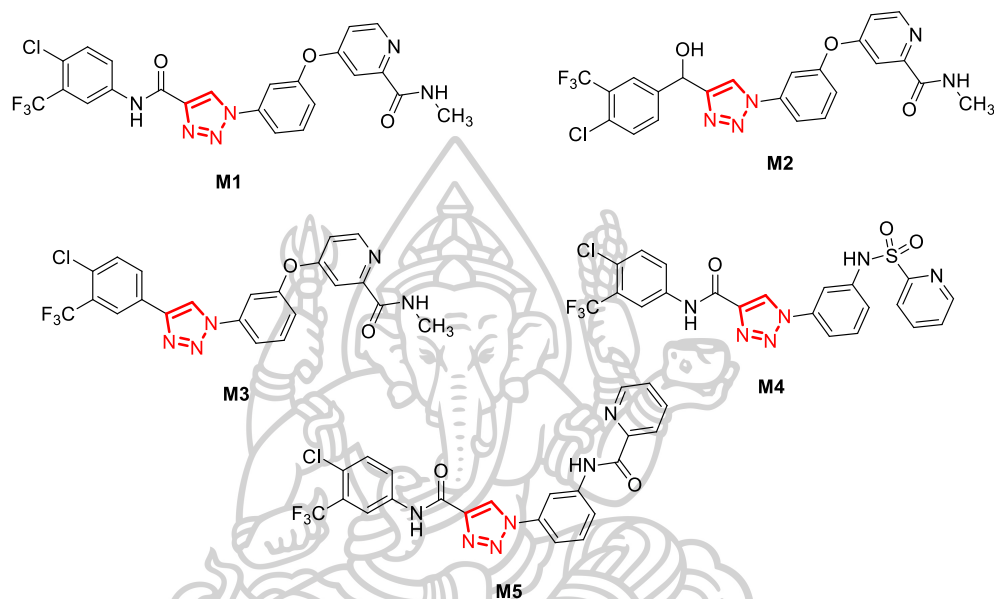


โมเลกุลเลียนแบบ Sorafenib

ภาพที่ 25 แนวคิดในการออกแบบโมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ที่มีไตรเอโซลเป็นแกนกลางของผู้วิจัย

วง 1,2,3-triazole มี heteroatom เป็น nitrogen atom ถึง 3 atom ที่ช่วยในการเกิด hydrogen bond ได้ ส่งผลให้คุณสมบัติการละลายน้ำดีขึ้น และยังมีข้อดีอีกหลายประการ คือ โมเลกุลมีลักษณะคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนฮิสทีดีน (Histidine) ทำให้ยาไม่ถูกทำลายง่าย นอกจากนั้นยังเสถียรต่อกระบวนการทำงานในร่างกาย โดยชิ้นส่วน 1,2,3-triazole เป็นที่นิยมในการนำมาเชื่อมโมเลกุลเข้าด้วยกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของฤทธิ์ทางชีวภาพ³⁵ ทำให้ผู้วิจัยสนใจนำชิ้นส่วนวง 1,2,3-triazole มาแทนที่ในส่วนของ phenoxy ring ซึ่งเป็นเพียง linker ในโปรตีน VEGFR-2 ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นวงอื่น ๆ เพื่อส่งเสริมและพัฒนาคุณสมบัติทางยาของโมเลกุล sorafenib ให้ดียิ่งขึ้น และในส่วนของ การเปลี่ยนแปลงส่วน picolinamide ring ได้ทำการเปลี่ยนแปลงโดยแทนที่ส่วนดังกล่าวด้วยวงแหวนเบนซีน ซึ่งจะทำให้ยังคงส่วนของ aromatic ไว้เพื่อเกิด π - π interaction กับ Try530 ในโปรตีน B-Raf ได้ และทำการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันบนวงแหวนเบนซีนเป็น electron withdrawing group, electron donating group, polar, non-polar, H-bond donor และ H-bond acceptor ในตำแหน่งที่ต่างกัน เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการออกฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ดังแสดงในภาพที่ 25 นอกจากนั้นผู้วิจัยยังทำการออกแบบโมเลกุลของอนุพันธ์โซราเฟนิบใหม่ที่มีวง 1,2,3-triazole เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล ดังแสดงในภาพที่ 26 โดยทำการศึกษาค่า binding interaction เพื่อเป็นแนวทางในการออกแบบและพัฒนาโมเลกุลโซราเฟนิบที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโปรตีน B-Raf และ VEGFR-2 ที่ดีขึ้นไปในอนาคต โดยค่า binding interaction แสดงในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ



ภาพที่ 26 อนุพันธ์โซราเฟนิบที่มีวง 1,2,3-triazole เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล M1-M5

ตารางที่ 2 ตารางสรุปค่า binding energy, Van der Waals, hydrogen bond, amino acid interactions และ hydrogen bond length ของอนุพันธ์โซราเฟนิบที่มีวง 1,2,3-triazole เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล M1-M5 ในโปรตีน B-Raf โดยเปรียบเทียบกับโมเลกุลโซราเฟนิบต้นแบบ

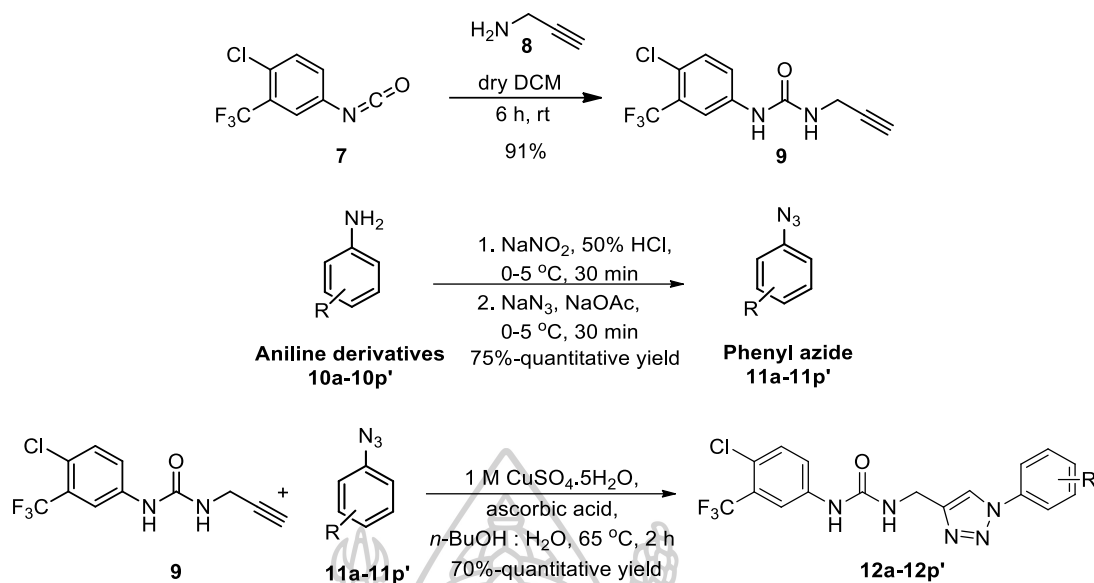
Compounds	Binding energy (kcal/mol)	VDW	H-Bond	Amino acid residue	H-bond length (Å)
M1	-148.51	-133.02	-15.49	LYS482, TRP530	2.90, 2.47
M2	-126.19	-106.36	-19.84	LYS482, GLU500	2.84, 1.88
M3	-141.43	-137.93	-3.50	CYS531, GLY592	2.39, 2.29
M4	-135.97	-129.47	-6.50	ASP593, GLU500, GLY592	2.13, 2.82, 2.68
M5	-138.59	-122.68	-15.91	CYS531, LYS482	1.91, 2.71
Sorafenib	-176.75	-161.70	-15.05	ASP593, GLU500, GLY592	1.88, 1.97, 2.27

ตารางที่ 3 ตารางสรุปค่า binding energy, Van der Waals, hydrogen bond, amino acid interactions และ hydrogen bond length ของอนุพันธ์โซราเฟนิบที่มีวง 1,2,3-triazole เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล M1-M5 ในโปรตีน VEGFR-2 โดยเปรียบเทียบกับโมเลกุลโซราเฟนิบต้นแบบ

Compounds	Binding			Amino acid residue	H-bond length (Å)
	energy (kcal/mol)	VDW	H-Bond		
M1	-116.48	-102.81	-13.67	CYS919, LYS868, PHE1047	2.16, 2.74, 2.23
M2	-125.01	-108.75	-16.26	ASP1046, LYS868, PHE1047	2.84, 3.10, 2.56
M3	-117.20	-117.20	-	ASP1046, HIS1026	2.17, 2.64
M4	-120.49	-103.30	-17.19	LYS868, PHE918	2.71, 2.26
M5	-127.00	-113.28	-13.72	CYS919, LYS868, PHE918	2.33, 2.75, 2.25
Sorafenib	-127.30	-114.75	-12.55	ASP1046, CYS919, CYS1045, GLU885	1.36, 2.22, 2.84, 1.79

3.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ sorafenib ที่มีวง 1,2,3-triazole เป็นแกนกลางแทนวง phenoxy 12a-12p'

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ sorafenib ที่ผู้วิจัยออกแบบ 12a-12p' ผู้วิจัยเริ่มจากการสังเคราะห์ ureido alkyne 9 จาก isocyanate 7 และ propargyl amine (8) ผ่านปฏิกิริยา Nucleophilic addition โดยทำปฏิกิริยาในตัวทำละลาย dichloromethane ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ได้ ureido alkyne 9 91% จากนั้นทำการสังเคราะห์ Phenyl azide 11a-11p' จากอนุพันธ์ของ aniline 10a-10p' ผ่านปฏิกิริยา Diazotization โดยทำปฏิกิริยาในสารละลาย 50% HCl ที่อุณหภูมิ 0-5 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้ substituted phenyl azide 11a-11p' ตั้งแต่ 75%-quantitative yield ต่อมาได้ทำการสร้างส่วนของวง 1,2,3-triazole ขึ้น โดยนำ ureido alkyne 9 และ Phenyl azide 11a-11p' มาทำปฏิกิริยา 1,3-dipolar cycloaddition (click reaction) ในตัวทำละลายผสมระหว่าง n-butanol และน้ำ ในอัตราส่วน 1:1 ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยมี ascorbic acid เป็น reducing agent และ copper(II)sulfate pentahydrate เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้โมเลกุลเป้าหมายที่ต้องการ 12a-12p' ตั้งแต่ 70%-quantitative yield ดังแสดงในภาพที่ 27 และ ตารางที่ 4



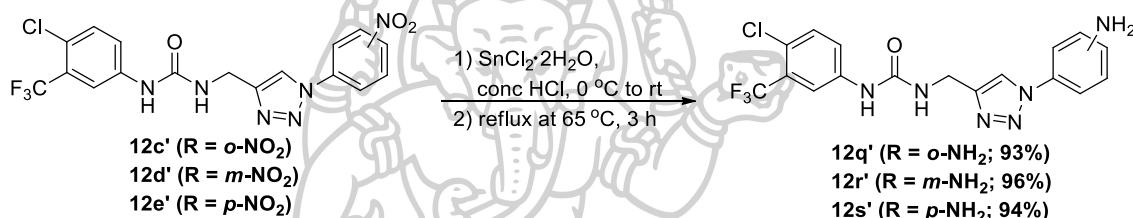
ภาพที่ 27 เส้นทางการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบ sorafenib ที่มีไตรเอโซลเป็นแกนกลาง

ตารางที่ 4 แสดง functional group ที่แตกต่างกัน (R) และร้อยละผลผลิต (%yield) ของ phenyl azide **11a-11p'** และ target molecules **12a-12p'**

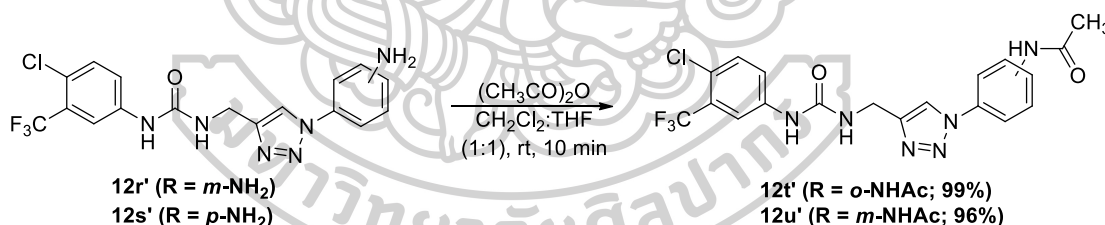
R	Phenyl azide 11		Target molecules 12		
	anilines	compounds	yield	compounds	yield
H	10a	11a	quant.	12a	98%
<i>o</i> -F	10b	11b	99%	12b	78%
<i>m</i> -F	10c	11c	96%	12c	92%
<i>p</i> -F	10d	11d	99%	12d	80%
<i>o</i> -Cl	10e	11e	95%	12e	91%
<i>m</i> -Cl	10f	11f	95%	12f	86%
<i>p</i> -Cl	10g	11g	99%	12g	99%
<i>o</i> -Br	10h	11h	quant.	12h	90%
<i>m</i> -Br	10i	11i	quant.	12i	quant.
<i>p</i> -Br	10j	11j	quant.	12j	87%
<i>o</i> -I	10k	11k	96%	12k	70%
<i>m</i> -I	10l	11l	99%	12l	92%
<i>p</i> -I	10m	11m	99%	12m	89%

<i>o</i> -OH	10n	11n	quant.	12n	99%
<i>m</i> -OH	10o	11o	quant.	12o	99%
<i>p</i> -OH	10p	11p	quant.	12p	85%
<i>o</i> -OMe	10q	11q	99%	12q	88%
<i>m</i> -OMe	10r	11r	99%	12r	96%
<i>p</i> -OMe	10s	11s	98%	12s	89%
<i>o</i> -Me	10t	11t	quant.	12t	82%
<i>m</i> -Me	10u	11u	quant.	12u	89%
<i>p</i> -Me	10v	11v	quant.	12v	90%
<i>o</i> -CF ₃	10w	11w	quant.	12w	99%
<i>m</i> -CF ₃	10x	11x	quant.	12x	98%
<i>p</i> -CF ₃	10y	11y	quant.	12y	98%
<i>o</i> -CN	10z	11z	quant.	12z	95%
<i>m</i> -CN	10a'	11a'	95%	12a'	97%
<i>p</i> -CN	10b'	11b'	99%	12b'	97%
<i>o</i> -NO ₂	10c'	11c'	99%	12c'	89%
<i>m</i> -NO ₂	10d'	11d'	99%	12d'	95%
<i>p</i> -NO ₂	10e'	11e'	quant.	12e'	92%
<i>o</i> -Ethyl	10f'	11f'	80%	12f'	94%
<i>m</i> -Ethyl	10g'	11g'	98%	12g'	98%
<i>p</i> -Ethyl	10h'	11h'	quant.	12h'	quant.
<i>o</i> -isopropyl	10i'	11i'	75%	12i'	79%
<i>m</i> -isopropyl	10j'	11j'	92%	12j'	88%
<i>p</i> -isopropyl	10k'	11k'	quant.	12k'	93%
<i>m</i> -tert-Butyl	10l'	11l'	96%	12l'	85%
<i>p</i> -tert-Butyl	10m'	11m'	99%	12m'	87%
<i>m</i> -CO ₂ H	10n'	11n'	99%	12n'	90%
<i>p</i> -CO ₂ H	10o'	11o'	quant.	12o'	94%
<i>p</i> -NHAc	10p'	11p'	99%	12p'	99%

หลังจากนั้นผู้วิจัยได้สังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมาย **12q'** (R = *o*-NH₂), **12r'** (R = *m*-NH₂) และ **12s'** (R = *p*-NH₂) จากโมเลกุล **12c'**, **12d'** และ **12e'** (R = NO₂) ตามลำดับ ผ่านปฏิกิริยารีดักชันของหมู่ฟังก์ชันไนโตรซึ่งใช้ tin (II) chloride dihydrate เป็น reducing agent ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นที่อุณหภูมิ 0 °C ถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 65 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้โมเลกุลเป้าหมาย **12q'**, **12r'** และ **12s'** (R = NH₂) ด้วยผลผลิต 93%, 96% และ 94% ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 28 จากนั้นผู้วิจัยได้สังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมาย **12t'** และ **12u'** (R = NHAc) จาก **12q'** และ **12r'** (R = NH₂) ผ่านปฏิกิริยานิวคลีโอฟิลิกซับสติติวชันด้วย acetic anhydride ในตัวทำละลายผสมระหว่าง dichloromethane และ tetrahydrofuran ในอัตราส่วน 1:1 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จะได้โมเลกุลเป้าหมาย **12t'** และ **12u'** 99% และ 96% ดังแสดงในภาพที่ 29

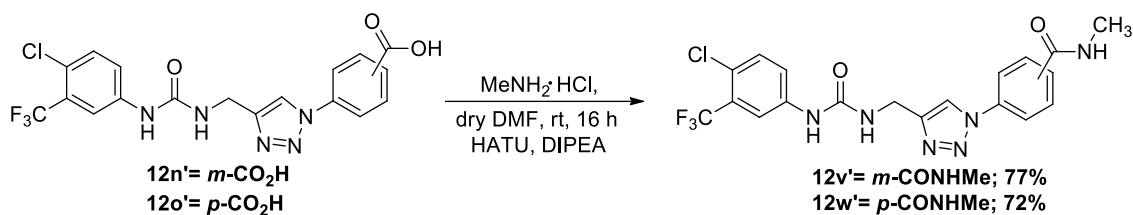


ภาพที่ 28 แสดงการสังเคราะห์และร้อยละผลผลิตของโมเลกุลเป้าหมาย **12q'**-**12s'**



ภาพที่ 29 แสดงการสังเคราะห์และร้อยละผลผลิตของโมเลกุลเป้าหมาย **12t'** และ **12u'**

ในการสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมาย **12v'** และ **12w'** (R = CONHMe) สามารถสังเคราะห์ได้จาก **12n'** และ **12o'** (R = COOH) โดยทำปฏิกิริยากับ methylamine hydrochloride ที่มี Hexafluorophosphate Azabenzotriazole Tetramethyl Uronium (HATU) เป็น amide coupling reagent และ *N,N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) เป็นเบส ในตัวทำละลาย *N,N*-dimethylformamide (DMF) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะได้โมเลกุลเป้าหมาย **12v'** และ **12w'** (R = CONHMe) ด้วยผลผลิต 77% และ 72% ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 30



ภาพที่ 30 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์และร้อยละผลผลิตของโมเลกุลเป้าหมาย $12v'$ และ $12w'$

3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activities) และการศึกษาความสัมพันธ์ของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพเชิงโครงสร้าง (Structure-Activity Relationships, SARs) ของอนุพันธ์ sorafenib

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์อนุพันธ์ sorafenib $12a-12w'$ หลังจากนั้นผู้วิจัยได้นำโมเลกุลเป้าหมายทั้ง 49 โมเลกุล (ในจำนวนนี้เป็นโมเลกุลที่สังเคราะห์เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาเบื้องต้นในระดับปริญญาตรีทั้งหมด 13 โมเลกุล)³⁶ ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ด้วยเทคนิค 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (MTT assay) หรือเทคนิค sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate (XTT assay) ในเบื้องต้น จะทำการทดสอบแบบ screening ของสารสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 25 μM ในเซลล์มะเร็งตับ HepG2 หากมีร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์ (%cell viability) น้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 55 จะนำมาหาค่าความเข้มข้นในการยับยั้งร้อยละ 50 หรือ IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) ต่อไป นอกจากนี้ยังได้นำสารที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด A549, เซลล์มะเร็งถุงน้ำดี HuCCA-1, เซลล์มะเร็งเม็ดเลือด MOLT-3 และ HL-60 และเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D และ MDA-MB-231 โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งจะแสดงด้วยค่า IC_{50} และเทียบกับ sorafenib และ doxorubicin (positive control) ดังแสดงดังแสดงในตารางที่ 5

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 พบว่าโมเลกุลเป้าหมาย 7 โมเลกุล ได้แก่ $12e$ ($R = o\text{-Cl}$), $12f$ ($R = m\text{-Cl}$), $12y$ ($R = p\text{-CF}_3$), $12i'$ ($R = o\text{-isopropyl}$), $12k'$ ($R = p\text{-isopropyl}$), $12l'$ ($R = m\text{-}t\text{-Bu}$) และ $12m'$ ($R = p\text{-}t\text{-Bu}$) มีร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ต่ำกว่าร้อยละ 55 และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.02 ± 2.07 , 9.81 ± 5.02 , 5.97 ± 2.14 , 5.40 ± 0.35 , 20.95 ± 4.17 และ 5.57 ± 0.91 μM ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าโมเลกุลเป้าหมายหลายโมเลกุล ได้แก่ $12e$ ($R = o\text{-Cl}$), $12y$ ($R = p\text{-CF}_3$), $12i'$ ($R = o\text{-isopropyl}$) และ $12m'$ ($R = p\text{-}t\text{-Bu}$) มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ได้ดีเทียบเท่ากับโมเลกุลยา sorafenib ต้นแบบ (sorafenib มีค่า IC_{50} คือ

5.97±0.71 μM) แต่ยังมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ที่น้อยกว่ายา doxorubicin ประมาณ 10 เท่า (doxorubicin มีค่า IC_{50} คือ 0.59±0.10 μM) ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพ (Structure-Activity Relationships (SARs)) จากผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ของอนุพันธ์ sorafenib ที่แสดงในตารางที่ 5 พบว่าอนุพันธ์ sorafenib ที่ไม่มีหมู่แทนที่บนวงเบนซีน ($\text{R} = \text{H}$) แทบจะไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 เลย แต่เมื่อใส่หมู่แทนที่ให้อนุพันธ์หลายโมเลกุลมีฤทธิ์ยับยั้งสูงขึ้น โดยโมเลกุลเป้าหมายที่มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด ประกอบไปด้วยโมเลกุล **12e** ($\text{R} = o\text{-Cl}$), **12y** ($\text{R} = p\text{-CF}_3$), **12i'** ($\text{R} = o\text{-isopropyl}$) และ **12m'** ($\text{R} = p\text{-t-Bu}$) ซึ่งมีฤทธิ์เทียบเท่ากับโมเลกุลยา sorafenib ต้นแบบ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการแทนที่ของหมู่ฟังก์ชันในตำแหน่ง *ortho*- และ *para*- จะทำให้มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ได้ดีกว่าในตำแหน่ง *meta*- อย่างชัดเจน โดยหากเปรียบเทียบชนิดหมู่ฟังก์ชันจะพบว่าในกลุ่มของหมู่ halogen พบว่าอนุพันธ์ที่มีอะตอมคลอรีนเป็นหมู่แทนที่ที่มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด นอกจากนั้นยังพบว่ากลุ่ม alkyl และ trifluoromethyl มีความสามารถในการยับยั้งที่ดีเช่นกัน โดยพบว่าในกลุ่ม alkyl จะมีร้อยละของการเจริญเติบโต (%Cell viability) ลดลงเมื่อเป็นหมู่ methyl, ethyl, isopropyl และ *tert*-butyl ตามลำดับ ซึ่งการเพิ่มขนาดของหมู่ alkyl ที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic) เข้าไปบนวง aromatic จะทำให้อนุพันธ์ sorafenib มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ได้ดีมากยิ่งขึ้น โดยผลการทดลองสอดคล้องกับผลการทำ molecular docking อีกด้วย พบว่าส่วนของวง aromatic ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่แตกต่างกันจะเข้าเกิด interaction ในส่วนที่เป็นวง phenoxy ของโมเลกุลยา sorafenib ซึ่งเป็นส่วนของ hydrophobic pocket จึงทำให้อนุพันธ์ sorafenib มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ที่ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อบนวง aromatic มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่ที่มีขั้ว (hydrophilic) หรือหมู่ฟังก์ชันที่สามารถเกิด hydrogen bond ทำให้มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ลดลง จึงสามารถสรุป SARs ในเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ได้ว่าการแทนที่ของหมู่ฟังก์ชันจำพวกหมู่ที่ไม่มีขั้วและอะตอมคลอรีนในตำแหน่ง *ortho*- และ *para*- จะสามารถช่วยเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ sorafenib ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ได้ดี ผู้วิจัยจึงคาดว่าโมเลกุลเลียนแบบที่สังเคราะห์ได้สามารถยับยั้งกระบวนการ signal transduction ใน receptor tyrosine kinase เหมือนกับโมเลกุลยา sorafenib ต้นแบบ ซึ่งกระบวนการดังกล่าวนี้มีอยู่ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจนำอนุพันธ์ sorafenib ที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ๆ เช่นกัน

ผู้วิจัยจึงได้เลือกโมเลกุลเลียนแบบ sorafenib บางตัวเป็นตัวแทนไปทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอด A549, เซลล์มะเร็งถุงน้ำดี HuCCA-1 และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด MOLT-3 เพื่อศึกษาฤทธิ์เบื้องต้น พบว่าอนุพันธ์ sorafenib ที่ทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด A549

และเซลล์มะเร็งถุงน้ำดี HuCCA-1 ได้น้อย ยกเว้นอนุพันธ์ sorafenib **12j** ($R = p\text{-Br}$) และ **12p'** ($R = p\text{-NHAc}$) ที่มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งถุงน้ำดี HuCCA-1 ที่ดี โดยมีค่า IC_{50} คือ 10.85 ± 0.36 และ 11.28 ± 4.95 μM ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่ายา sorafenib ต้นแบบประมาณ 3 เท่า (sorafenib มีค่า IC_{50} คือ 33.19 ± 1.45 μM) แต่อย่างไรก็ตามอนุพันธ์ sorafenib ทั้งสองโมเลกุล มีฤทธิ์ยับยั้งน้อยกว่ายา doxorubicin ประมาณ 9 เท่า (doxorubicin มีค่า IC_{50} คือ 1.21 ± 0.04 μM) ส่วนการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด MOLT-3 พบว่าอนุพันธ์ sorafenib **12e'** ($R = p\text{-NO}_2$) และ **12m'** ($R = p\text{-t-Bu}$) มีความสามารถในการยับยั้งได้ในระดับที่ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.75 ± 0.43 และ 11.18 ± 1.15 μM ตามลำดับ แต่มีฤทธิ์ยับยั้งน้อยกว่ายา doxorubicin อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งน้อยกว่าประมาณ 1,400 เท่า (doxorubicin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.01 ± 0.00 μM) ทำให้ผู้วิจัยไม่ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้งสามชนิดของอนุพันธ์ sorafenib ทุกโมเลกุล ดังนั้นการศึกษา SARs ในเซลล์มะเร็งทั้งสามชนิดยังไม่สามารถสรุปได้ เนื่องจากผลการทดลองที่ไม่ครบถ้วน

นอกจากนั้นผู้วิจัยยังได้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด HL-60 พบว่าส่วนมากอนุพันธ์ sorafenib มีความสามารถยับยั้งเซลล์ดังกล่าว่น้อย โดยมีโมเลกุลที่มีความสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด HL-60 ได้ในระดับที่ค่อนข้างดี ซึ่งประกอบไปด้วยโมเลกุล **12y** ($R = p\text{-CF}_3$), **12e'** ($R = p\text{-NO}_2$), **12i'** ($R = o\text{-isopropyl}$), **12l'** ($R = m\text{-t-Bu}$) และ **12m'** ($R = p\text{-t-Bu}$) มีค่า IC_{50} คือ 19.41 ± 0.50 , 22.52 ± 3.39 , 17.77 ± 1.62 , 21.55 ± 2.68 และ 18.04 ± 2.20 ตามลำดับ โดยโมเลกุลทั้ง 5 โมเลกุลมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง HL-60 ที่ต่ำกว่ายา sorafenib น้อยที่สุดประมาณ 4 เท่า (sorafenib มีค่า IC_{50} คือ 5.35 ± 0.38 μM) และยับยั้งต่ำกว่ายา doxorubicin น้อยที่สุดประมาณ 150 เท่า (doxorubicin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.12 ± 0.02 μM) ซึ่งจากฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถศึกษา SARs ได้ว่าหมู่ฟังก์ชันที่แตกต่างกันในกลุ่ม halogen, หมู่ดึงอิเล็กตรอน (electron withdrawing group) และหมู่ฟังก์ชันที่ให้อิเล็กตรอน (electron donating group) มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ไม่แตกต่างกัน แต่มีแนวโน้มที่ฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ sorafenib จะเพิ่มขึ้นตามขนาดของหมู่แทนที่ ซึ่งหมู่ฟังก์ชันที่มีขนาดใหญ่จะมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าหมู่ฟังก์ชันที่มีขนาดเล็กอย่างชัดเจน เช่น *t*-Bu และ isopropyl จะมีค่า IC_{50} ดีกว่าหมู่ ethyl และ methyl อย่างชัดเจน นอกจากนี้หมู่ trifluoromethyl ยังมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ดีกว่าหมู่ methyl เป็นต้น และจากฤทธิ์ทางชีวภาพยังสามารถสรุปผลการแทนที่ของหมู่ฟังก์ชันที่ต่างกันได้ว่าการแทนที่บนวง aromatic ในตำแหน่ง *para*- จะสามารถทำให้อนุพันธ์ sorafenib มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าการแทนที่ในตำแหน่งอื่นอย่างชัดเจน

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D และ MDA-MB-231 พบว่าอนุพันธ์ sorafenib ส่วนมากมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D ได้ดีกว่า MDA-MB-231 โดย **12g** (R = *p*-Cl), **12j** (R = *p*-Br), **12h'** (R = *p*-ethyl) และ **12p'** (R = *p*-NHAc) (จาก 49 ตัว) มีฤทธิ์ยับยั้ง T47-D ได้ค่อนข้างดี มีค่า IC_{50} คือ 5.10 ± 0.80 , 6.00 ± 0.06 , 10.59 ± 2.03 และ 11.28 ± 0.42 μ M ตามลำดับ ในขณะที่ยา sorafenib และยา doxorubicin ค่า มีค่า $IC_{50} = 14.80 \pm 0.43$ μ M และ 0.67 ± 0.07 μ M ต่อ T47-D ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ sorafenib ที่สังเคราะห์ขึ้นมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D ได้ดีกว่ายา sorafenib ต้นแบบมากที่สุดถึง 3 เท่า แต่ยังไม่ดีกว่ายา doxorubicin ค่าที่สุดประมาณ 8 เท่า ในการศึกษา SARs ของอนุพันธ์ sorafenib ในเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D พบว่าอนุพันธ์ sorafenib มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้ดีเป็นอันดับสองรองจากเซลล์มะเร็งตับ HepG2 โดยพบว่าอนุพันธ์ sorafenib ที่มีหมู่ฟังก์ชันทุกประเภทที่แทนที่บนวง aromatic ในตำแหน่ง *para*- จะมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าตำแหน่ง *meta*- และ *ortho*- อย่างชัดเจน โดยหมู่ฟังก์ชันในกลุ่ม halogen ประกอบด้วยอะตอมคลอรีน (Cl-) และโบรมีน (Br-) จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D ให้ดีมากยิ่งขึ้น นอกจากนั้นหมู่ฟังก์ชัน ethyl และหมู่ NHAc ยังมีความสามารถในการยับยั้งได้ดีเช่นกัน โดยโมเลกุล **12g** (R = *p*-Cl) และ **12j** (R = *p*-Br) มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้ดีเทียบเท่ากัน ซึ่งดีที่สุดในกลุ่ม halogen และในหมู่ฟังก์ชันอื่น แต่อย่างไรก็ตามหมู่ฟังก์ชันที่ต่างชนิดกันเป็นส่วนที่ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของอนุพันธ์ sorafenib ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D น้อย โดยส่วนที่มีความสำคัญมากต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ sorafenib คือ ตำแหน่งการแทนที่บนวง aromatic ซึ่งจากฤทธิ์ทางชีวภาพจะเห็นได้ชัดเจนว่าการแทนที่ของหมู่ฟังก์ชันในตำแหน่ง *para*- บนวง aromatic จะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของอนุพันธ์ sorafenib ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D ได้ดีขึ้นอย่างชัดเจน ส่วนการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 พบว่ามีอนุพันธ์ **12t'** (R = *o*-NHAc) เพียงตัวเดียวจากอนุพันธ์ที่ทดสอบ 49 โมเลกุลที่มีฤทธิ์ที่ดีด้วย $IC_{50} = 6.11 \pm 4.74$ μ M ซึ่งโมเลกุล **12t'** (R = *o*-NHAc) มีความสามารถในการยับยั้งได้ดีกว่ายา sorafenib 3 เท่า (sorafenib มีค่า $IC_{50} = 19.32 \pm 1.65$ μ M) แต่ไม่ดีกว่ายา doxorubicin 2 เท่า (doxorubicin มีค่า $IC_{50} = 3.31 \pm 0.07$ μ M) ดังแสดงตารางที่ 5 โดยการศึกษา SARs ของอนุพันธ์ sorafenib ในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 พบว่าอนุพันธ์ sorafenib มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้น้อย โดยทุกหมู่ฟังก์ชันมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นเพียงโมเลกุล **12t'** (R = *o*-NHAc) เพียงโมเลกุลเดียวที่มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ได้ดีอย่างโดดเด่น ในส่วนของการแทนที่ของหมู่ฟังก์ชันที่แตกต่างกันบนวง aromatic พบว่าฤทธิ์ทางชีวภาพจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อแทนที่ในตำแหน่ง *ortho* และ *meta* > *para* ตามลำดับ โดยจะโดดเด่นที่สุดในตำแหน่ง *ortho*-

หลายหมู่ฟังก์ชัน ดังนั้นจึงสามารถสรุป SARs ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ของอนุพันธ์ sorafenib ได้ว่าการแทนที่ของหมู่ฟังก์ชัน acetanilide (NHAc) ในตำแหน่ง *ortho*- จะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ได้ดีที่สุด

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและ SARs ของอนุพันธ์ sorafenib ในเซลล์เยื่อบุผิวปอด MRC-5 หรือเซลล์ปกติ พบว่าอนุพันธ์ sorafenib มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์ปกติได้น้อยมาก โดยส่วนใหญ่มีค่า IC_{50} ที่สูงมากกว่า 50 μM โดยที่ยา sorafenib มีค่า IC_{50} เท่ากับ $19.73 \pm 1.68 \mu\text{M}$ และยา doxorubicin มีค่า IC_{50} เท่ากับ $2.26 \pm 0.22 \mu\text{M}$ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยที่ไม่กระทบต่อเซลล์ปกติของอนุพันธ์ sorafenib ที่มากกว่ายาทั้งสองชนิด ยกเว้นเพียงโมเลกุล **12g** (*p*-Cl) และ **12s** (*p*-OMe) ที่มีการยับยั้งเซลล์ปกติสูง โดยมีค่า IC_{50} คือ 14.59 ± 4.17 และ $21.23 \pm 2.51 \mu\text{M}$ ตามลำดับ

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ และการศึกษา SARs ของอนุพันธ์ sorafenib จะเห็นได้ว่าอนุพันธ์ sorafenib ที่ออกแบบและสังเคราะห์มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2, เซลล์มะเร็งถุงน้ำดี HuCCA-1, เซลล์มะเร็งเต้านม T47-D และเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ได้ดีกว่าหรือเทียบเท่ายา sorafenib ต้นแบบ แต่ในด้านฤทธิ์การยับยั้งอนุพันธ์เหล่านี้ยังยับยั้งเซลล์มะเร็งต่าง ๆ ได้น้อยกว่ายา doxorubicin แต่ doxorubicin ก็มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติสูง โดยโครงสร้างอนุพันธ์ sorafenib ที่มีวงไตรเอโซลเป็นแกนกลางที่ผู้วิจัยออกแบบและสังเคราะห์มีแนวโน้มยับยั้งเซลล์มะเร็งต่าง ๆ ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งและหมู่แทนที่บนวงเบนซีนที่ต่อกับวงไตรเอโซล และชนิดของเซลล์มะเร็ง อนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่โดดเด่น และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ MRC-5 ต่ำ จึงทำให้โมเลกุล

ตารางที่ 5 ความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ร้อยละ 50 (IC₅₀ (μM)), ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 25 μM (%Cell viability) และค่าดัชนีต่อความจำเพาะเจาะจง (Selectivity Index [SI]) ของอนุพันธ์ sorafenib **12a-12w** เทียบกับยา sorafenib ต้นแบบและยา doxorubicin

Compound		Cell lines, IC ₅₀ (μM), * (%Cell viability), [SI]									
R		HepG2	A549	HuCCA-1	MOLT-3	HL-60	T47-D	MDA-MB-231	MRC-5		
Doxorubicin	-	<u>0.59±0.10</u> [3.83]	<u>0.47±0.02</u> [4.81]	<u>1.21±0.04</u> [1.87]	<u>0.01±0.00</u> [2.26]	<u>0.12±0.02</u> [18.83]	<u>0.67±0.07</u> [3.37]	<u>3.31±0.07</u> [0.68]	<u>2.26±0.22</u>		
*Sorafenib	-	<u>5.97±0.71</u> *(10.59) [3.30]	19.65±0.01 [1.00]	33.19±1.45 [0.59]	ND [0.59]	<u>5.35±0.38</u> [3.69]	14.80± 0.43 [1.33]	19.32±1.65 [1.02]	19.73±1.68		
12a	H						72.39±0.46 [>1.75]	102.61±0.25 [>1.23]			
12b	o-F	*(79.16%)	77.34±1.76 [0.95]	69.15±19.17 [1.06]	25.28±1.38 [2.91]	40.65±4.64 [1.81]	99.91±4.60 [0.74]	83.74±0.77 [0.88]	73.50±9.14		
12c	m-F	*(60.24%)	69.39±2.44 [0.89]	44.91±3.84 [1.37]	18.37±0.36 [3.35]	34.10±11.31 [1.81]	63.23±5.35 [0.97]	67.48±8.87 [0.91]	61.61±3.63		
12d	p-F	*(57.93%)	57.38±8.36 [1.03]	55.35±6.49 [1.07]	20.54±1.23 [2.89]	35.02±9.04 [1.69]	89.81±9.33 [0.66]	66.92±3.29 [0.89]	59.29±1.96		

Compound		Cell lines, IC ₅₀ (μM), * (%Cell viability), [SI]							
R	HepG2	A549	HuCCA-1	MOLT-3	HL-60	T47-D	MDA-MB-231	MRC-5	
12e	o-Cl	<u>5.02±2.07</u>							
		*(52.70%) [12.23]	ND	ND	ND	52.09±13.88 [1.18]	77.47±7.66 [0.79]	66.83±1.91 [0.92]	61.41±3.51
12f	m-Cl	<u>9.81±5.02</u>							
		*(52.17%) [6.50]	ND	ND	ND	37.51±2.23 [1.70]	64.08±1.26 [1.00]	66.32±2.93 [0.96]	63.78±3.53
12g	p-Cl	82.98±2.70 [0.18]	33.65±1.83 [0.43]			<u>5.10±0.80</u> [2.86]			14.59±4.17
		*(72.26%)							
12h	o-Br	*(61.39%)	ND	ND	ND	37.71±3.88 [1.40]	59.37±2.19 [0.89]		52.90±3.10
12i	m-Br	*(80.71%)	ND	ND	ND	35.75±0.34 [1.48]	57.18±2.49 [0.93]		53.03±3.31
12j	p-Br	33.83±2.29 [1.79]	10.85±0.36 [5.59]	53.38±24.33 [1.14]	76.05±22.64 [0.80]	<u>6.00±0.06</u> [10.11]	88.02±4.67 [0.69]		60.66±1.88
		*(75.15%)							

Compound		Cell lines, IC ₅₀ (μM), * (%Cell viability), [S]									
R	HepG2	A549	HuCCA-1	MOLT-3	HL-60	T47-D	MDA-MB-231	MRC-5			
12k	<i>o</i> -I	*(60.03%)	ND	ND	ND	37.44±2.36 [1.31]	54.13±3.05 [0.91]	49.05±2.95			
12l	<i>m</i> -I	*(88.27%)	ND	ND	ND	33.24±0.58 [1.48]	52.72±1.99 [0.93]	49.15±2.13			
12m	<i>p</i> -I	*(63.05%)	ND	ND	29.92±1.51 [1.67]	49.76±7.19 [1.00]	62.19±16.58 [0.80]	49.92±6.61			
12n	<i>o</i> -OH	*(74.64%)	ND	ND	39.42±3.52 [>3.08]	51.12±1.77 [>2.38]					
12o	<i>m</i> -OH	*(88.72%)	ND	ND	28.29±4.51 [>4.29]	39.22±2.72 [>3.10]					
12p	<i>p</i> -OH	*(66.21%)	85.85±7.24 [0.81]	87.43±0.79 [0.80]	22.51±1.85 [3.09]	72.57±2.33 [0.96]	94.84±10.52 [0.73]	69.58±5.66			
12q	<i>o</i> -OMe	*(73.65%)	ND	ND	ND	42.39±2.18 [1.60]	75.08±12.10 [0.91]	68.01±5.14			

Compound		Cell lines, IC ₅₀ (μM), *(%Cell viability), [SI]									
R	HepG2	A549	HuCCA-1	MOLT-3	HL-60	T47-D	MDA-MB-231	MRC-5			
12r	<i>m</i> -OMe	*(75.63%)	ND	ND	42.81±1.95 [1.78]	97.21±1.93 [0.78]	84.52±9.51 [0.90]	76.05±9.18			
12s	<i>p</i> -OMe	*(64.25%)	ND	ND				21.23±2.51			
12t	<i>o</i> -Me	*(72.29%)	ND	ND	45.00±4.03 [1.37]	76.50±0.17 [0.81]	68.13±1.83 [0.91]	61.67±3.22			
12u	<i>m</i> -Me	*(69.43%)	ND	ND		60.69±9.92 [>2.01]					
12v	<i>p</i> -Me	*(90.78%)	ND	ND	91.12±1.66 [1.10]			99.93±0.90			
12w	<i>o</i> -CF ₃	*(57.83%)	ND	ND	30.64±0.80 [1.92]	51.82±2.50 [1.14]	55.44±5.71 [1.06]	58.82±0.39			
12x	<i>m</i> -CF ₃	*(81.32%)	ND	ND	27.77±4.56 [2.28]	47.20±5.65 [1.34]	58.18±2.59 [1.09]	63.18±1.57			

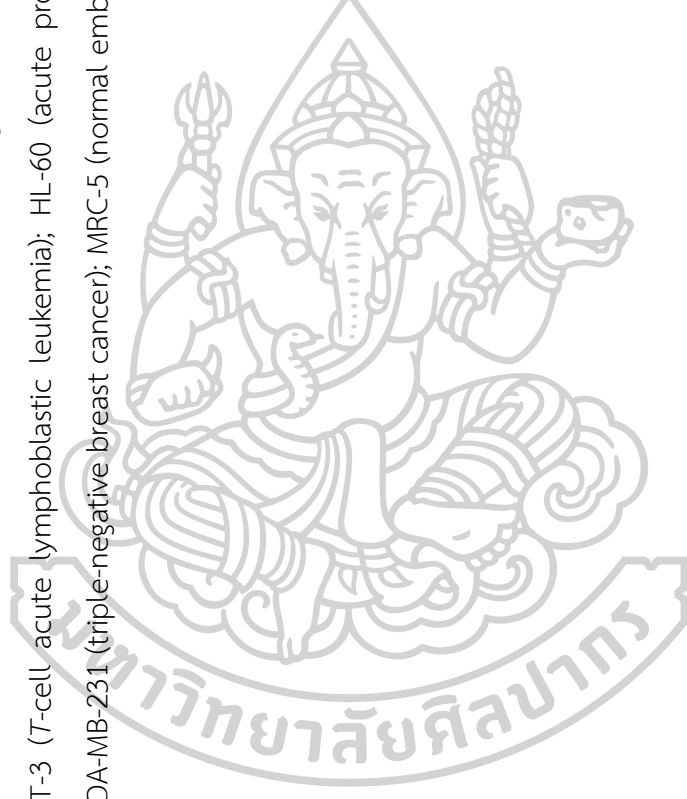
Compound		Cell lines, IC ₅₀ (μM), *(%Cell viability), [SI]									
R	HepG2	A549	HuCCA-1	MOLT-3	HL-60	T47-D	MDA-MB-231	MRC-5			
12y	<i>p</i> -CF ₃	5.97±2.14			18.13±0.45	19.41±0.50	46.60±1.16	59.86±7.16			
		*(39.21%) [9.81]	ND	ND	[3.23]	[3.02]	[1.26]	[0.98]	58.59±3.51		
12z	<i>o</i> -CN	*(65.92%)	ND	ND	56.37±10.91	75.91±2.07	67.40±3.78	59.72±6.63			
					[1.06]	[0.79]	[0.89]				
12a'	<i>m</i> -CN	*(58.76%)	ND	ND	33.84±7.18	91.50±7.39	83.11±6.96	99.32±2.99			
					[2.93]	[1.09]	[1.20]				
12b'	<i>p</i> -CN	*(113.14%)	80.14±9.24	74.13±1.88	17.56±0.59	32.84±9.55	69.73±0.52	70.96±10.12			
			[0.80]	[0.86]	[3.65]	[1.95]	[0.92]	[0.90]	64.05±0.36		
12c'	<i>o</i> -NO ₂	*(77.92%)	ND	ND	46.03±5.51	81.09±0.17	68.36±4.27	60.55±5.26			
					[1.32]	[0.75]	[0.89]				
12d'	<i>m</i> -NO ₂	*(62.08%)	ND	ND	37.39±1.95	76.84±1.40	66.69±3.93	58.40±5.69			
					[1.56]	[0.76]	[0.88]				
12e'	<i>p</i> -NO ₂	*(70.31%)	63.88±4.59	42.24±2.75	14.75±0.43	22.52±3.39	62.47±4.13	62.74±3.91			
			[1.03]	[1.56]	[4.48]	[2.93]	[1.06]	[1.05]	66.08±4.50		

Compound		Cell lines, IC ₅₀ (μM), * (%Cell viability), [SI]									
R		HepG2	A549	HuCCA-1	MOLT-3	HL-60	T47-D	MDA-MB-231	MRC-5		
12f'	<i>o</i> -Ethyl	*(59.82%)	ND	ND	ND	36.31±1.51 [1.59]	80.06±5.55 [0.72]	62.60±3.66 [0.92]	57.67±1.82		
12g'	<i>m</i> -Ethyl	*(78.89%)	ND	ND	ND	40.75±0.61 [2.32]		78.22±4.41 [1.21]	94.69±5.24		
12h'	<i>p</i> -Ethyl	*(63.11%)	ND	ND	ND		10.59±2.03 [7.12]	82.39±8.73 [0.92]	75.39±10.43		
12i'	<i>o</i> -isopropyl	5.40±0.35 *(28.90%) [10.09]	ND	ND	ND	17.77±1.62 [3.07]	53.71±10.99 [1.01]	55.16±6.39 [0.99]	54.47±7.03		
12j'	<i>m</i> -isopropyl	*(62.14%)	ND	ND	ND	29.28±7.33 [2.50]		61.29±0.23 [1.20]	73.29±15.60		
12k'	<i>p</i> -isopropyl	20.95±4.17 *(50.10%,) [3.15]	ND	ND	ND		22.59±0.71 [2.92]	63.70±3.49 [1.04]	65.94±10.21		

Compound		Cell lines, IC ₅₀ (μM), *(%Cell viability), [SI]									
R		HepG2	A549	HuCCA-1	MOLT-3	HL-60	T47-D	MDA-MB-231	MRC-5		
12l'	<i>m</i> -tert-Butyl	9.88±3.03									
		ND	ND	ND	ND	21.55±2.68		61.34±0.13		68.24±11.91	
		*(46.39%)				[3.17]		[1.11]			
		[6.91]									
12m'	<i>p</i> -tert-Butyl	5.57±0.91									
		39.61±0.12	35.08±12.67	11.18±1.15	18.04±2.2	106.87±5.34		66.08±6.31		81.59±5.07	
		*(44.07%)				[4.52]		[1.23]			
		[2.06]	[2.33]	[7.30]			[0.76]				
		[14.65]									
12n'	<i>m</i> -CO ₂ H	ND	ND	ND	ND						
		*(96.27%)									
12o'	<i>p</i> -CO ₂ H										
		*(80.97%)									
12q'	<i>o</i> -NH ₂	ND	ND	ND	ND	48.61±9.18	91.78±5.44	93.92±24.20			
		*(64.77%)				[>2.50]	[>1.33]	[>1.30]			
12r'	<i>m</i> -NH ₂	ND	ND	ND	ND	42.67±3.41	81.82±2.80	79.09±4.48		62.34±3.38	
		*(57.12%)				[1.46]	[0.76]	[0.79]			

Compound		Cell lines, IC ₅₀ (μM), *(%Cell viability), [S]									
R	HepG2	A549	HuCCA-1	MOLT-3	HL-60	T47-D	MDA-MB-231	MRC-5			
12s'	<i>p</i> -NH ₂	ND	ND	33.89±1.48 [>3.59]	42.07±0.68 [>2.89]	100.71±1.82 [>1.21]					
12t'	<i>o</i> -NHAC	ND	ND	ND	34.98±0.99 [1.53]	62.74±4.40 [0.85]	6.11±4.74 [8.77]	53.60±2.54			
12u'	<i>m</i> -NHAC	94.17±6.18 [>1.17]	92.69±3.11 [>1.19]	25.20±1.33 [>4.38]	35.38±9.28 [>3.12]	90.92±5.70 [>1.21]	87.03±5.87 [>1.27]				
12p'	<i>p</i> -NHAC		11.28±4.95 [>9.79]	34.63±9.23 [>3.19]	75.84±23.92 [>1.46]	11.28±0.42 [>9.79]					
12v'	<i>m</i> -CONHMe	ND	ND	ND	42.11±2.61 [>2.62]	83.92±0.91 [>1.32]	86.83±0.07 [>1.27]				
12w'	<i>p</i> -CONHMe	ND	ND	ND	36.46±1.57 [1.71]	21.64±5.12 [2.87]	66.58±4.73 [0.93]	62.21±7.88			

*Sorafenib = Sorafenib tosylate; *%Cell viability) = %Cell viability at 25 μ M; [SI] = Selectivity Index, IC₅₀ for normal cell/ IC₅₀ for cancer cell; SI value \geq 3.00 indicating highly cancer-selective^{37, 38} [blue color]; I = Inactive at 50 μ g/mL; ND = Not Determine; IC₅₀ \leq 15 μ M; IC₅₀ \leq 10 μ M; HepG2 (hepatocellular carcinoma cell lines); A549 (human lung carcinoma cell lines); HuCCA-1 (Thai human cholangiocarcinoma cells); MOLT-3 (T-cell acute lymphoblastic leukemia); HL-60 (acute promyelocytic leukemia); T47-D (hormone-dependent breast carcinoma); MDA-MB-231 (triple-negative breast cancer); MRC-5 (normal embryonic lung fibroblast).



3.4 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะเจาะจง (targeted cancer drug) ผ่านการหาค่าดัชนีความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Selectivity Index (SI)) ของอนุพันธ์ sorafenib

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีความสนใจในการพัฒนายาที่มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่มีความจำเพาะเจาะจง (targeted drug therapy) คือมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง แต่ไม่มีความเป็นพิษหรือมีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ปกติ ผู้วิจัยจึงนำอนุพันธ์ sorafenib ทั้ง 49 โมเลกุลไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อผิวในปอด MRC-5 ซึ่งเป็นเซลล์ปกติ (normal cell) โดยแสดงเป็นค่าดัชนีความจำเพาะเจาะจง (Selectivity Index; SI) ระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะเจาะจงของอนุพันธ์ sorafenib โดยที่ไม่กระทบต่อเซลล์ปกติอื่น ๆ โดยจากผลการทดลองการยับยั้งเซลล์ปกติ (MRC-5) พบว่าอนุพันธ์ sorafenib ที่ผู้วิจัยได้ออกแบบและสังเคราะห์ความเป็นพิษ (cytotoxicity) ต่อเซลล์ปกติ (normal cell) ต่ำ โดยมี $IC_{50} > 50 \mu M$ เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งหากเปรียบเทียบเป็นค่าดัชนีต่อความจำเพาะเจาะจง (Selectivity Index (SI)) ระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติจะพบว่าอนุพันธ์ sorafenib มีค่า $SI \geq 3$ หลายโมเลกุลแสดงให้เห็นถึงความปลอดภัย^{37, 38} และความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่มีความจำเพาะเจาะจง (targeted drug therapy) โดยเมื่อเปรียบเทียบค่า SI ระหว่างอนุพันธ์ sorafenib กับยา sorafenib และยา doxorubicin จะพบว่าอนุพันธ์ sorafenib หลายโมเลกุลมีค่า SI สูงกว่ายา sorafenib และยา doxorubicin โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่อนุพันธ์ sorafenib มีค่า SI มากกว่ายา sorafenib และยา doxorubicin ถึง 6 โมเลกุล ประกอบไปด้วยโมเลกุล **12e** (R = *o*-Cl), **12f** (R = *m*-Cl), **12y** (R = *p*-CF₃), **12i'** (R = *o*-isopropyl), **12l'** (R = *m*-*t*-Bu) และ **12m'** (R = *p*-*t*-Bu) ซึ่งมีค่า SI อยู่ระหว่าง 6.50 ถึง 14.65 โดยยา sorafenib และยา doxorubicin มีค่า SI คือ 3.30 และ 3.83 ตามลำดับ ซึ่งโมเลกุลที่มีค่า SI ที่สูงที่สุด คือ โมเลกุล **12m'** (R = *p*-*t*-Bu) โดยมีค่า SI ที่มากกว่ายา sorafenib และยา doxorubicin 4.4 และ 3.8 เท่าตามลำดับ และในเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D อนุพันธ์ sorafenib ที่มีค่า SI มากกว่ายา sorafenib และยา doxorubicin 3 โมเลกุล ประกอบไปด้วยโมเลกุล **12j** (R = *p*-Br), **12h'** (R = *p*-ethyl) และ **12p'** (R = *p*-NHAc) ซึ่งมีค่า SI อยู่ระหว่าง 7.12 ถึง 10.11 ซึ่งยา sorafenib และยา doxorubicin มีค่า SI คือ 1.33 และ 3.37 ตามลำดับ โดยโมเลกุลที่มีค่า SI ที่สูงที่สุด คือ โมเลกุล **12j** (R = *p*-Br) โดยมีค่า SI ที่มากกว่ายา sorafenib และยา doxorubicin 7.6 และ 3.0 เท่าตามลำดับ โดยที่ในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 อนุพันธ์ sorafenib **12t'** (R = *o*-NHAc) ซึ่งมีค่า SI เท่ากับ 8.77 ซึ่งยา sorafenib และยา doxorubicin มีค่า SI คือ 1.02 และ 0.68 ตามลำดับ โดยมีค่า SI ที่มากกว่ายา sorafenib และยา doxorubicin ถึง 8.6 และ 12.9 เท่าตามลำดับ สำหรับเซลล์มะเร็งถุง

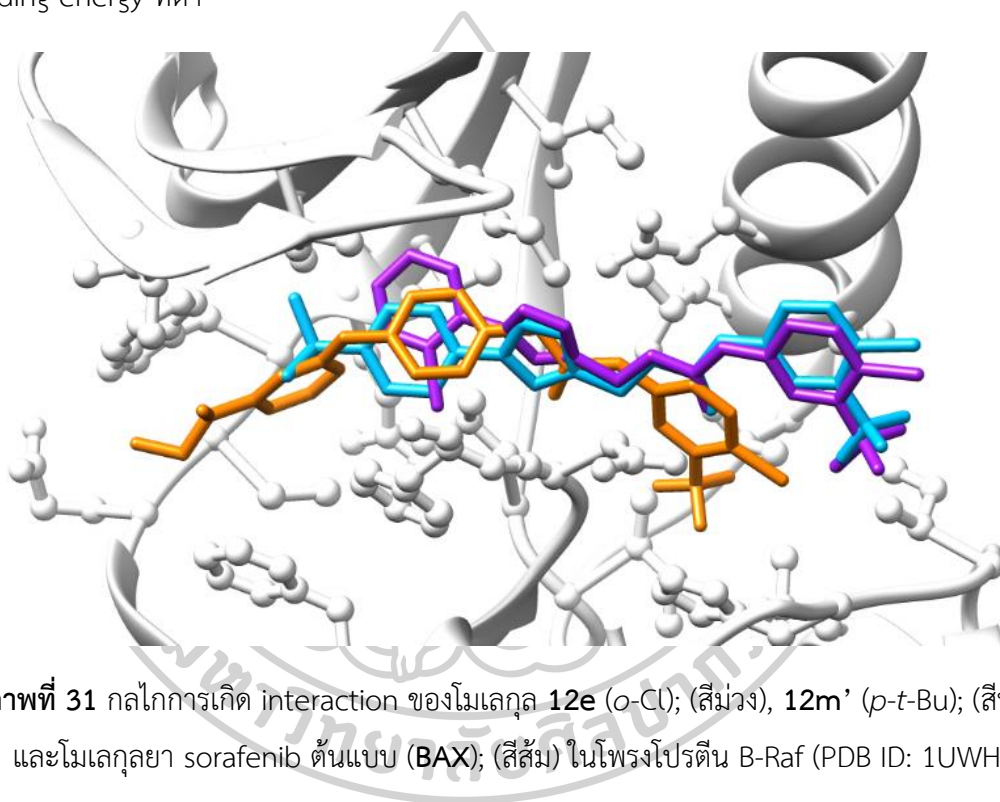
น้ำดี HuCCA-1 แม้ว่าค่า IC_{50} ของอนุพันธ์ sorafenib เมื่อเทียบกับยา sorafenib ต้นแบบหรือยา doxorubicin จะมีค่า IC_{50} ที่เทียบเท่าหรือสูงกว่ายาทั้งสองชนิด แต่หากเทียบความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งจากค่า SI จะพบว่าอนุพันธ์ sorafenib นั้นมีความจำเพาะเจาะจงสูงสูงกว่ายาทั้งสองชนิดมาก โดยที่ อนุพันธ์ sorafenib **12j** ($R = p\text{-Br}$) และ **12p'** ($R = p\text{-NHAc}$) มีค่า SI ที่สูงกว่ายา sorafenib เท่ากับ 9.5 และ 16.6 เท่า และยา doxorubicin เท่ากับ 3.0 และ 5.2 เท่าตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยต่อการใช้เป็นยาหรือพัฒนาโครงสร้างเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งที่ดีในอนาคต

จากการศึกษาผลของค่าดัชนีต่อความจำเพาะเจาะจง (Selectivity Index; SI) ระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ จะเห็นได้ว่าอนุพันธ์ sorafenib มีความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 มากที่สุด และดีเป็นอันดับสองในเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D และ MDA-MB-231 โดยในเซลล์มะเร็งชนิดอื่นจะมีค่า SI ที่เทียบเท่าหรือน้อยกว่ายาทั้งสองชนิด ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการนำโมเลกุล **12m'** และ **12e** ไปศึกษากลไกการเกิด binding interaction ต่อในโปรตีน B-Raf และ VEGFR-2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งกระบวนการการเกิดเนื้องอก (proliferation) และกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด

3.5 การศึกษากลไกการเกิด Binding Mechanism ของอนุพันธ์ sorafenib เทียบกับโมเลกุลยา sorafenib ต้นแบบ

ผู้วิจัยได้เลือกอนุพันธ์ sorafenib **12e** ($R = o\text{-Cl}$) และ **12m'** ($p\text{-tert-Bu}$) ที่มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ได้ดีเทียบเท่ากับยา sorafenib ต้นแบบและมีค่า SI ที่สูงที่สุดสองอันดับแรกของอนุพันธ์ sorafenib ทั้งหมด นอกจากนั้นทั้งสองโมเลกุลยังเป็นตัวแทนของการแทนที่ในตำแหน่งที่สำคัญทั้งสองตำแหน่งบนวง aromatic มาศึกษา binding mechanism ของอนุพันธ์ sorafenib ในโปรตีน B-Raf และ VEGFR-2 ด้วย molecular docking ผ่านโปรแกรม iGEMDOCK v2.1 โดยจากผลการศึกษาพบว่าอนุพันธ์ sorafenib ทั้งสองโมเลกุลสามารถเข้าไปเกิด interaction ในโพรงโปรตีน B-Raf และ VEGFR-2 ในตำแหน่งเดียวกันกับโมเลกุลยา sorafenib ต้นแบบ โดยในโพรงโปรตีน B-Raf (ภาพที่ 31) พบว่าส่วนวง aromatic ของอนุพันธ์ sorafenib ที่มีการแทนที่ของหมู่ฟังก์ชันที่ต่างกันของทั้งสองโมเลกุลเข้าไปเกิดอันตรกิริยาตรงกับส่วนของวง phenoxy ของโมเลกุล sorafenib ต้นแบบ ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic) และพบการสร้างพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ระหว่างส่วน urea ของโมเลกุล **12m'** (สีฟ้า) กับกรดอะมิโน GLU500 ในโพรงโปรตีนเหมือนกับยา sorafenib ส่วนโมเลกุล **12e** (สีม่วง) ไม่พบการเกิด

interaction โดยที่วง 1,2,3-triazole ที่ประกอบไปด้วยอะตอมไนโตรเจนถึง 3 อะตอมอาจสามารถเกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) แทนที่ในส่วนของ urea ได้ ดังที่แสดงในภาพที่ 31 โดยการเกิด interaction ของโมเลกุล **12e** (สีม่วง) และ **12m'** (สีฟ้า) ในโพรงโปรตีน B-Raf มีพลังงานที่สูงเมื่อเทียบกับโมเลกุลยา sorafenib (-176.75 kcal/mol) โดยมีค่า -112.20 และ -132.73 kcal/mol ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งจะเห็นได้ว่า sorafenib มีการเกิด interaction ที่ใช้พลังงานต่ำกว่าอนุพันธ์ทั้งสองมากในโพรงโปรตีน เนื่องจาก sorafenib สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนได้มากกว่าอนุพันธ์ทั้งสองจากส่วนของวง picolinamide จึงทำให้มี binding energy ที่ต่ำ

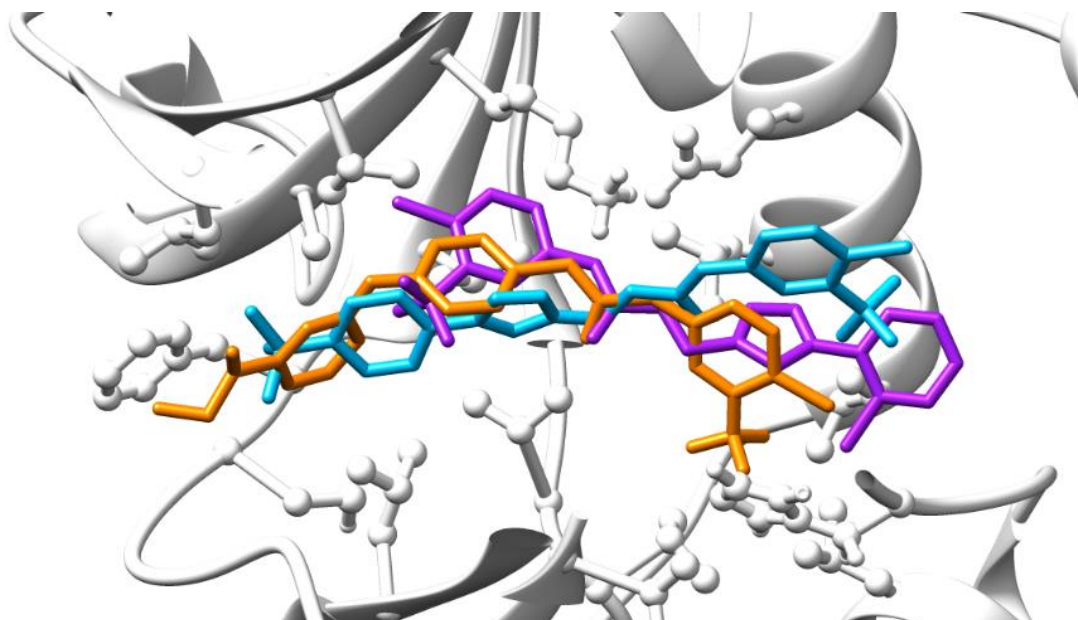


ตารางที่ 6 พลังงานในการเกิด interaction (kcal/mol) กับกรดอะมิโนในโปรตีน B-Raf และ VEGFR-2 ของอนุพันธ์ sorafenib **12e** (o-Cl), **12m'** (p-t-Bu) และยา sorafenib (**BAX**) ด้วยวิธีการทำ molecular docking

Protein	Compounds	Binding energy (kcal/mol)	Amino acid residue	Hydrogen bond length (Å)
B-Raf	12m'	-132.73	GLU500:O	2.05
	12e	-112.20	-	-
	BAX	-176.75	GLU500:O, GLN529:O CYS531:O, GLY592:H	2.22, 2.70, 2.95, 2.27
VEGFR-2	12m'	-101.77	ASP1046:O, LYS868:H LYS868:H	2.56, 2.92, 2.88
	12e	-108.00	GLU885:O, CYS1045:H CYS919:H, CYS919:O	2.52, 3.03 2.10, 2.03,
	BAX	-152.82	GLU885:O, HIS1026:H	2.62, 2.76,
			CYS1045:H, CYS1045:H GLU917:O, CYS919:O LYS920:O	2.56, 2.87, 2.33, 2.86, 2.64

ส่วนการเกิด interaction ในโปรตีน VEGFR-2 ของอนุพันธ์ sorafenib ทั้งสองโมเลกุลพบว่าโมเลกุลทั้งสอง bind ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกับตำแหน่งของ sorafenib (สีส้ม) แต่วง trifluoromethyl phenyl ของโมเลกุล **12e** (สีม่วง) กลับทางมาอยู่ในส่วนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic) ที่ตรงกับส่วนของวง phenoxy ของโมเลกุล sorafenib ต้นแบบ อาจเนื่องจากสามารถเกิด interaction ได้ดีในส่วน urea โดยเกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) กับกรดอะมิโน GLU885 และ CYS1045 ในโปรตีนเหมือนกับโมเลกุล sorafenib ต้นแบบ ส่วนโมเลกุล **12m'** (สีฟ้า) วางตัวแนวเดียวกับ sorafenib และพบว่าส่วนวง aromatic ของ **12m'** (สีฟ้า) ที่มีการแทนที่ของหมู่ฟังก์ชันที่เข้าไปเกิด interaction ตรงกับส่วนของวง phenoxy ของโมเลกุล sorafenib ต้นแบบ นอกจากนั้นยังสามารถเกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ระหว่างส่วนของ urea ในโมเลกุลกับกรดอะมิโน ASP1046 ในโปรตีนได้ แต่ไม่เหมือนกับยา sorafenib ต้นแบบ เช่นเดียวกันกับการเกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ระหว่างส่วนของวง 1,2,3-triazole ในโมเลกุลกับกรดอะมิโน LYS868 ในโปรตีน VEGFR-2 โดยการเกิด interaction ของโมเลกุล **12e** (สีม่วง) และ **12m'** (สีฟ้า) ในโปรตีน VEGFR-2 มีพลังงานสูงเมื่อเทียบกับโมเลกุลยา sorafenib โดยมีค่า -108.00, -101.77 และ -152.82 kcal/mol ตามลำดับ ดังแสดงใน**ตารางที่**

6 ซึ่งจะเห็นได้ว่า sorafenib มีการเกิด interaction ที่ใช้พลังงานต่ำกว่าอนุพันธ์ sorafenib ทั้งสองมากในโพรงโปรตีน เนื่องจาก sorafenib สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนได้มากกว่าอนุพันธ์ทั้งสองจากส่วนของวง picolinamide จึงทำให้มี binding energy ที่ต่ำ



ภาพที่ 32 กลไกการเกิด interaction ของโมเลกุล 12e (*o*-Cl); (สีม่วง), 12m' (*p*-*t*-Bu); (สีฟ้า) และโมเลกุลยา sorafenib ต้นแบบ (BAX); (สีส้ม) ในโพรงโปรตีน VEGFR-2 (PDB ID: 4ASD)

จากการศึกษาการเกิด interaction ของอนุพันธ์ sorafenib 12e (สีม่วง) และ 12m' (สีฟ้า) ในโพรงโปรตีน B-Raf และ VEGFR-2 พบว่าโมเลกุลทั้งสองมีพลังงานในการเกิด interaction สูงกว่ายา sorafenib ต้นแบบมาก แต่อย่างไรก็ตามโมเลกุลทั้งสองสามารถเกิด interaction กับกรดอะมิโนที่สำคัญในโพรงโปรตีนได้ดี สอดคล้องกับความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยเฉพาะเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ได้ดีเทียบเท่ากับยา sorafenib นอกจากนี้จากการศึกษา molecular docking ยังพบว่าลักษณะโครงสร้างของ triazole ของอนุพันธ์ที่ออกแบบและสังเคราะห์สามารถเกิด interaction กับ binding site ของ B-Raf และ VEGFR-2 ได้ดี โดยจะเห็นได้ว่าวง 1,2,3-triazole สามารถเกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) แทนที่ส่วนของ urea ได้ นอกจากนี้ส่วนของวง aromatic ที่เชื่อมต่อกับส่วนของวง 1,2,3-triazole เข้าไปแทนที่ในส่วนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic) ที่ทับกันกับวง phenoxy แกนกลางของโมเลกุลยา sorafenib ต้นแบบ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษา SARs ที่หมู่ฟังก์ชันเป็นกลุ่มที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic) จะทำให้มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิดที่ดี นอกจากนี้หมู่ฟังก์ชันที่เป็น acetanilide ที่มี hydrogen bond donor และ hydrogen bond acceptor ในโมเลกุลจะมีความสามารถในการ

ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีหลายชนิด โดยเฉพาะการแทนที่บนวงแหวนเบนซีนใน *para*-position อาจเนื่องจากหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวเป็นส่วนที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) แทนส่วนของวง picolinamide ได้ นอกจากนั้นส่วนของวง picolinamide สามารถถูกแทนที่ได้ด้วยลักษณะโครงสร้างอื่นโดยยังทำให้โมเลกุลยังมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีเทียบเท่ากับยา sorafenib ต้นแบบ ดังนั้นหากต้องการพัฒนาโมเลกุลให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีมากยิ่งขึ้นสามารถเพิ่มความยาวของโมเลกุลโดยเติมส่วนของวง picolinamide หรือแทนที่ด้วยวง heteroaromatic ชนิดอื่น ๆ อาจทำให้เกิด interaction ได้ดีเพิ่มมากยิ่งขึ้น เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้มากขึ้นได้



บทที่ 4 วิธีการทดลอง

4. Experimental

4.1. Chemicals, Materials and Methods

Reagents and starting materials were purchased from Tokyo Chemical Industry (TCI), Sigma-Aldrich, Arcos Organics, BDH chemicals, Riedel-de-Haen, Fluka, Carlo Erba, J.T. Baker, and RCI Labscan. They were analytical grade and used as received without purification. The commercial materials such as sodium chloride and sodium bicarbonate were used as received in the work-up step. The commercial solvents consisted of hexane, ethyl acetate, dichloromethane, and methanol were obtained from I.C.P. CHEMICALS CO., LTD. company which were distilled before used for column chromatography. The analytical solvents were obtained from RCI Labscan and Carlo Erba company which were used in the reactions and dried solvents. That was dried with the applicable procedure. For the air and moisture-sensitive reaction or intermediate were set under argon atmosphere. Silica gel F60 (Silicycle, Canada, 40-63 μm , 60A) was used for flash column chromatography and Silica gel 60 F₂₅₄; aluminum sheet, 0.2 mm layer thickness (Merck) was used for thin-layer chromatography (TLC), which was traced for proceeding of the reactions. All reactions and column chromatographic separations were monitored by TLC analysis using precoated silica gel 60 TLC sheets, visualized by a 254 and 365 nm UV lamps.

4.2 Apparatus and Instruments

All products were characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). ¹H NMR (300 MHz), ¹³C NMR (75 MHz), and ¹⁹F NMR (282 MHz) spectra were

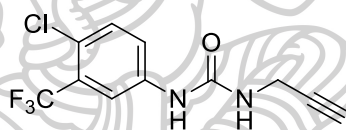
recorded on a Bruker AVANCE 300 using CDCl_3 , Acetone- d_6 , DMSO- d_6 or MeOD- d_4 on 5 mm diameter tubes. The chemical shifts (δ) were reported in units of part per million (ppm). Coupling constants (J) were reported in Hertz (Hz) and refer to tetramethylsilane (TMS) as an internal standard (δ_{H} 0.00 ppm) or trifluoroacetic acid (CF_3COOH) (δ_{F} -76.55 ppm) or residual signals of CDCl_3 (δ_{H} 7.26 ppm, or δ_{C} 77.22 ppm), Acetone- d_6 (δ_{H} 2.05 ppm, or δ_{C} 29.84 and 206.26 ppm), DMSO- d_6 (δ_{H} 2.50 ppm, or δ_{C} 39.52 ppm) or MeOD- d_4 (δ_{H} 3.31 ppm, or δ_{C} 49.00 ppm). The signals were reported as follows: chemical shifts, multiplicity, coupling constant. The multiplicities were given as s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, dd = doublet of doublet, dt = doublet of triplet, td = triplet of doublet, tt = triplet of triplet, ddd = doublet of doublet of doublet, dddd = doublet of doublet of doublet of doublet, m = multiplet, br = broad. DEPT and 2D NMR including COSY, HMQC and HMBC were performed for identification of complicated structures and some target compounds. High resolution mass spectra (HRMS) were performed using an ESI and APCI ionization technique on a Bruker Daltonics MicroTOF spectrometer and reported as mass per charge ration (m/z). Melting points were measured on a Büchi Melting Point B-545 apparatus. Solvents were evaporated by rotary evaporators on BÜCHI (R-114) and BÜCHI (R II) machines. The cytotoxicity of synthesized compounds and positive control towards cell lines was analyzed by MTT assay using a microplate reader (Packard bioscience) for determination of cell viability percentage and IC_{50} values.

4.3 Chemistry

Synthesis of sorafenib derivatives **12a-12p'** was accomplished in 3-4 steps starting from isocyanate **7** via nucleophilic addition, Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition and functional group. Initially, 4-chloro-3-trifluoromethylphenyl isocyanate (**7**) underwent nucleophilic addition with propargylamine (**8**) to produce ureido alkyne **9** in high yield. In parallel, phenyl azides **11a-11p'** was synthesized from aniline derivatives **10a-10p'** via diazotization in 75% to quantitative yields. The 1,2,3-triazole

moiety was constructed from ureido alkyne **9** and phenyl azides **11a-11p'** via 1,3-dipolar cycloaddition (click reaction) to give the target sorafenib derivatives **12a-12p'** in excellent yield. The sorafenib derivatives **12q'-12s'** synthesized from compounds **12c'-12e'** through reduction reaction using tin (II) chloride dihydrate in concentrated hydrochloric acid. The sorafenib derivatives **12t'** and **12u'** were further synthesized from compounds **12q'** and **12s'**, respectively. While, the sorafenib derivatives **12v'** and **12w'** were further synthesized from the molecules **12n'** and **12o'**, respectively. These products were completed using HATU as an amide coupling reagent with methylamine hydrochloride. The sorafenib derivatives **12a**, **12b**, **12c**, **12d**, **12g**, **12j**, **12p**, **12b'**, **12e'**, **12m'**, **12o'**, **12p'**, and **12u'** were given form Bachelor of Science thesis.

4.3.1. The procedure for preparation of ureido alkyne **9**

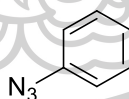


A solution of 4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate (**7**) (2.79 g, 12.59 mmol, 1.05 eq) and propargyl amine (**8**) (767.9 μ L, 11.90 mmol, 1.00 eq) in dry dichloromethane (80.0 mL) was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure to give the desired product 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(prop-2-yn-1-yl)urea (**9**) (3.17 g, 91% yield) as a white solid which was used without further purification. Mp = 122-123 $^{\circ}$ C; ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6) δ 3.07 (s, 1H), 4.02 (dd, 2H, J = 5.6 and 2.4 Hz), 6.31 (br s, 1H), 7.48 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 7.68 (dd, 1H, J = 8.7 and 2.0 Hz), 8.08 (d, 1H, J = 2.2 Hz) and 8.48 (br s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6) δ 155.4, 140.7, 132.6, 128.4 (q, J = 30.8 Hz), 123.9 (q, J = 270.8 Hz), 123.8, 123.4, 117.8 (q, J = 6.0 Hz), 81.8, 71.9 and 29.8; ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ -63.59 (s, 3F); HRMS (ESI+): m/z = 299.0169 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd. 299.0175 for $[(\text{C}_{11}\text{H}_8\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O})+\text{Na}]^+$.

4.3.2. General procedure A for preparation of phenyl azide **11a-11p**'³⁹

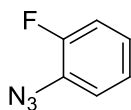
A stirred solution of aniline derivatives **10** (6.00 mmol, 1.00 eq) in 50% HCl (8.1 mL, 0.74 M) at 0 °C was treated dropwise with an aqueous solution of sodium nitrite (1.24 g, 18.00 mmol, 3.00 eq) in H₂O (12.0 mL), while maintaining the temperature of the reaction mixture below 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min, then a sodium azide (780 mg, 12.00 mmol, 2.00 eq) in H₂O (8.0 mL) was added, followed by addition of a sodium acetate (984 mg, 12.00 mmol, 2.00 eq) in H₂O (8.0 mL) at below 0 °C. After stirred for 30 min, the reaction mixture was diluted with water (80 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic phase was washed with an aqueous sodium hydrogen carbonate solution (1 x 20 mL), dried over anhydrous sodium sulfate and filtered out. The solvent was removed under reduced pressure to obtain phenyl azides (**11a** to **11e**', **11g**', **11h**', and **11j**' to **11p**'), which was used further without purification, whereas the crude product of phenyl azides **11f**' and **11i**' were purified by column chromatography (silica gel, pure hexane).

4.3.2.1. azidobenzene (**11a**)



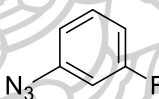
The preparation of azidobenzene (**11a**) was performed starting from aniline **10a** as described in the **general procedure A**. The azide **11a** was obtained as a black oil (715 mg, 100%). The product was used in the next step without further purification. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.94 (br dd, 2H, *J* = 8.7 and 1.2 Hz), 7.06 (br td, 1H, *J* = 8.4 and 1.2 Hz) and 7.26 (br t, 2H, *J* = 8.1 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 140.1, 129.8 (2C), 124.9 and 119.1 (2C).

4.3.2.2. 1-azido-2-fluorobenzene (**11b**)



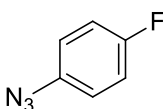
The preparation of 1-azido-2-fluorobenzene (**11b**) was performed starting from aniline **10b** as described in the **general procedure A**. The azide **11b** was obtained as a brown oil (816 mg, 99% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.10-7.26 (m, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 154.3 (d, $J = 245.3$ Hz), 127.5 (d, $J = 10.5$ Hz), 126.7 (d, $J = 7.50$ Hz), 125.9 (d, $J = 3.8$ Hz), 121.6 and 117.1 (d, $J = 18.0$ Hz); ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -128.75 (1F).

4.3.2.3. 1-azido-3-fluorobenzene (**11c**)



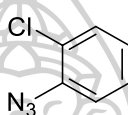
The preparation of 1-azido-3-fluorobenzene (**11c**) was performed starting from aniline **10c** as described in the **general procedure A**. The azide **11c** was obtained as a deep brown oil (790 mg, 96% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.73 (dt, 1H, $J = 9.6$ and 2.4 Hz), 6.83 (dd, 1H, $J = 8.1$ and 2.1 Hz), 6.85 (dddd, 1H, $J = 11.1, 9.0, 2.4$ and 0.6 Hz) and 7.30 (ddd, 1H, $J = 14.7, 8.1$ and 6.3 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 163.5 (d, $J = 246.0$ Hz), 141.9 (d, $J = 9.8$ Hz), 142.0 (d, $J = 9.8$ Hz), 114.7 (d, $J = 3.0$ Hz), 111.9 (d, $J = 21.0$ Hz) and 106.8 (d, $J = 25.5$ Hz); ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -113.00 (1F).

4.3.2.4. 1-azido-4-fluorobenzene (**11d**)



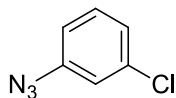
The preparation of 1-azido-4-fluorobenzene (**11d**) was performed starting from aniline **10d** as described in the **general procedure A**. The azide **11d** was obtained as a brown black oil (814 mg, 99% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.94-7.10 (m, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 160.0 (d, $J = 242.7$ Hz), 135.8, (d, $J = 2.9$ Hz), 120.3 (2C, d, $J = 8.2$ Hz) and 116.6 (2C, d, $J = 23.1$ Hz); ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ -118.46 (1C).

4.3.2.5. 1-azido-2-chlorobenzene (**11e**)



The preparation of 1-azido-2-chlorobenzene (**11e**) was performed starting from aniline **10e** as described in the **general procedure A**. The azide **11e** was obtained as a brown oil (875 mg, 95% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.07 (td, 1H, $J = 7.8$ and 1.5 Hz), 7.17 (dd, 1H, $J = 8.1$ and 1.5 Hz), 7.29 (td, 1H, $J = 8.1$ and 1.5 Hz) and 7.37 (dd, 1H, $J = 8.1$ and 1.5 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 137.2, 130.7, 127.9, 125.6, 125.0 and 119.7.

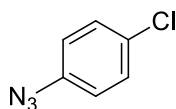
4.3.2.6. 1-azido-3-chlorobenzene (**11f**)



The preparation of 1-azido-3-chlorobenzene (**11f**) was performed starting from aniline **10f** as described in the **general procedure A**. The azide **11f** was obtained as a light brown oil (875 mg, 95% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.90 (ddd, 1H, $J = 8.1$, 2.1 and 0.9 Hz), 7.00 (t, 1H, $J = 2.1$ Hz), 7.10 (ddd, 1H, $J = 8.1$, 2.1 and 0.9 Hz) and

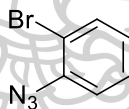
7.26 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 141.5, 135.5, 130.6, 125.0, 119.0 and 117.2.

4.3.2.7. 1-azido-4-chlorobenzene (**11g**)

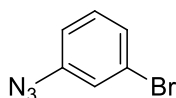


The preparation of 1-azido-4-chlorobenzene (**11g**) was performed starting from aniline **10g** as described in the **general procedure A**. The azide **11g** was obtained as a light brown oil (912 mg, 99% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.92 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz) and 7.23 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 138.7, 130.2, 129.82 (2C) and 120.2 (2C).

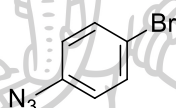
4.3.2.8. 1-azido-2-bromobenzene (**11h**)



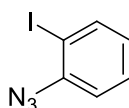
The preparation of 1-azido-2-bromobenzene (**11h**) was performed starting from aniline **10h** as described in the **general procedure A**. The azide **11h** was obtained as a deep brown oil (1.19 g, 100% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.99 (td, 1H, $J = 7.9$ and 1.5 Hz), 7.15 (dd, 1H, $J = 8.0$ and 1.5 Hz), 7.33 (td, 1H, $J = 8.0$ and 1.4 Hz) and 7.53 (dd, 1H, $J = 8.0$ and 1.4 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 138.5, 133.7, 128.5, 125.9, 119.4 and 113.9.

4.3.2.9. 1-azido-3-bromobenzene (**11i**)

The preparation of 1-azido-3-bromobenzene (**11i**) was performed starting from aniline **10i** as described in the **general procedure A**. The azide **11i** was obtained as a deep brown oil (1.19 g, 100% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.94 (ddd, 1H, $J = 7.8$, 2.2 and 1.3 Hz), 7.16 (t, 1H, $J = 1.9$ Hz), 7.19 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz) and 7.25 (dt, 1H, $J = 8.0$ and 1.3 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 141.3, 130.6, 127.8, 123.2, 122.0 and 117.5.

4.3.2.10. 1-azido-4-bromobenzene (**11j**)

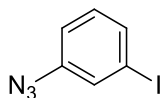
The preparation of 1-azido-4-bromobenzene (**11j**) was performed starting from aniline **10j** as described in the **general procedure A**. The azide **11j** was obtained as a brown oil (1.19 g, 100% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.95 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz) and 7.41 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 139.2, 132.7 (2C), 120.6 (2C) and 117.7.

4.3.2.11. 1-azido-2-iodobenzene (**11k**)

The preparation of 1-azido-2-iodobenzene (**11k**) was performed starting from aniline **10k** as described in the **general procedure A**. The azide **11k** was obtained as a black brown oil (1.41 g, 96% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.86 (td, 1H, $J = 7.8$ and 1.5 Hz), 7.13

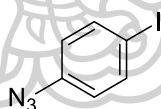
(dd, 1H, $J = 8.1$ and 1.5 Hz), 7.38 (td, 1H, $J = 7.5$ and 1.5 Hz) and 7.78 (dd, 1H, $J = 7.9$ and 1.5 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 140.8, 139.3, 128.9, 125.6, 117.8 and 87.7.

4.3.2.12. 1-azido-3-iodobenzene (**11l**)

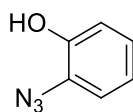


The preparation of 1-azido-3-iodobenzene (**11l**) was performed starting from aniline **10l** as described in the **general procedure A**. The azide **11l** was obtained as a black brown oil (1.46 g, 99% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.98 (ddd, 1H, $J = 8.1$, 2.1 and 1.2 Hz), 7.06 (dd, 1H, $J = 8.1$ and 7.5 Hz), 7.37 (dd, 1H, $J = 2.1$ and 1.5 Hz) and 7.46 (dt, 1H, $J = 7.5$ and 1.5 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 140.8, 133.5, 130.6, 127.6, 118.0 and 94.91.

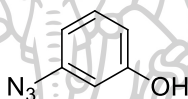
4.3.2.13. 1-azido-4-iodobenzene (**11m**)



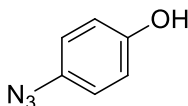
The preparation of 1-azido-4-iodobenzene (**11m**) was performed starting from aniline **10m** as described in the **general procedure A**. The azide **11m** was obtained as a black brown oil (1.46 g, 99% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.74 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz) and 7.60 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 139.8, 138.6 (2C), 120.9 (2C) and 88.3.

4.3.2.14. 2-azidophenol (**11n**)

The preparation of 2-azidophenol (**11n**) was performed starting from aniline **10n** as described in the **general procedure A**. The azide **11n** was obtained as a black brown oil (1.24 g, 100% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 5.41 (brs, 1H), 6.88 (m, 2H) and 6.99 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 147.3, 126.0 (2C), 121.3, 118.5 and 116.2.

4.3.2.15. 3-azidophenol (**11o**)

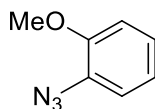
The preparation of 3-azidophenol (**11o**) was performed starting from aniline **10o** as described in the **general procedure A**. The azide **11o** was obtained as a black brown oil (1.24 g, 100% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 5.14 (s, 1H), 6.49 (t, 1H, $J = 2.2$ Hz), 6.61 (dt, 2H, $J = 8.1$ and 2.3 Hz) and 7.18 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 156.7, 141.4, 130.8, 112.2, 111.5 and 106.3.

4.3.2.16. 4-azidophenol (**11p**)

The preparation of 4-azidophenol (**11p**) was performed starting from aniline **10p** as described in the **general procedure A**. The azide **11p** was obtained as a black brown oil (1.24 g, 100% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 6.81 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz), 6.89 (d,

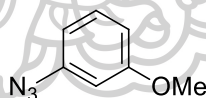
2H, $J = 9.0$ Hz) and 9.57 (brs, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 155.2, 129.9, 120.2 (2C) and 116.8 (C2).

4.3.2.17. 1-azido-2-methoxybenzene (**11q**)

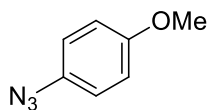


The preparation of 1-azido-2-methoxybenzene (**11q**) was performed starting from aniline **10q** as described in the **general procedure A**. The azide **11q** was obtained as a black brown oil (886 mg, 99% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.86 (s, 3H), 6.89 (ddd, 1H, $J = 8.1, 7.8$ and 1.5 Hz), 6.93 (dd, 1H, $J = 7.2$ and 1.5 Hz), 7.00 (dd, 1H, $J = 7.8$ and 1.8 Hz) and 7.09 (ddd, 1H, $J = 8.1, 7.2$ and 1.8 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 151.7, 127.6, 125.1, 120.6, 119.9, 111.4 and 55.0.

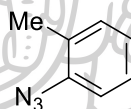
4.3.2.18. 1-azido-3-methoxybenzene (**11r**)



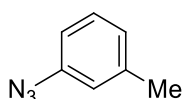
The preparation of 1-azido-3-methoxybenzene (**11r**) was performed starting from aniline **10r** as described in the **general procedure A**. The azide **11r** was obtained as a black oil (886 mg, 99% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.79 (s, 3H), 6.54 (dd, 1H, $J = 2.4$ and 2.1 Hz), 6.64 (ddd, 1H, $J = 8.1, 2.1$ and 0.9 Hz), 6.68 (ddd, 1H, $J = 8.1, 2.4$ and 0.9 Hz) and 7.25 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 160.7, 141.1, 130.2, 111.0, 110.4, 104.8 and 54.9.

4.3.2.19. 1-azido-4-methoxybenzene (**11s**)

The preparation of 1-azido-4-methoxybenzene (**11s**) was performed starting from aniline **10s** as described in the **general procedure A**. The azide **11s** was obtained as a black oil (877 mg, 98% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.79 (s, 3H), 6.88 (d, 2H, $J = 9.3$ Hz) and 6.95 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 156.9, 132.0, 119.7 (2C), 114.8 (2C) and 55.0.

4.3.2.20. 1-azido-2-methylbenzene (**11t**)

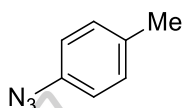
The preparation of 1-azido-2-methylbenzene (**11t**) was performed starting from aniline **10t** as described in the **general procedure A**. The azide **11t** was obtained as a black oil (799 mg, 100% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.18 (s, 3H), 7.00 (td, 1H, $J = 7.2$ and 1.2 Hz), 7.06 (brd, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.12 (brd, 1H, $J = 7.2$ Hz) and 7.19 (td, 1H, $J = 8.1$ and 1.2 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 138.4, 131.1, 129.6, 127.1, 124.6, 117.9 and 17.2.

4.3.2.21. 1-azido-3-methylbenzene (**11u**)

The preparation of 1-azido-3-methylbenzene (**11u**) was performed starting from aniline **10u** as described in the **general procedure A**. The azide **11u** was obtained as a black oil (799 mg, 100% yield). The product was used in the next step

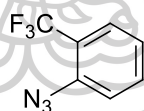
without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.34 (s, 3H), 6.80-6.85 (m, 2H), 6.94 (brd, 1H, $J = 7.8$ Hz) and 7.22 (dd, 1H, $J = 8.7$ and 7.8 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 139.9, 138.8, 129.5, 125.8, 119.6, 116.1 and 21.3.

4.3.2.22. 1-azido-4-methylbenzene (**11v**)

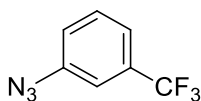


The preparation of 1-azido-4-methylbenzene (**11v**) was performed starting from aniline **10v** as described in the **general procedure A**. The azide **11v** was obtained as a black oil (799 mg, 100% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.30 (s, 3H), 6.89 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz) and 7.12 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 137.2, 134.6, 130.3 (2C), 118.9 (2C) and 20.8.

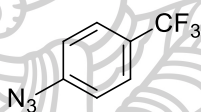
4.3.2.23. 1-azido-2-(trifluoromethyl)benzene (**11w**)



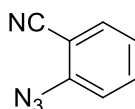
The preparation of 1-azido-2-(trifluoromethyl)benzene (**11w**) was performed starting from aniline **10w** as described in the **general procedure A**. The azide **11w** was as a yellow oil (1.16 g, 100% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (ppm): 7.35 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.55 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.71 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz) and 7.73 (t, 1H, $J = 7.7$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 137.9 (q, $J = 0.8$ Hz), 134.1, 127.1 (q, $J = 5.3$ Hz), 125.0, 123.1 (q, $J = 270.8$ Hz), 120.6 and 119.3 (q, $J = 30.8$ Hz); ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -62.04 (3F).

4.3.2.24. 1-azido-3-(trifluoromethyl)benzene (**11x**)

The preparation of 1-azido-3-(trifluoromethyl)benzene (**11x**) was performed starting from aniline **10x** as described in the **general procedure A**. The azide **11x** was as a yellow oil (1.16 g, 100% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (ppm): 7.35 (brs, 1H), 7.43 (ddd, 1H, $J = 8.0, 1.3$ and 0.6 Hz), 7.51 (dt, 1H, $J = 7.8$ and 0.7 Hz) and 7.63 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 140.7, 131.1, 130.7 (q, $J = 32.3$ Hz), 123.6 (q, $J = 270.8$ Hz), 123.1, 121.5 (q, $J = 4.5$ Hz) and 115.8 (q, $J = 3.8$ Hz); ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -62.36 (3F).

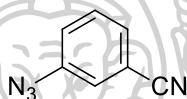
4.3.2.25. 1-azido-4-(trifluoromethyl)benzene (**11y**)

The preparation of 1-azido-4-(trifluoromethyl)benzene (**11y**) was performed starting from aniline **10y** as described in the **general procedure A**. The azide **11y** was as a yellow oil (1.16 g, 100% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (ppm): 7.29 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz) and 7.72 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 143.7, 127.0 (2C, q, $J = 3.8$ Hz), 125.4 (q, $J = 32.3$ Hz), 124.1 (q, $J = 270.0$ Hz) and 119.8 (2C); ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -62.35 (3F).

4.3.2.26. 2-azidobenzonitrile (**11z**)

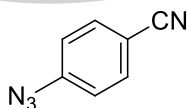
The preparation of 2-azidobenzonitrile (**11z**) was performed starting from aniline **10z** as described in the **general procedure A**. The azide **11z** was as a brown solid (865 mg, 100% yield). The product was used in the next step without further purification. mp = 47-48 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.23 (td, 1H, J = 7.8 and 0.9 Hz), 7.27 (dd, 1H, J = 8.7 and 0.9 Hz), 7.61 (dd, 1H, J = 7.5 and 1.2 Hz) and 7.63 (td, 1H, J = 7.5 and 1.5 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 143.3, 134.2, 133.9, 125.1, 118.9, 115.6 and 104.0.

4.3.2.27. 3-azidobenzonitrile (**11a'**)

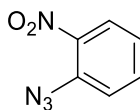


The preparation of 3-azidobenzonitrile (**11a'**) was performed starting from aniline **10a'** as described in the **general procedure A**. The azide **11a'** was as a brown solid (822 mg, 95% yield). The product was used in the next step without further purification. mp = 52-53 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.24-7.29 (m, 2H), 7.43 (dt, 1H, J = 7.5 and 1.5 Hz) and 7.48 (td, 1H, J = 7.5 and 1.5 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 141.5, 130.7, 128.4, 123.4, 122.4, 117.9 and 113.9.

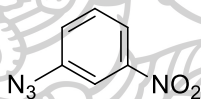
4.3.2.28. 4-azidobenzonitrile (**11b'**)



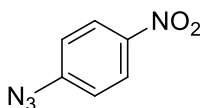
The preparation of 4-azidobenzonitrile (**11b'**) was performed starting from aniline **10b'** as described in the **general procedure A**. The azide **11b'** was as a brown solid (856 mg, 99% yield). The product was used in the next step without further purification. mp = 58-59 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.11 (d, 2H, J = 9.0 Hz) and 7.65 (d, 2H, J = 9.0 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 144.9, 133.9 (2C), 119.8 (2C), 118.4 and 108.3.

4.3.2.29. 1-azido-2-nitrobenzene (**11c'**)

The preparation of 1-azido-2-nitrobenzene (**11c'**) was performed starting from aniline **10c'** as described in the **general procedure A**. The azide **11c'** was as a light brown solid (975 mg, 99% yield). The product was used in the next step without further purification. mp = 40-41 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.27 (ddd, 1H, *J* = 8.4, 7.5 and 1.2 Hz), 7.35 (dd, 1H, *J* = 8.4 and 1.2 Hz), 7.64 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 7.5 and 1.5 Hz) and 7.93 (dd, 1H, *J* = 8.1 and 1.5 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 140.8, 134.7, 134.2, 126.0, 125.1 and 120.9.

4.3.2.30. 1-azido-3-nitrobenzene (**11d'**)

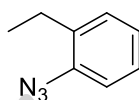
The preparation of 1-azido-3-nitrobenzene (**11d'**) was performed starting from aniline **10d'** as described in the **general procedure A**. The azide **11d'** was as a light brown solid (975 mg, 99% yield). The product was used in the next step without further purification. mp = 51-52 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.35 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 2.1 and 0.9 Hz), 7.55 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.89 (t, 1H, *J* = 2.1 Hz) and 8.00 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 2.1 and 0.9 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 149.2, 142.0, 130.7, 125.0, 119.7 and 114.1.

4.3.2.31. 1-azido-4-nitrobenzene (**11e'**)

The preparation of 1-azido-4-nitrobenzene (**11e'**) was performed starting from aniline **10e'** as described in the **general procedure A**. The azide **11e'** was as a light brown solid (985 mg, 100% yield). The product was used in the next step without

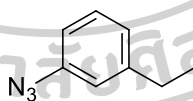
further purification. mp = 72-73 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.14 (d, 2H, J = 9.3 Hz) and 8.24 (d, 2H, J = 9.3 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 146.9, 144.7, 125.9 (2C) and 119.4 (2C).

4.3.2.32. 1-azido-2-ethylbenzene (**11f'**)

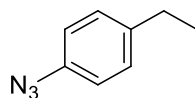


The preparation of 1-azido-2-ethylbenzene (**11f'**) was performed starting from aniline **10f'** as described in the **general procedure A**. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, pure hexane) to obtain the product **11f'** as a yellow oil (706 mg, 80% yield). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.17 (t, 3H, J = 7.5 Hz), 2.59 (q, 2H, J = 7.5 Hz), 7.06 (td, 1H, J = 7.5 and 1.2 Hz), 7.11 (dd, 1H, J = 7.8 and 1.2 Hz), 7.17 (ddd, 1H, J = 7.5, 1.2 and 0.6 Hz) and 7.22 (ddd, 1H, J = 8.7, 7.8 and 1.5 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 137.8, 135.7, 129.6, 127.1, 124.8, 118.0, 24.3 and 14.6.

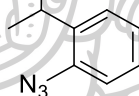
4.3.2.33. 1-azido-3-ethylbenzene (**11g'**)



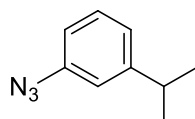
The preparation of 1-azido-3-ethylbenzene (**11g'**) was performed starting from aniline **10g'** as described in the **general procedure A**. The azide **11g'** was as a black oil (865 mg, 98% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.22 (t, 3H, J = 7.6 Hz), 2.63 (q, 2H, J = 7.6 Hz), 6.81-6.87 (m, 2H), 6.97 (brd, 1H, J = 7.4 Hz) and 7.24 (dd, 1H, J = 7.8 and 7.6 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 146.3, 140.1, 129.8, 124.7, 118.6, 116.5, 28.9 and 15.4.

4.3.2.34. 1-azido-4-ethylbenzene (**11h'**)

The preparation of 1-azido-4-ethylbenzene (**11h'**) was performed starting from aniline **10h'** as described in the **general procedure A**. The azide **11h'** was as a brown oil (883 mg, 100% yield). The product was used in the next step without further purification. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.21 (t, 3H, *J* = 7.6 Hz), 2.62 (q, 2H, *J* = 7.6 Hz), 6.93 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz) and 7.16 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 141.1, 137.6, 129.3 (2C), 119.1 (2C), 28.5 and 15.7.

4.3.2.35. 1-azido-2-isopropylbenzene (**11i'**)

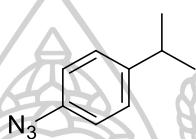
The preparation of 1-azido-2-isopropylbenzene (**11i'**) was performed starting from aniline **10i'** as described in the **general procedure A**. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, pure hexane) to obtain the pure product **11i'** as a colorless oil (745 mg, 75% yield). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.20 (d, 6H, *J* = 6.9 Hz), 3.20 (septet, 1H, *J* = 6.9 Hz), 7.10 (td, 1H, *J* = 7.2 and 1.5 Hz), 7.11 (dd, 1H, *J* = 7.2 and 1.5 Hz), 7.21 (dd, 1H, *J* = 7.2 and 1.5 Hz) and 7.22-7.27 (m, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 140.1, 137.3, 127.0, 126.7, 125.0, 118.1, 28.0 and 22.9 (2C).

4.3.2.36. 1-azido-3-isopropylbenzene (**11j'**)

The preparation of 1-azido-3-isopropylbenzene (**11j'**) was performed starting from aniline **10j'** as described in the **general procedure A**. The azide **11j'** was as a

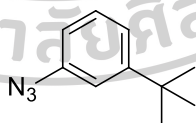
black oil (890 mg, 92% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.24 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz), 2.69 (septet, 1H, $J = 6.9$ Hz), 6.85 (ddd, 1H, $J = 7.8, 2.4$ and 0.9 Hz), 6.87 (t, 1H, $J = 2.1$ Hz), 7.00 (brd, 1H, $J = 7.8$ Hz) and 7.26 (td, 1H, $J = 7.8$ and 0.3 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 150.8, 139.9, 129.6, 123.1, 117.1, 116.4, 34.1 and 23.7 (2C).

4.3.2.37. 1-azido-4-isopropylbenzene (**11k'**)

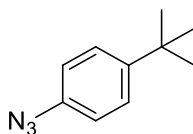


The preparation of 1-azido-4-isopropylbenzene (**11k'**) was performed starting from aniline **10k'** as described in the **general procedure A**. The azide **11k'** was as a brown oil (967 mg, 100% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.23 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz), 2.88 (septet, 1H, $J = 6.9$ Hz), 6.95 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz) and 7.20 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 145.5, 137.5, 127.7 (2C), 118.9 (2C), 33.6, 23.9 (2C).

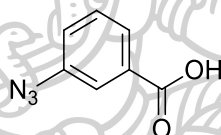
4.3.2.38. 1-azido-3-(tert-butyl)benzene (**11l'**)



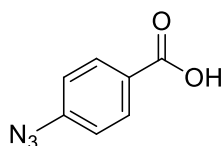
The preparation of 1-azido-3-(tert-butyl)benzene (**11l'**) was performed starting from aniline **10l'** as described in the **general procedure A**. The azide **11l'** was as a yellow oil (1.01 g, 96% yield). The product was used in the next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.31 (s, 9H), 6.86 (ddd, 1H, $J = 7.8, 2.1$ and 1.2 Hz), 7.02 (t, 1H, $J = 2.1$ Hz), 7.16 (ddd, 1H, $J = 7.8, 1.8$ and 1.2 Hz) and 7.28 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 153.2, 139.7, 129.4, 122.1, 116.3, 116.0, 34.8 and 31.2 (3C).

4.3.2.39. 1-azido-4-(tert-butyl)benzene (**11m'**)

The preparation of 1-azido-4-(tert-butyl)benzene (**11m'**) was performed starting from aniline **10m'** as described in the **general procedure A**. The azide **11m'** was as a black brown oil (1.04 g, 99% yield). The product was used in the next step without further purification. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.29 (s, 9H), 6.94 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz) and 7.34 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 148.0, 137.1, 126.7 (2C), 118.6 (2C), 34.4 and 31.3 (3C).

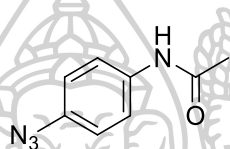
4.3.2.40. 3-azidobenzoic acid (**11n'**)

The preparation of 3-azidobenzoic acid (**11n'**) was performed starting from aniline **10n'** as described in the **general procedure A**. The azide **11n'** was as a light yellow solid (969 mg, 99% yield). The product was used in the next step without further purification. mp = 147-148 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.36 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 2.4 and 0.9 Hz), 7.53 (dd, 1H, *J* = 8.1 and 7.8 Hz), 7.55-7.58 (m, 1H) and 7.75 (dt, 1H, *J* = 7.8 and 1.2 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.5, 139.9, 132.6, 130.3, 125.9, 123.5 and 119.4.

4.3.2.41. 4-azidobenzoic acid (**11o'**)

The preparation of 4-azidobenzoic acid (**11o'**) was performed starting from aniline **10o'** as described in the **general procedure A**. The azide **11o'** was as a brown solid (979 mg, 100% yield). The product was used in the next step without further purification. mp = 177-178 °C; ^1H NMR (300 MHz, MeOD- d_4) δ 7.14 (d, 2H, J = 8.8 Hz) and 8.03 (d, 2H, J = 8.8 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD- d_4) δ 169.2, 146.4, 132.8 (2C), 128.7 and 120.1 (2C).

4.3.2.42. *N*-(4-azidophenyl)acetamide (**11p'**)



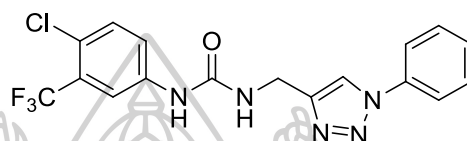
The preparation of *N*-(4-azidophenyl)acetamide (**11p'**) was performed starting from aniline **10p'** as described in the **general procedure A**. The azide **11p'** was as a brown solid (1.05 g, 99% yield). The product was used in the next step without further purification. mp = 115-116 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.03 (s, 3H), 7.05 (d, 2H, J = 8.9 Hz), 7.62 (d, 2H, J = 8.9 Hz) and 10.01 (brs, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 168.3, 136.7, 133.6, 120.5 (2C), 119.4 (2C) and 23.9.

4.3.3. General procedure B for preparation of sorafenib derivatives 12a-12p⁴⁰

To a stirred suspension of the obtained phenyl azides **11** (0.70 mmol, 1.30 eq), ureido alkyne **9** (150 mg, 0.54 mmol, 1.00 eq) and ascorbic acid (5 mg, 0.03 mmol, 0.05 eq) in a solvent mixture of *n*-butanol and water (4.0 mL, 1:1) was added 1M aqueous copper(II)sulfate pentahydrate solution (27 μL , 0.03 mmol, 0.05 eq) at room temperature. The reaction mixture was stirred at 65 °C for 2 h, and then diluted with water (5.0 mL), followed by addition of 10% v/v aq. ammonium hydroxide solution (2.5 mL). After that, the resulting solution was extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic phase was washed with aqueous sodium chloride solution (1 x 20 mL), dried over with anhydrous sodium sulfate and filtered out. The

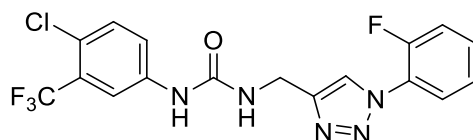
solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, ethyl acetate in hexane) to obtain the product **12a-12p'**.

4.3.3.1. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-phenyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12a**)



The preparation of the target compound **12a** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11a** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% ethyl acetate in hexane) to provide **12a** (209 mg, 98% yield) as an orange-yellow solid. mp = 168-169°C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 4.45 (d, 2H, $J = 3.0$ Hz), 6.91 (br t, 1H, $J = 5.7$ Hz), 7.48 (tt, 1H, $J = 6.6$ and 1.2 Hz), 7.55 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.57-7.64 (m, 3H), 7.89 (dd, 2H, $J = 8.3$ and 1.2 Hz), 8.09 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 8.67 (s, 1H) and 9.13 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 155.0, 146.7, 140.1, 136.8, 132.0, 130.1 (2C), 128.8, 126.8 (q, $J = 30.8$ Hz), 123.0 (q, $J = 271.5$ Hz), 122.7, 121.8 (q, $J = 1.5$ Hz), 121.1, 120.2 (2C), 116.5 (q, $J = 6.0$ Hz) and 35.0; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -63.41 (s, 3F); HRMS (ESI+): $m/z = 396.0838$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; calcd. 395.0839 for $[(\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClF}_3\text{N}_5\text{O})+\text{H}]^+$.

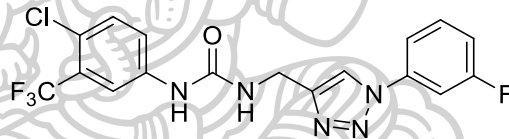
4.3.3.2. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-fluorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12b**)



The preparation of the target compound **12b** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11b** as described in the **general procedure B**. The crude

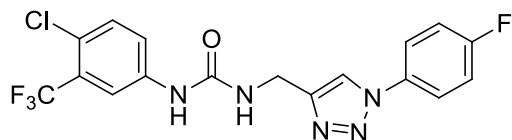
residue was recrystallized using acetone as an solvent to provide **12b** (174 mg, 78% yield) as a white solid. mp = 168-169 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 4.44 (d, 2H, J = 5.6 Hz), 6.92 (brt, 1H, J = 5.7 Hz), 7.34-7.61 (m, 5H), 7.77 (td, 1H, J = 7.8 and 1.6 Hz), 8.00 (d, 1H J = 2.2 Hz), 8.35 (d, 1H, J = 2.1 Hz) and 9.12 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 154.9, 153.8 (d, J = 248.3 Hz), 146.1, 140.0, 131.9, 131.2 (d, J = 7.5 Hz), 126.7 (q, J = 30.8 Hz), 125.9, 125.6 (d, J = 3.8 Hz), 124.8 (d, J = 10.5 Hz), 124.3 (d, J = 4.5 Hz), 122.9 (q, J = 271.5 Hz), 122.5, 121.6 (q, J = 2.3 Hz), 117.4 (d, J = 19.5 Hz), 116.3 (q, J = 6.0 Hz) and 34.8; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -63.31 (3F), -125.54; HRMS (ESI+): m/z = 414.0734 [M+H] $^+$; calcd 414.0745 for [(C₁₇H₁₃ClF₄N₅O)+H] $^+$.

4.3.3.3. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-fluorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12c**)



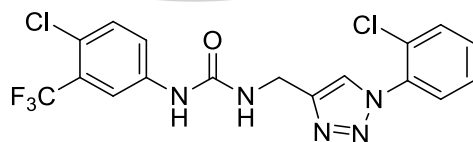
The preparation of the target compound **12c** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11c** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 60% ethyl acetate in hexane) to provide **12c** (206 mg, 92% yield) as a white solid. mp = 182-183 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 4.44 (d, 2H, J = 5.5 Hz), 6.93 (brt, 1H, J = 5.6 Hz), 7.33 (td, 1H, J = 8.6, 2.5 and 0.81 Hz), 7.54 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 7.59 (dd, 1H, J = 8.9 and 2.3 Hz), 7.63 (ddd, 1H, J = 8.3, 8.3 and 6.3 Hz), 7.80 (ddd, 1H, J = 8.1, 2.0 and 0.81 Hz), 7.85 (dt, 1H, J = 10.1 and 2.2 Hz), 8.10 (d, 1H, J = 2.3 Hz), 8.72 (s, 1H), 9.16 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 162.5 (d, J = 243.8 Hz), 154.8, 146.8, 140.0, 137.9 (d, J = 10.5 Hz), 131.9, 131.8 (d, J = 8.3 Hz), 126.6 (q, J = 30.0 Hz), 122.9 (q, J = 271.5 Hz), 122.5, 121.6, 121.1, 116.3 (q, J = 6.0 Hz), 115.9 (d, J = 3.0 Hz), 115.3 (d, J = 20.3 Hz), 107.5 (d, J = 26.3 Hz) and 34.8; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -63.12 (3F), -112.29; HRMS (ESI+): m/z = 414.0743 [M+H] $^+$; calcd 414.0745 for [(C₁₇H₁₃ClF₄N₅O)+H] $^+$.

4.3.3.4. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-fluorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12d**)



The preparation of the target compound **12d** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11d** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 60% ethyl acetate in hexane) to provide **12d** (179 mg, 80% yield) as a white solid. mp = 189-190 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.45 (d, 2H, *J* = 5.6 Hz), 6.91 (brt, 1H, *J* = 5.6 Hz), 7.42 (t, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.53 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.58 (dd, 1H, *J* = 8.8 and 2.3 Hz), 7.94 (dd, 2H, *J* = 13.8 and 9.1 Hz), 8.09 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 8.65 (s, 1H) and 9.13 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.6 (d, *J* = 244.5 Hz), 154.8, 146.6, 140.0, 133.2 (d, *J* = 3.0 Hz), 131.8, 126.6 (q, *J* = 30.8 Hz), 122.9 (q, *J* = 271.5 Hz), 122.4, 122.3 (2C, d, *J* = 9.0 Hz), 121.5 (q, *J* = 1.5 Hz), 121.2, 116.5 (2C, d, *J* = 22.5 Hz), 116.2 (q, *J* = 5.3 Hz) and 34.84; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -63.53 (3F), -115.40; HRMS (ESI+): *m/z* = 414.0733 [M+H]⁺; calcd 414.0745 for [(C₁₇H₁₃ClF₄N₅O)+H]⁺.

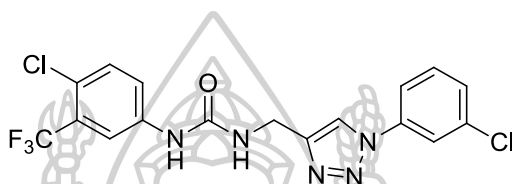
4.3.3.5. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-chlorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12e**)



The preparation of the target compound **12e** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11e** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 40% ethyl acetate in hexane) to provide **12e** (211 mg, 91% yield) as a beige color solid. mp = 147-148 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.47 (d, 2H, *J* = 5.4 Hz), 6.93 (brt, 1H, *J* = 5.6 Hz), 7.51-7.61 (m, 4H), 7.65 (td, 1H, *J* = 7.5 and 2.1 Hz), 7.76 (dd, 1H, *J* = 7.5 and 1.8 Hz), 8.08

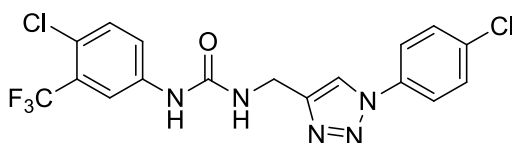
(d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 8.40 (s, 1H) and 9.14 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 154.9, 145.5, 140.0, 134.6, 131.9, 131.6, 130.6, 128.5 (2C), 128.4, 126.7 (q, $J = 30.0$ Hz), 124.9, 122.9 (q, $J = 271.5$ Hz), 122.5, 121.6 (q, $J = 2.3$ Hz), 116.3 (q, $J = 5.3$ Hz) and 34.8; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -63.17 (3F).

4.3.3.6. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-chlorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12f**)



The preparation of the target compound **12f** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11f** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 40% ethyl acetate in hexane) to provide **12f** (200 mg, 86% yield) as a beige color solid. mp = 163-164 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 4.45 (d, 2H, $J = 5.5$ Hz), 6.93 (brt, 1H, $J = 5.6$ Hz), 7.51-7.60 (m, 3H), 7.61 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.92 (ddd, 1H, $J = 7.8, 2.1$ and 1.2 Hz), 8.05 (t, 1H, $J = 2.1$ Hz), 8.10 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 8.76 (s, 1H) and 9.15 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 154.8, 146.8, 140.0, 137.7, 134.2, 131.8, 131.6, 128.3, 126.6 (q, $J = 30.0$ Hz), 122.9 (q, $J = 273.0$ Hz), 122.4, 121.6 (q, $J = 2.3$ Hz), 121.1, 119.7, 118.5, 116.2 (q, $J = 6.0$ Hz) and 34.9; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -63.06 (3F).

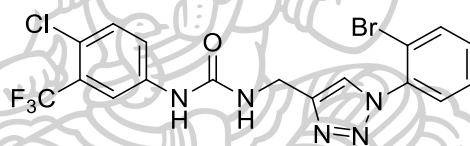
4.3.3.7. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-chlorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12g**)



The preparation of the target compound **12g** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11g** as described in the **general procedure B**. The crude

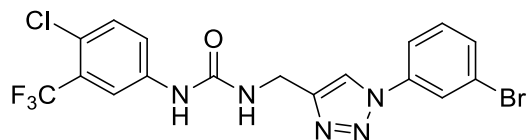
residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% ethyl acetate in hexane) to provide **12g** (230 mg, 99% yield) as a white solid. mp = 203-204 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 4.44 (d, 2H, J = 5.5 Hz), 6.93 (brt, 1H, J = 5.5 Hz), 7.55 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 7.58 (dd, 1H, J = 8.9 and 2.2 Hz), 7.66 (d, 2H, J = 8.9 Hz), 7.95 (d, 2H, J = 8.9 Hz), 8.10 (d, 1H, J = 2.0 Hz), 8.70 (s, 1H) and 9.16 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 154.8, 146.7, 140.0, 135.5, 132.8, 131.8, 129.8 (2C), 126.6 (q, J = 30.0 Hz), 122.9 (q, J = 271.5 Hz), 122.4, 121.6 (2C), 121.6 (q, J = 1.5 Hz), 121.0, 116.3 (q, J = 6.0 Hz) and 34.8; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -63.10 (3F); HRMS (ESI+): m/z = 430.0445 [M+H] $^+$; calcd 430.0449 for [(C $_{17}$ H $_{13}$ Cl $_2$ F $_3$ N $_5$ O)+H] $^+$.

4.3.3.8. 1-((1-(2-bromophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (**12h**)



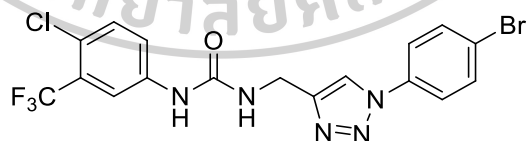
The preparation of the target compound **12h** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11h** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% ethyl acetate in hexane) to provide **12h** (231 mg, 90% yield) as a beige color crystal solid. mp = 144-145 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 4.47 (d, 2H, J = 5.3 Hz), 6.92 (brt, 1H, J = 5.4 Hz), 7.50-7.64 (m, 5H), 7.90 (brd, 1H, J = 7.5 Hz), 8.08 (d, 1H, J = 2.1 Hz), 8.37 (s, 1H) and 9.14 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 155.3, 145.8, 140.1, 136.7, 134.1, 132.3 (2C), 129.4, 129.1, 127.1 (q, J = 30.0 Hz), 125.3, 123.3 (q, J = 270.8 Hz), 122.9, 122.0 (q, J = 1.5 Hz), 119.2, 116.7 (q, J = 5.3 Hz) and 35.2; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -63.07 (3F).

4.3.3.9. 1-((1-(3-bromophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (**12i**)



The preparation of the target compound **12i** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11i** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% ethyl acetate in hexane) to provide **12i** (256 mg, 100% yield) as a white solid. mp = 160-161 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 4.45 (d, 2H, $J = 5.4$ Hz), 6.92 (brt, 1H, $J = 5.4$ Hz), 7.53 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.55 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.59 (dd, 1H, $J = 9.0$ and 2.4 Hz), 7.68 (brdd, 1H, $J = 8.1$ and 0.9 Hz), 7.95 (brdd, 1H, $J = 8.1$ and 1.2 Hz), 8.10 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 8.17 (t, 1H, $J = 1.8$ Hz), 8.76 (s, 1H) and 9.15 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 154.8, 146.8, 140.0, 137.8, 131.8, 131.7 (2C), 131.2, 126.6 (q, $J = 30.0$ Hz), 122.9 (q, $J = 271.5$ Hz), 122.5 (2C), 121.6 (q, $J = 2.3$ Hz), 121.1, 118.9, 116.4 (q, $J = 6.8$ Hz) and 34.8; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -63.07 (3F).

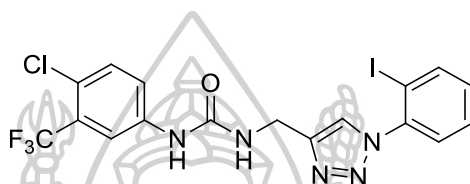
4.3.3.10. 1-((1-(4-bromophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (**12j**)



The preparation of the target compound **12j** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11j** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% ethyl acetate in hexane) to provide **12j** (223 mg, 87% yield) as a white solid. mp = 206-207 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 4.44 (d, 2H, $J = 5.5$ Hz), 6.93 (brt, 1H, $J = 5.6$ Hz), 7.54 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.58 (dd, 1H, $J = 8.9$ and 2.3 Hz), 7.78 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz), 7.88 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz), 8.09 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 8.70 (s, 1H) and 9.16 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz,

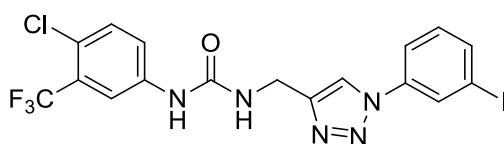
DMSO- d_6) δ 154.8, 146.8, 140.0, 135.9, 132.7 (2C), 131.8, 126.6 (q, J = 30.8 Hz), 122.9 (q, J = 271.5 Hz), 122.4, 121.9 (2C), 121.5, 121.2, 121.0, 116.3 (q, J = 5.3 Hz) and 34.8; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -63.13 (3F); HRMS (ESI+): m/z = 475.9930 $[\text{M}+\text{H}]^+$; calcd 473.9944 for $[(\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{BrClF}_3\text{N}_5\text{O})+\text{H}]^+$.

4.3.3.11. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-iodophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12k**)



The preparation of the target compound **12k** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11k** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% ethyl acetate in hexane) to provide **12k** (197 mg, 70% yield) as a light-yellow solid. mp = 165-166 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 4.47 (d, 2H, J = 5.3 Hz), 6.93 (brt, 1H, J = 5.3 Hz), 7.35 (td, 1H, J = 7.7 and 1.5 Hz), 7.46-7.65 (m, 4H), 8.08 (d, 1H, J = 6.5 Hz), 8.09 (d, 1H, J = 2.5 Hz), 8.32 (s, 1H) and 9.16 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 154.7, 145.3, 140.0, 139.8, 139.7, 131.8, 131.7, 129.3, 127.9, 126.6 (q, J = 30.8 Hz), 124.5, 122.8 (q, J = 270.8 Hz), 122.4, 121.6, 116.3 (q, J = 6.0 Hz), 95.4 and 34.8; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -63.05 (3F).

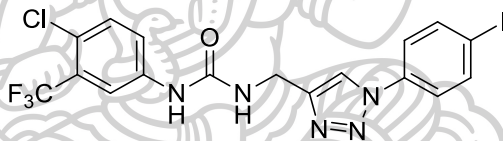
4.3.3.12. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-iodophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12l**)



The preparation of the target compound **12l** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11l** as described in the **general procedure B**. The crude

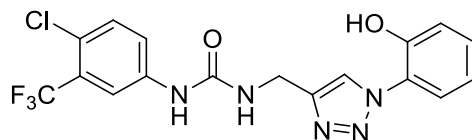
residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 40% ethyl acetate in hexane) to provide **12l** (259 mg, 92% yield) as a beige color solid. mp = 164-165 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 4.44 (d, 2H, J = 5.4 Hz), 6.92 (brt, 1H, J = 5.4 Hz), 7.36 (dd, 1H, J = 8.1 and 7.8 Hz), 7.54 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 7.59 (dd, 1H, J = 9.0 and 2.4 Hz), 7.83 (ddd, 1H, J = 7.8, 1.5 and 0.9 Hz), 7.95 (ddd, 1H, J = 8.1, 2.1 and 0.6 Hz), 8.10 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 8.28 (dd, 1H, J = 2.1 and 1.5 Hz), 8.71 (s, 1H) and 9.14 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 154.8, 146.8, 140.0, 137.6, 137.2, 131.9, 131.7, 128.0, 126.6 (q, J = 30.0 Hz), 122.9 (q, J = 271.5 Hz), 122.5, 121.6 (q, J = 2.3 Hz), 121.1, 119.3, 116.3 (q, J = 6.0 Hz), 95.4 and 34.8; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -63.07 (3F).

4.3.3.13. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-iodophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12m**)



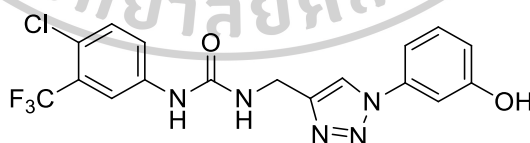
The preparation of the target compound **12m** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11m** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 40% ethyl acetate in hexane) to provide **12m** (251 mg, 89% yield) as a yellow solid. mp = 195-196 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 4.44 (d, 2H, J = 5.5 Hz), 6.92 (brt, 1H, J = 5.5 Hz), 7.54 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 7.58 (dd, 1H, J = 8.9 and 2.1 Hz), 7.73 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.94 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 8.09 (d, 1H, J = 2.0 Hz), 8.68 (s, 1H) and 9.15 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 154.9, 146.8, 140.0, 138.6 (2C), 136.4, 131.9, 126.6 (q, J = 30.0 Hz), 122.9 (q, J = 271.5 Hz), 122.5, 121.9 (2C), 121.6 (q, J = 2.3 Hz), 120.9, 116.3 (q, J = 5.3 Hz), 94.1 and 34.9; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -63.26 (3F).

4.3.3.14. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-hydroxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12n**)



The preparation of the target compound **12n** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11n** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% ethyl acetate in hexane) to provide **12n** (220 mg, 99% yield) as a brown-red solid. mp = 202-203 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 4.44 (d, 2H, J = 5.4 Hz), 6.90 (brt, 1H, J = 5.5 Hz), 6.98 (td, 1H, J = 8.0 and 1.0 Hz), 7.10 (dd, 1H, J = 8.2 and 0.9 Hz), 7.33 (td, 1H, J = 8.3 and 1.6 Hz), 7.54 (d, 1H, J = 8.9 Hz), 7.58 (dd, 2H, J = 7.9 and 1.6 Hz), 8.07 (d, 1H, J = 2.2 Hz), 8.33 (s, 1H), 9.12 (s, 1H) and 10.53 (brs, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 154.9, 149.5 (recheck! C-O), 145.1, 140.0, 131.9, 130.0, 126.7 (q, J = 30.0 Hz), 125.1, 124.6, 124.2, 122.9 (q, J = 271.5 Hz), 122.4, 121.6 (q, J = 1.5 Hz), 119.6, 117.1, 116.3 (q, J = 6.0 Hz) and 34.9; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -63.28 (3F).

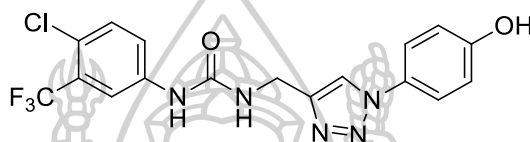
4.3.3.15. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-hydroxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12o**)



The preparation of the target compound **12o** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11o** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% ethyl acetate in hexane) to provide **12o** (220 mg, 99% yield) as a white solid. mp = 231-232 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 4.43 (d, 2H, J = 5.4 Hz), 6.86 (ddd, 1H, J = 8.8, 2.2 and 1.1 Hz), 6.90 (brt, 1H, J = 5.6 Hz), 7.24-7.35 (m, 2H), 7.36 (t, 1H, J = 8.5 Hz), 7.54 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 7.59 (dd, 1H, J = 8.9 and 2.3 Hz), 8.09 (d, 1H, J = 2.2 Hz), 8.59 (s, 1H), 9.13 (s,

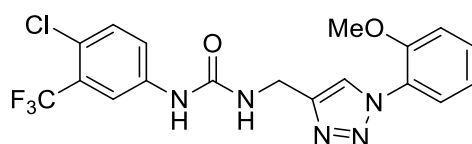
1H) and 10.00 (brs, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 158.5, 154.8, 146.4, 140.0, 137.7, 131.9, 130.8, 126.7 (q, $J = 30.8$ Hz), 122.9 (q, $J = 271.5$ Hz), 122.5, 121.6 (q, $J = 2.3$ Hz), 120.9, 116.3 (q, $J = 6.0$ Hz), 115.6, 110.4, 107.0 and 34.9; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -63.23 (3F).

4.3.3.16. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-hydroxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12p**)



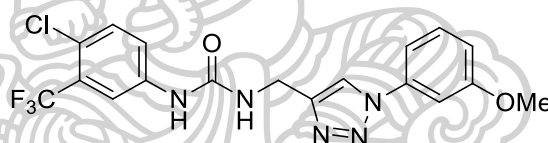
The preparation of the target compound **12p** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11p** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% ethyl acetate in hexane) to provide **12p** (189 mg, 85% yield) as a light brown solid. mp = 139-140 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 4.43 (d, 2H, $J = 5.5$ Hz), 6.88 (brt, 1H, $J = 5.6$ Hz), 6.92 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz), 7.52 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.58 (dd, 1H, $J = 8.9$ and 2.3 Hz), 7.65 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz), 8.09 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 8.46 (s, 1H), 9.11 (s, 1H) and 9.93 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 158.1, 155.3, 146.5, 140.5, 132.3, 129.3, 127.1 (q, $J = 30.8$ Hz), 123.3 (q, $J = 271.5$ Hz), 122.9, 122.3 (2C), 122.0 (q, $J = 1.5$ Hz), 121.3, 116.7 (q, $J = 6.0$ Hz), 116.5 (2C) and 35.3; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -63.47 (3F); HRMS (ESI+): $m/z = 412.0772$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; calcd 412.0788 for $[(\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClF}_3\text{N}_5\text{O}_2)+\text{H}]^+$.

4.3.3.17. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12q**)



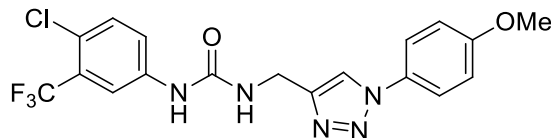
The preparation of the target compound **12q** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11q** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 40% ethyl acetate in hexane) to provide **12q** (202 mg, 88% yield) as a white solid. mp = 176-177 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.84 (s, 3H), 4.44 (d, 2H, *J* = 5.3 Hz), 6.90 (brt, 1H, *J* = 5.4 Hz), 7.13 (td, 1H, *J* = 7.8 and 1.2 Hz), 7.31 (dd, 1H, *J* = 8.4 and 1.2 Hz), 7.48-7.62 (m, 4H), 8.08 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 8.29 (s, 1H) and 9.12 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 154.8, 151.6, 145.1, 140.0, 131.9, 130.6, 126.6 (q, *J* = 30.0 Hz), 125.8, 125.7, 124.6, 122.9 (q, *J* = 270.8 Hz), 122.4, 121.6 (q, *J* = 1.5 Hz), 120.9, 116.3 (q, *J* = 6.0 Hz), 113.0, 56.1 and 34.8; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -63.08 (3F).

4.3.3.18. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12r**)



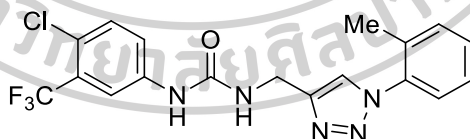
The preparation of the target compound **12r** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11r** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% ethyl acetate in hexane) to provide **12r** (221 mg, 96% yield) as a beige color solid. mp = 164-165 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.84 (s, 3H), 4.44 (d, 2H, *J* = 5.4 Hz), 6.93 (brt, 1H, *J* = 5.4 Hz), 7.03 (ddd, 1H, *J* = 3.0, 2.4 and 0.6 Hz), 7.43-7.51 (m, 3H), 7.54 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8.7 and 2.1 Hz), 8.10 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 8.70 (s, 1H) and 9.15 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.2, 154.8, 146.5, 140.0, 137.8, 131.9, 130.8, 126.6 (q, *J* = 30.0 Hz), 122.9 (q, *J* = 270.8 Hz), 122.4, 121.6 (q, *J* = 1.5 Hz), 121.1, 116.3 (q, *J* = 5.3 Hz), 114.3, 112.0, 105.6, 55.6 and 34.9; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -63.08 (3F).

4.3.3.19. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12s**)



The preparation of the target compound **12s** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11s** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% ethyl acetate in hexane) to provide **12s** (205 mg, 89% yield) as a light orange solid. mp = 156-157 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 3.82 (s, 3H), 4.43 (d, 2H, $J = 5.3$ Hz), 6.90 (brt, 1H, $J = 5.4$ Hz), 7.11 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz), 7.53 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 7.59 (dd, 1H, $J = 9.0$ and 2.4 Hz), 7.79 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz), 8.09 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 8.55 (s, 1H) and 9.13 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 159.2, 154.9, 146.3, 140.0, 131.9, 130.2, 126.7 (q, $J = 30.0$ Hz), 122.9 (q, $J = 271.5$ Hz), 122.5, 121.7 (3F), 120.9, 116.3 (q, $J = 5.3$ Hz), 114.9 (2C), 55.6 and 34.9; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -63.08 (3F).

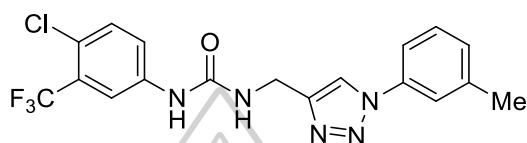
4.3.3.20. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(*o*-tolyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12t**)



The preparation of the target compound **12t** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11t** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% ethyl acetate in hexane) to provide **12t** (182 mg, 82% yield) as a light brown solid. mp = 166-167 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2.14 (s, 3H), 4.46 (d, 2H, $J = 5.3$ Hz), 6.91 (brt, 1H, $J = 5.5$ Hz), 7.37-7.42 (m, 2H), 7.43-7.49 (m, 2H), 7.54 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.59 (dd, 1H, $J = 8.7$ and 2.4 Hz), 8.09 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 8.32 (s, 1H) and 9.13 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 154.9, 145.4, 140.0, 136.4, 133.0, 131.9, 131.4, 129.8, 127.0, 126.7 (q, $J =$

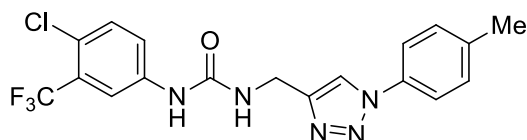
30.8 Hz), 126.0, 124.3, 122.9 (q, $J = 271.5$ Hz), 122.5, 121.6 (q, $J = 2.3$ Hz), 116.3 (q, $J = 6.0$ Hz), 34.9 and 17.5; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -63.18 (3F).

4.3.3.21. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(*m*-tolyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12u**).



The preparation of the target compound **12u** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11u** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 40% ethyl acetate in hexane) to provide **12u** (197 mg, 89% yield) as a white solid. mp = 188-189 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2.40 (s, 3H), 4.44 (d, 2H, $J = 5.4$ Hz), 6.91 (brt, 1H, $J = 5.4$ Hz), 7.28 (brd, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.45 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.54 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.59 (dd, 1H, $J = 9.0$ and 2.4 Hz), 7.68 (brd, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.73 (brs, 1H), 8.09 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 8.62 (s, 1H) and 9.14 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 155.9, 147.4, 141.0, 140.6, 137.6, 132.8, 130.6, 130.1, 127.6 (q, $J = 30.8$ Hz), 123.8 (q, $J = 270.8$ Hz), 123.4, 122.5 (q, $J = 2.3$ Hz), 121.8, 121.3, 118.0, 117.3 (q, $J = 6.0$ Hz), 35.8 and 21.8; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -63.17 (3F).

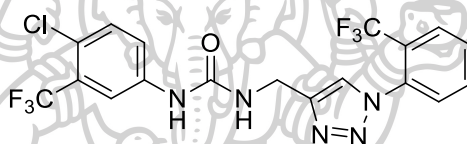
4.3.3.22. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(*p*-tolyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12v**).



The preparation of the target compound **12v** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11v** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 60% ethyl acetate in

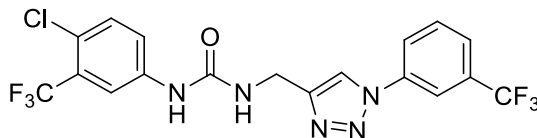
hexane) to provide **12v** (199 mg, 90% yield) as a white solid. mp = 182-183 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.38 (s, 3H), 4.44 (d, 2H, J = 5.5 Hz), 6.92 (brt, 1H, J = 5.6 Hz), 7.38 (d, 2H, J = 8.2 Hz), 7.55 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 7.59 (dd, 1H, J = 8.9 and 2.3 Hz), 7.77 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 8.10 (d, 1H, J = 2.2 Hz), 8.61 (s, 1H) and 9.15 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 154.8, 146.4, 140.0, 138.2, 134.5, 131.9, 130.2 (2C), 126.6 (q, J = 30.0 Hz), 122.9 (q, J = 271.5 Hz), 122.4, 121.6 (q, J = 2.3 Hz), 120.8, 119.9 (2C), 116.2 (q, J = 5.3 Hz), 34.9 and 20.5; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -63.31 (3F).

4.3.3.23. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12w**)



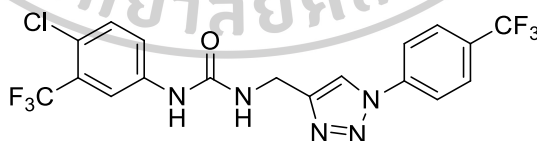
The preparation of the target compound **12w** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11w** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% ethyl acetate in hexane) to provide **12w** (248 mg, 99% yield) as a white solid. mp = 113-114 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 4.45 (d, 2H, J = 5.4 Hz), 6.91 (brt, 1H, J = 5.4 Hz), 7.54 (d, 1H, J = 9.2 Hz), 7.58 (dd, 1H, J = 9.2 and 2.2 Hz), 7.67 (brd, 1H, J = 7.7 Hz), 7.84 (brt, 1H, J = 7.6 Hz), 7.91 (brt, 1H, J = 7.4 Hz), 8.02 (brd, 1H, J = 7.4 Hz), 8.07 (brs, 1H), 8.35 (s, 1H) and 9.15 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 155.0, 145.6, 140.0, 134.4 (q, J = 1.5 Hz), 134.0, 131.9, 131.1, 129.3, 127.5 (q, J = 5.3 Hz), 126.8 (q, J = 30.8 Hz), 125.5, 124.9 (q, J = 3.0 Hz), 123.0 (q, J = 271.5 Hz), 122.9 (q, J = 272.3 Hz), 122.5, 121.7 (q, J = 1.5 Hz), 116.4 (q, J = 5.3 Hz) and 34.8; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -60.05 (3F), -63.42 (3F).

4.3.3.24. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12x**)



The preparation of the target compound **12x** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11x** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 40% ethyl acetate in hexane) to provide **12x** (245 mg, 98% yield) as a white crystal solid. mp = 152-153 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.47 (d, 2H, *J* = 5.5 Hz), 6.94 (brt, 1H, *J* = 5.6 Hz), 7.54 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8.9 and 2.3 Hz), 7.77-7.89 (m, 2H), 8.10 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.21-8.33 (m, 2H), 8.86 (s, 1H) and 9.17 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 154.9, 147.0, 140.0, 137.2, 131.9, 131.3, 130.6 (q, *J* = 32.3 Hz), 126.7 (q, *J* = 30.0 Hz), 125.1 (q, *J* = 3.8 Hz), 123.9, 123.6 (q, *J* = 270.8 Hz), 122.9 (q, *J* = 271.5 Hz), 122.5, 121.6 (q, *J* = 1.5 Hz), 121.3, 116.6 (q, *J* = 3.8 Hz), 116.3 (q, *J* = 5.3 Hz) and 34.9; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -63.01 (3F), -63.23 (3F).

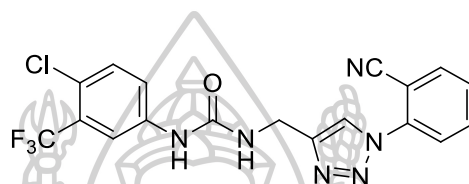
4.3.3.25. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12y**)



The preparation of the target compound **12y** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11y** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 40% ethyl acetate in hexane) to provide **12y** (245 mg, 98% yield) as a white solid. mp = 199-200 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.46 (d, 2H, *J* = 5.5 Hz), 6.94 (brt, 1H, *J* = 5.6 Hz), 7.54 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8.9 and 2.3 Hz), 7.97 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 8.10 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.20 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 8.82 (s, 1H) and 9.17 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz,

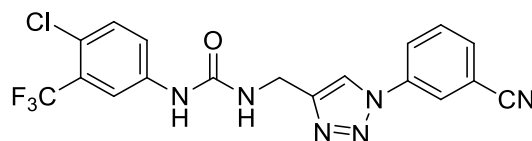
DMSO- d_6) δ 154.9, 147.1, 140.0, 139.5, 131.8, 128.6 (q, $J = 32.3$ Hz), 127.2 (2C, q, $J = 3.8$ Hz), 126.7 (q, $J = 30.0$ Hz), 123.9 (q, $J = 270.8$ Hz), 122.9 (q, $J = 271.5$ Hz), 122.5, 121.6 (q, $J = 1.5$ Hz), 121.2, 120.4 (2C), 116.3 (q, $J = 5.3$ Hz) and 34.9; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -62.74 (3F), -63.19 (3F).

4.3.3.26. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-cyanophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12z**)



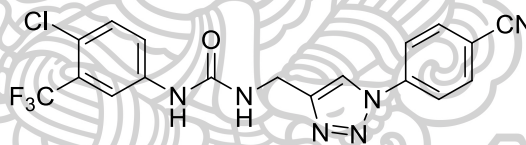
The preparation of the target compound **12z** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11z** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 60% ethyl acetate in hexane) to provide **12z** (216 mg, 95% yield) as a light yellow solid. mp = 162-163 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 4.49 (d, 2H, $J = 5.5$ Hz), 6.97 (brt, 1H, $J = 5.6$ Hz), 7.54 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.59 (dd, 1H, $J = 8.9$ and 2.3 Hz), 7.75 (td, 1H, $J = 7.6$ and 1.2 Hz), 7.85 (dd, 1H, $J = 8.0$ and 1.0 Hz), 7.94 (td, 1H, $J = 8.1$ and 1.4 Hz), 8.10 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 8.12 (dd, 1H, $J = 7.5$ and 1.3 Hz), 8.61 (s, 1H) and 9.17 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 154.9, 146.5, 140.0, 137.9, 134.8, 124.7, 131.8, 130.1, 126.6 (q, $J = 30.0$ Hz), 125.7, 123.7, 122.9 (q, $J = 271.5$ Hz), 122.5, 121.6 (q, $J = 1.5$ Hz), 116.3 (q, $J = 6.0$ Hz), 115.9, 107.0 and 34.8; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -62.08 (3F).

4.3.3.27. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-cyanophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12a'**)



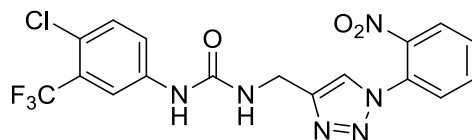
The preparation of the target compound **12a'** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11a'** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 60% ethyl acetate in hexane) to provide **12a'** (220 mg, 97% yield) as a beige color crystal solid. mp = 212-213 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.46 (d, 2H, *J* = 5.5 Hz), 6.95 (brt, 1H, *J* = 5.7 Hz), 7.54 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.58 (dd, 1H, *J* = 8.8 and 2.3 Hz), 7.79 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.94 (tt, 1H, *J* = 7.7 and 1.1 Hz), 8.09 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 8.28 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 2.2 and 1.0 Hz), 8.45 (brt, 1H, *J* = 1.7 Hz), 8.79 (s, 1H) and 9.18 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 155.8, 148.1, 141.0, 138.0, 133.0, 132.8, 132.2, 127.6 (q, *J* = 30.0 Hz), 125.5, 124.2, 123.8 (q, *J* = 271.5 Hz), 123.4, 122.5 (q, *J* = 1.5 Hz), 122.1, 118.8, 117.2 (q, *J* = 5.3 Hz), 113.8 and 35.8; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -62.14 (3F).

4.3.3.28. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-cyanophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12b'**)



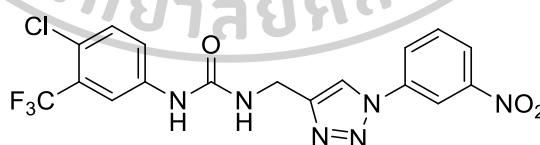
The preparation of the target compound **12b'** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11b'** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% ethyl acetate in hexane) to provide **12b'** (220 mg, 97% yield) as a light yellow crystal solid. mp = 223-224 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.47 (d, 2H, *J* = 5.6 Hz), 6.93 (brt, 1H, *J* = 5.6 Hz), 7.50 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.58 (dd, 1H, *J* = 8.8 and 2.3 Hz), 8.05 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 8.08 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 8.14 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 8.82 (s, 1H) and 9.15 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 154.9, 147.2, 140.0, 139.6, 134.2 (2C), 131.8, 126.6 (q, *J* = 30.0 Hz), 122.9 (q, *J* = 271.5 Hz), 122.4, 121.6 (q, *J* = 2.3 Hz), 121.1, 120.3 (2C), 118.1, 116.3 (q, *J* = 6.8 Hz), 110.9 and 34.8; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -63.19 (3F); HRMS (ESI+): *m/z* = 421.0783 [M+H]⁺; calcd 421.0791 for [(C₁₈H₁₃ClF₃N₆O)+H]⁺.

4.3.3.29. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12c'**)



The preparation of the target compound **12c'** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11c'** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 60% ethyl acetate in hexane) to provide **12c'** (212 mg, 89% yield as a brown solid. mp = 159-160 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 4.47 (d, 2H, $J = 5.5$ Hz), 6.94 (brt, 1H, $J = 5.5$ Hz), 7.55 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 7.59 (dd, 1H, $J = 9.0$ and 2.4 Hz), 7.78-7.87 (m, 2H), 7.94 (ddd, 1H, $J = 9.6$, 8.1 and 1.2 Hz), 8.10 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 8.20 (dd, 1H, $J = 8.1$ and 1.5 Hz), 8.55 (s, 1H) and 9.13 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 154.8, 146.3, 144.1, 140.0, 134.3, 131.9, 131.0, 129.2, 127.4, 126.6 (q, $J = 30.0$ Hz), 125.5, 124.0, 122.9 (q, $J = 271.5$ Hz), 122.5, 121.6 (q, $J = 1.5$ Hz), 116.3 (q, $J = 6.0$ Hz) and 34.7; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -63.11 (3F).

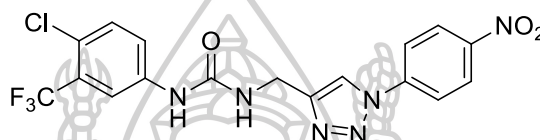
4.3.3.30. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12d'**)



The preparation of the target compound **12d'** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11d'** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 60% ethyl acetate in hexane) to provide **12d'** (226 mg, 95% yield) as a yellow crystal solid. mp = 189-190 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 4.47 (d, 2H, $J = 5.5$ Hz), 6.95 (brt, 1H, $J = 5.7$ Hz), 7.54 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.59 (dd, 1H, $J = 9.0$ and 2.4 Hz), 7.88 (dd, 1H, $J = 8.4$ and 8.1 Hz), 8.10 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 8.31 (ddd, 1H, $J = 8.1$, 2.1 and 0.9 Hz), 8.41 (ddd, 1H, $J =$

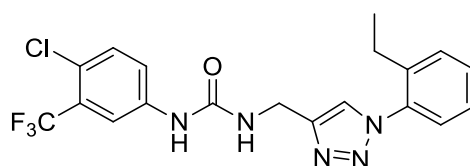
8.4, 2.4 and 0.9 Hz), 8.73 (t, 1H, $J = 2.1$ Hz), 8.92 (s, 1H) and 9.18 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 154.8, 148.5, 147.1, 140.0, 137.2, 131.8, 131.5, 126.6 (q, $J = 30.0$ Hz), 125.9, 122.9, 122.8 (q, $J = 271.5$ Hz), 122.4, 121.5 (q, $J = 1.5$ Hz), 121.4, 116.2 (q, $J = 5.3$ Hz), 114.6, and 34.8; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -63.06 (3F).

4.3.3.31. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12e'**)



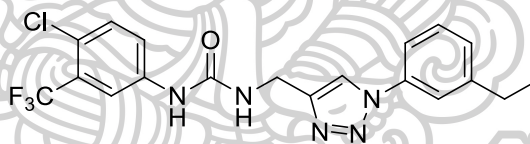
The preparation of the target compound **12e'** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11e'** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 60% ethyl acetate in hexane) to provide **12e'** (219 mg, 92% yield) as a light yellow solid. mp = 176-177 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 4.47 (d, 2H, $J = 5.6$ Hz), 6.96 (brt, 1H, $J = 5.6$ Hz), 7.54 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz), 7.59 (dd, 1H, $J = 8.9$ and 2.3 Hz), 8.10 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 8.23 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz), 8.43 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz), 8.89 (s, 1H) and 9.19 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 154.9, 147.4, 146.6, 140.9, 140.0, 131.9, 126.6 (q, $J = 30.8$ Hz), 125.5 (2C), 122.9 (q, $J = 271.5$ Hz), 122.5, 121.6 (q, $J = 1.5$ Hz), 121.4, 120.5 (2C), 116.3 (q, $J = 6.0$ Hz) and 34.8; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -63.14 (3F); HRMS (ESI+): $m/z = 441.0691$ [M+H] $^+$; calcd 441.0690 for [(C $_{17}$ H $_{13}$ ClF $_3$ N $_6$ O $_3$)+H] $^+$.

4.3.3.32. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-ethylphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12f'**)



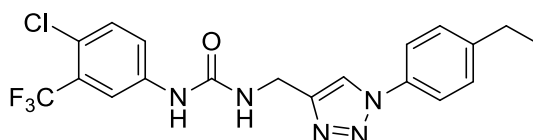
The preparation of the target compound **12f'** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11f'** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 40% ethyl acetate in hexane) to provide **12f'** (215 mg, 94% yield) as a white solid. mp = 153-154 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.01 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 2.42 (q, 2H, *J* = 7.5 Hz), 4.46 (d, 2H, *J* = 5.2 Hz), 6.90 (brt, 1H, *J* = 5.3 Hz), 7.35 (dd, 1H, *J* = 7.8 and 2.1 Hz), 7.40 (td, 1H, *J* = 7.8 and 2.1 Hz), 7.46-7.53 (m, 2H), 7.54 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.59 (dd, 1H, *J* = 9.0 and 2.4 Hz), 8.09 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.29 (s, 1H) and 9.13 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 154.8, 145.3, 140.0, 139.3, 135.8, 131.8, 130.1, 129.8, 126.9, 126.5 (q, *J* = 30.0 Hz), 126.3, 124.6, 122.9 (q, *J* = 270.8 Hz), 122.4, 121.5 (q, *J* = 1.5 Hz), 116.3 (q, *J* = 6.0 Hz), 34.9, 23.7 and 14.8; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -63.07 (3F).

4.3.3.33. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-ethylphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12g'**)



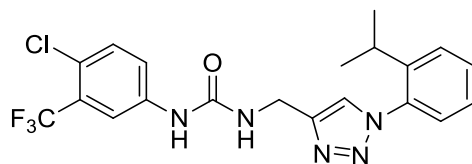
The preparation of the target compound **12g'** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11g'** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 40% ethyl acetate in hexane) to provide **12g'** (224 mg, 98% yield) as a beige color solid. mp = 148-149 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.22 (t, 3H, *J* = 7.6 Hz), 2.70 (q, 2H, *J* = 7.6 Hz), 4.44 (d, 2H, *J* = 5.3 Hz), 6.92 (brt, 1H, *J* = 5.5 Hz), 7.32 (brd, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.48 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.54 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8.7 and 2.4 Hz), 7.70 (brd, 1H, *J* = 7.70 Hz), 7.75 (brs, 1H), 8.10 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 8.65 (s, 1H) and 9.14 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 154.8, 146.5, 145.9, 140.0, 136.7, 131.8, 129.7, 128.0, 126.6 (q, *J* = 30.8 Hz), 122.9 (q, *J* = 271.5 Hz), 122.4, 121.6 (q, *J* = 1.5 Hz), 120.9, 119.3, 117.3, 116.3 (q, *J* = 6.0 Hz), 34.9, 28.0 and 15.4; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -63.06 (3F).

4.3.3.34. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-ethylphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12h'**)



The preparation of the target compound **12h'** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11h'** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 40% ethyl acetate in hexane) to provide **12h'** (229 mg, 100% yield) as a white solid. mp = 169-170 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.21 (t, 3H, *J* = 7.6 Hz), 2.67 (q, 2H, *J* = 7.6 Hz), 4.44 (d, 2H, *J* = 5.3 Hz), 6.91 (brt, 1H, *J* = 5.4 Hz), 7.40 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.54 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8.7 and 2.4 Hz), 7.79 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 8.09 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 8.61 (s, 1H) and 9.13 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 154.8, 146.4, 144.4, 140.0, 134.6, 131.8, 129.0 (2C), 126.6 (q, *J* = 30.8 Hz), 122.9 (q, *J* = 271.5 Hz), 122.4, 121.6 (q, *J* = 2.3 Hz), 120.8, 120.0 (2C), 116.3 (q, *J* = 6.0 Hz), 34.9, 27.7 and 15.4; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -63.06 (3F).

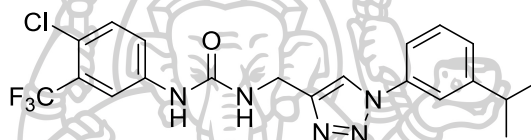
4.3.3.35. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(2-isopropylphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12i'**)



The preparation of the target compound **12i'** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11i'** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 40% ethyl acetate in hexane) to provide **12i'** (187 mg, 79% yield) as a white solid. mp = 172-173 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.11 (d, 6H, *J* = 6.9 Hz), 2.56 (septet, 1H, *J* = 6.9 Hz), 4.46

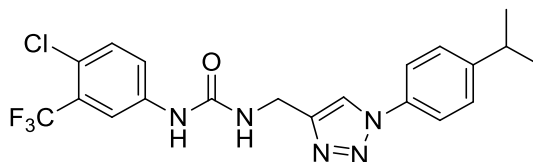
(d, 2H, $J = 5.3$ Hz), 6.93 (brt, 1H, $J = 5.4$ Hz), 7.31 (dd, 1H, $J = 7.2$ and 0.9 Hz), 7.39 (ddd, 1H, $J = 8.7, 7.8$ and 3.0 Hz), 7.50-7.62 (m, 4H), 8.09 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 8.28 (s, 1H) and 9.13 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 154.8, 145.3, 144.2, 140.0, 135.0, 131.8, 130.4, 126.8, 126.7, 126.6 (q, $J = 3.0$ Hz), 126.5, 124.9, 122.9 (q, $J = 271.5$ Hz), 122.4, 121.6 (q, $J = 1.5$ Hz), 116.2 (q, $J = 6.0$ Hz), 34.9, 27.5 and 23.5 (2C); ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -63.07 (3F).

4.3.3.36. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(3-isopropylphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12j'**)



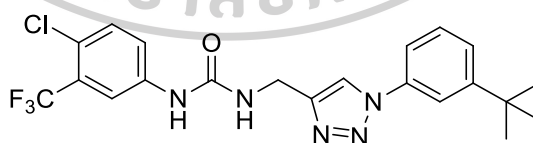
The preparation of the target compound **12j'** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11j'** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 40% ethyl acetate in hexane) to provide **12j'** (208 mg, 88% yield) as a light yellow solid. mp = 162-163 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.24 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz), 2.99 (septet, 1H, $J = 6.9$ Hz), 4.45 (d, 2H, $J = 5.4$ Hz), 6.92 (brt, 1H, $J = 5.5$ Hz), 7.35 (brd, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.48 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.54 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.59 (dd, 1H, $J = 8.7$ and 2.1 Hz), 7.69 (ddd, 1H, $J = 7.8, 2.1$ and 1.2 Hz), 7.75 (brt, 1H, $J = 1.8$ Hz), 8.09 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 8.67 (s, 1H) and 9.14 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 154.8, 150.6, 146.4, 140.0, 136.8, 131.8, 129.8, 126.6 (q, $J = 30.0$ Hz), 126.5, 122.9 (q, $J = 270.8$ Hz), 122.4, 121.6 (q, $J = 1.5$ Hz), 121.0, 118.0, 117.5, 116.3 (q, $J = 6.0$ Hz), 34.9, 34.4 and 23.6 (2C); ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -63.07 (3F).

4.3.3.37. 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((1-(4-isopropylphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)urea (**12k'**)



The preparation of the target compound **12k'** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11k'** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 40% ethyl acetate in hexane) to provide **12k'** (220 mg, 93% yield) as a beige color solid. mp = 156-157 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.23 (d, 6H, *J* = 6.9 Hz), 2.97 (septet, 1H, *J* = 6.9 Hz), 4.44 (d, 2H, *J* = 5.3 Hz), 6.91 (brt, 1H, *J* = 5.4 Hz), 7.44 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 7.54 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8.7 and 2.4 Hz), 7.79 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 8.09 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 8.61 (s, 1H) and 9.13 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 154.8, 150.0, 146.4, 140.1, 134.7, 131.9, 127.6 (2C), 126.7 (q, *J* = 30.8 Hz), 122.9 (q, *J* = 271.5 Hz), 122.4, 121.6 (q, *J* = 1.5 Hz), 120.9, 120.1 (2C), 116.3 (q, *J* = 5.3 Hz), 34.9, 33.1 and 23.7 (2C); ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -63.06 (3F).

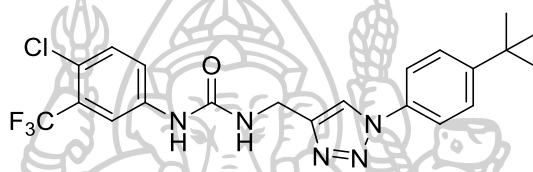
4.3.3.38. 1-((1-(3-(*tert*-butyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (**12l'**)



The preparation of the target compound **12l'** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11l'** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 30% ethyl acetate in hexane) to provide **12l'** (207 mg, 85% yield) as a white solid. mp = 187-188 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.33 (s, 9H), 4.45 (d, 2H, *J* = 5.4 Hz), 6.91 (brt, 1H, *J* = 5.5 Hz), 7.48-7.51 (m, 2H), 7.54 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8.7 and 2.4 Hz), 7.65-

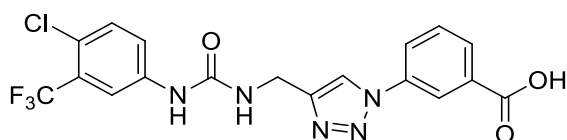
7.73 (m, 1H), 7.84 (brs, 1H), 8.10 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 8.71 (s, 1H) and 9.14 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 154.8, 152.8, 146.4, 140.0, 136.6, 131.8, 129.5, 126.6 (q, $J = 30.0$ Hz), 125.4, 122.9 (q, $J = 270.8$ Hz), 122.4, 121.6 (q, $J = 1.5$ Hz), 121.1, 117.4, 117.0, 116.3 (q, $J = 5.3$ Hz), 34.9, 34.7 and 30.6 (3C); ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -63.06 (3F).

4.3.3.39. 1-((1-(4-(*tert*-butyl)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (**12m'**)



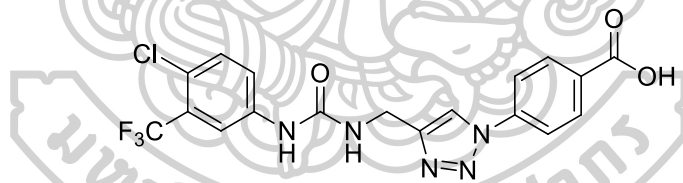
The preparation of the target compound **12m'** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11m'** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 40% ethyl acetate in hexane) to provide **12m'** (212 mg, 87% yield) as a white crystal solid. mp = 94-95 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.31 (s, 9H), 4.44 (d, 2H, $J = 5.3$ Hz), 6.91 (brt, 1H, $J = 5.5$ Hz), 7.50-7.63 (overlapped, 4H), 7.79 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 8.09 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 8.61 (s, 1H) and 9.14 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 154.9, 151.3, 146.4, 140.0, 134.4, 131.9, 126.7 (q, $J = 30.0$ Hz), 126.6 (2C), 122.9 (q, $J = 271.5$ Hz), 122.5, 121.6 (q, $J = 2.3$ Hz), 120.9, 119.8 (2C), 116.3 (q, $J = 6.0$ Hz), 34.9, 34.5 and 31.0 (3C); ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -63.15 (3F); HRMS (ESI+): $m/z = 452.1469$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$; calcd 452.1465 for $[(\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{ClF}_3\text{N}_5\text{O}) + \text{H}]^+$.

4.3.3.40. 3-(4-((3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)benzoic acid (**12n'**)



The preparation of the target compound **12n'** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11n'** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, mixture of 1% formic acid/50% ethyl acetate in hexane) to provide **12n'** (214 mg, 90% yield) as a light brown solid. mp = 246-247 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.46 (d, 2H, *J* = 5.4 Hz), 6.95 (brt, 1H, *J* = 5.5 Hz), 7.54 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8.7 and 2.1 Hz), 7.72 (dd, 1H, *J* = 8.1, 7.8 Hz), 8.02 (brd, 1H, *J* = 8.1 Hz), 8.09 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.16 (brdd, 1H, *J* = 7.8 and 1.5 Hz), 8.40 (brt, 1H, *J* = 1.5 Hz), 8.80 (s, 1H) and 9.18 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.4, 154.9, 146.9, 140.1, 136.9, 132.6, 131.9, 130.4, 129.1, 126.6 (q, *J* = 30.8 Hz), 124.1, 122.9 (q, *J* = 270.8 Hz), 122.4, 121.5 (q, *J* = 2.3 Hz), 121.2, 120.4, 116.3 (q, *J* = 5.3 Hz) and 34.9; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -63.42 (3F).

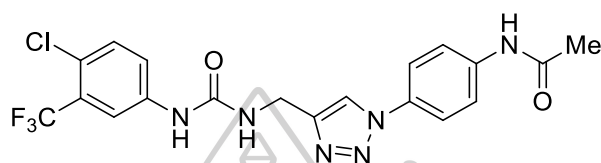
4.3.3.41. 4-(4-((3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)benzoic acid (**12o'**)



The preparation of the target compound **12o'** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11o'** as described in the **general procedure B**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, mixture of 1% formic acid/60% ethyl acetate in hexane) to provide **12o'** (223 mg, 94% yield) as a white solid. mp = 253-254 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.45 (d, 2H, *J* = 5.5 Hz), 6.94 (brt, 1H, *J* = 5.6 Hz), 7.54 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8.9 and 2.3 Hz), 8.05 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz), 8.09 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz), 8.12 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz), 8.78 (s, 1H) and 9.17 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.5, 154.9, 147.0, 140.0, 139.6, 131.9, 131.1 (2C), 130.6, 126.7 (q, *J* = 30.0 Hz), 122.7 (q, *J* = 271.5 Hz), 122.5, 121.7 (q,

$J = 2.3$ Hz), 121.1, 119.7 (2C), 116.3 and 34.9; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -63.17 (3F); HRMS (ESI+): = 440.0728 $[\text{M}+\text{H}]^+$; calcd 440.0737 for $[(\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{ClF}_3\text{N}_5\text{O}_3)+\text{H}]^+$.

4.3.3.42. *N*-(4-(4-((3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)acetamide (**12p'**)



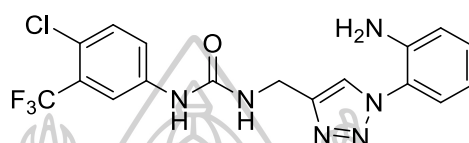
The preparation of the target compound **12p'** was performed starting from ureido alkyne **9** and azide **11p'** as described in the **general procedure B**. The crude residue was recrystallization in acetone as an solvent to provide compound **12p'** (242 mg, 99% yield) as a light brown solid. mp = 238-239 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2.07 (s, 3H), 4.44 (d, 2H, $J = 5.5$ Hz), 6.92 (brt, 1H, $J = 5.6$ Hz), 7.54 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.59 (dd, 1H, $J = 8.7$ and 2.2 Hz), 7.75 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz), 7.81 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz), 8.09 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 8.55 (s, 1H), 9.14 (s, 1H) and 10.18 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 168.7, 154.9, 146.4, 140.0, 139.6, 131.9, 131.7, 126.7 (q, $J = 30.8$ Hz), 122.9 (q, $J = 271.5$ Hz), 121.5, 121.6 (q, $J = 1.5$ Hz), 120.8, 120.6 (2C), 119.7 (2C), 116.3 (q, $J = 5.3$ Hz), 34.9 and 24.0; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -63.82 (3F); HRMS (ESI+): $m/z = 453.1048$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; calcd 453.1054 for $[(\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{ClF}_3\text{N}_6\text{O}_2)+\text{H}]^+$.

4.3.4. General procedure C for preparation of sorafenib derivatives **12q'**-**12s'**⁴¹

A stirred solution of tin (II) chloride dihydrate (208 mg, 0.92 mmol, 4.00 eq) in conc HCl (1.0 mL) was stirred at 0 °C for 5 min and then the compound **12c'** (100 mg, 0.23 mmol, 1.00 eq) was added. The reaction mixture was stirred at 65 °C for 3 h. The resulting solution was then cooled to room temperature, diluted with water (30.0 mL), basified to pH 8 by using an aqueous sodium hydrogen carbonate solution and extracted with ethyl acetate (3x50.0 mL). The combined organic phase was dried

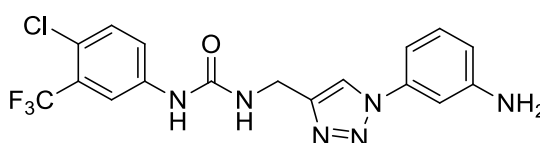
over with anhydrous sodium sulfate and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography (silica gel, ethyl acetate in hexane) to obtain compound **12q'**.

4.3.4.1. 1-((1-(2-aminophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (**12q'**)



The preparation of the target compound **12q'** was performed starting from target compound **12c'** as described in the **general procedure C**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% ethyl acetate in hexane) to provide **12q'** (88 mg, 93% yield) as a light brown-red crystal solid. mp = 107-108 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.46 (d, 2H, *J* = 5.3 Hz), 6.70 (td, 1H, *J* = 7.5 and 1.2 Hz), 6.89 (brt, 1H, *J* = 5.4 Hz), 6.94 (dd, 1H, *J* = 8.1 and 1.2 Hz), 7.21 (td, 1H, *J* = 7.5 and 1.5 Hz), 7.22 (dd, 1H, *J* = 8.1 and 1.2 Hz), 7.54 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 7.59, (dd, 1H, *J* = 9.0 and 2.4 Hz), 8.09 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 8.26 (s, 1H) and 9.15 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 154.8, 145.2, 142.0, 140.0, 131.9, 129.9, 126.6 (q, *J* = 30.0 Hz), 125.2, 123.6, 122.9 (q, *J* = 271.5 Hz), 122.4, 122.2, 121.5, 116.9, 116.4, 116.2 (q, *J* = 5.3 Hz) and 27.9; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -63.07 (3F).

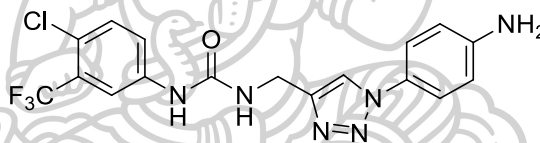
4.3.4.2. 1-((1-(3-aminophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (**12r'**)



The preparation of the target compound **12r'** was performed starting from target compound **12d'** as described in the **general procedure C**. The crude residue

was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% ethyl acetate in hexane) to provide **12r'** (91 mg, 96% yield) as a brown-red solid. mp = 108-109 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.43 (d, 2H, *J* = 5.5 Hz), 6.70 (dd, 1H, *J* = 8.1 and 1.2 Hz), 6.95 (brt, 1H, *J* = 5.4 Hz), 6.99 (dd, 1H, *J* = 7.8 and 1.2 Hz), 7.15 (t, 1H, *J* = 2.1 Hz), 7.22 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.54 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz), 7.59 (dd, 1H, *J* = 9.0 and 2.4 Hz), 8.09 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 8.57 (s, 1H) and 9.21 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 154.8, 148.7, 146.2, 140.0, 137.5, 131.8, 130.2, 126.6 (q, *J* = 30.0 Hz), 122.9 (q, *J* = 271.5 Hz), 122.4, 121.5, 120.7, 116.2 (q, *J* = 5.3 Hz), 114.6, 107.8, 105.6 and 34.9; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -63.55 (3F).

4.3.4.3. 1-((1-(4-aminophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (**12s'**)

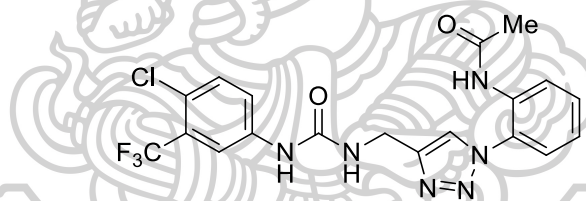


The preparation of the target compound **12s'** was performed starting from target compound **12e'** as described in the **general procedure C**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% ethyl acetate in hexane) to provide **12s'** (89 mg, 94% yield) as a brown solid. mp = 209-210 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.41 (d, 2H, *J* = 5.5 Hz), 6.73 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 6.90 (brt, 1H, *J* = 5.6 Hz), 7.50 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.54 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.59 (dd, 1H, *J* = 8.9 and 2.3 Hz), 8.10 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 8.39 (s, 1H) and 9.14 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 154.8, 147.7, 145.9, 140.0, 131.9, 127.0, 126.6 (q, *J* = 30.0 Hz), 122.9 (q, *J* = 271.5 Hz), 122.5, 121.5 (3C), 120.6, 116.2 (q, *J* = 5.3 Hz), 114.9 (2C) and 34.9; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -63.94 (3F).

4.3.5. General procedure D for preparation of sorafenib derivatives **12t'** and **12u'**

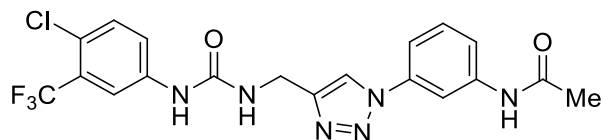
A solution of compound **12q'** (100 mg, 0.24 mmol, 1.00 eq) and acetic anhydride (28 μ L, 0.29 mmol, 1.20 eq) in the mixture of dichloromethane and tetrahydrofuran (1:1; 0.24 M, 1.0 mL) was stirred at room temperature for 10 min. After that, the reaction solution was diluted with water (30.0 mL) and extracted with ethyl acetate (3x30.0 mL). The combined organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography (silica gel, ethyl acetate in hexane) to obtain compound **12t'**.

4.3.5.1. *N*-(2-(4-((3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)acetamide (**12t'**)



The preparation of the target compound **12t'** was performed starting from target compound **12q'** and acetic anhydride as described in the **general procedure D**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, pure ethyl acetate) to provide **12t'** (108 mg, 99% yield) as a beige color solid. mp = 189-190 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.89 (s, 3H), 4.44 (d, 2H, J = 5.4 Hz), 6.91 (brt, 1H, J = 5.6 Hz), 7.39 (td, 1H, J = 7.5 and 1.2 Hz), 7.47-7.61 (overlapped, 4H), 7.63 (dd, 1H, J = 8.1 and 1.2 Hz), 8.11 (d, 1H, J = 1.8 Hz), 8.21 (s, 1H), 9.17 (s, 1H) and 9.60 (brs, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 168.8, 154.8, 145.5, 140.0, 131.8, 131.5, 131.3, 129.6, 127.4, 126.6 (q, J = 20.8 Hz), 126.4, 125.7, 123.7, 122.9 (q, J = 271.5 Hz), 122.4, 121.5, 116.2 (q, J = 6.0 Hz), 34.8 and 22.9; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -63.10 (3F).

4.3.5.2. *N*-(3-(4-((3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)acetamide (**12u'**)



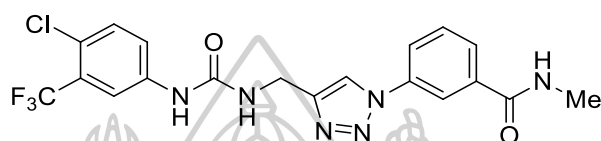
The preparation of the target compound **12u'** was performed starting from target compound **12r'** and acetic anhydride as described in the **general procedure D**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, pure ethyl acetate) to provide **12u'** (104 mg, 96% yield) as a light brown solid. mp = 241-242 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2.08 (s, 3H), 4.45 (d, 2H, $J = 5.3$ Hz), 6.92 (brt, 1H, $J = 5.1$ Hz), 7.41-7.65 (m, 5H), 8.09 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz), 8.27 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 9.13 (s, 1H) and 10.23 (brs, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 168.8, 154.8, 146.5, 140.6, 140.0, 136.9, 131.8, 130.2, 126.6 (q, $J = 30.0$ Hz), 122.9 (q, $J = 271.5$ Hz), 122.4, 121.6 (q, $J = 1.5$ Hz), 120.9, 118.7, 116.3 (q, $J = 6.0$ Hz), 114.4, 110.4, 34.9 and 24.1; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -62.86 (3F); HRMS (ESI+): $m/z = 453.1054$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$; calcd 453.1054 for $[(\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{ClF}_3\text{N}_6\text{O}_2) + \text{H}]^+$.

4.3.6. General procedure E for preparation of sorafenib derivatives **12v'** and **12w'**⁴²

The solution of compound **12n'** (100 mg, 0.23 mmol, 1.00 eq) and 1-[Bis(dimethylamino) methylene] -1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*] pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate (HATU) (95 mg, 0.25 mmol, 1.10 eq) in dry dimethylformamide (0.11 M, 2.1 mL) was stirred at room temperature for 20 min. After that, methylamine hydrochloride (18 μL , 0.46 mmol, 2.00 eq) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (120 μL , 0.69 mmol, 3.00 eq) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 h. Then, the reaction solution was diluted with water (100.0 mL) followed by a saturated sodium chloride solution (5.0 mL), and then extracted with ethyl acetate (3x30.0 mL). The combined organic phase was repeatedly washed with a saturated sodium chloride solution (2x30.0 mL), dried

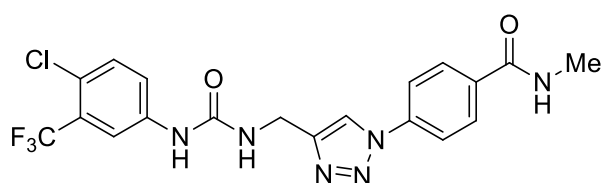
over anhydrous sodium sulfate, and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography (silica gel, ethyl acetate in hexane) to obtain compound **12v'**.

4.3.6.1. 3-(4-((3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N-methylbenzamide (**12v'**)



The preparation of the target compound **12v'** was performed starting from target compound **12n'** and methylamine hydrochloride as described in the **general procedure E**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 80% ethyl acetate in hexane) to provide **12v'** (80 mg, 77% yield) as a white solid. mp = 191-192 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2.81 (d, 3H, $J = 4.5$ Hz), 4.46 (d, 2H, $J = 5.3$ Hz), 6.96 (brt, 1H, $J = 5.4$ Hz), 7.54 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.59 (dd, 1H, $J = 8.9$ and 2.3 Hz), 7.67 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.91 (brd, 1H, $J = 7.9$ Hz), 8.05 (brdd, 1H, $J = 8.0$ and 1.3 Hz), 8.10 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 8.33 (t, 1H, $J = 1.7$ Hz), 8.66 (brd, 1H, $J = 4.4$ Hz), 8.71 (s, 1H) and 9.18 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165.5, 154.9, 146.8, 140.0, 136.7, 136.1, 131.9, 130.1, 127.1, 126.6 (q, $J = 30.8$ Hz), 122.9 (q, $J = 271.5$ Hz), 122.5, 122.4, 121.6, 121.1, 118.6, 116.3 (q, $J = 6.0$ Hz), 34.9 and 26.4; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -62.99 (3F).

4.3.6.2. 4-(4-((3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-N-methylbenzamide (**12w'**)



The preparation of the target compound **12w'** was performed starting from target compound **12o'** and methylamine hydrochloride as described in the **general procedure E**. The crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 80% ethyl acetate in hexane) to provide **12w'** (75 mg, 72% yield) as a white solid. mp = 243-244 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.81 (d, 3H, *J* = 4.4 Hz), 4.46 (d, 2H, *J* = 5.3 Hz), 6.94 (brt, 1H, *J* = 5.2 Hz), 7.54 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz), 7.59 (dd, 1H, *J* = 9.0 and 2.1 Hz), 8.02 (s, 4H), 8.10 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 8.58 (brd, 1H, *J* = 4.4 Hz), 8.75 (s, 1H) and 9.16 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.5, 154.8, 146.8, 140.0, 138.3, 134.2, 131.8, 128.8 (2C), 126.6 (q, *J* = 30.8 Hz), 122.9 (q, *J* = 217.5 Hz), 122.4, 121.5 (q, *J* = 1.5 Hz), 121.0, 119.5 (2C), 116.2 (q, *J* = 5.3 Hz), 30.8 and 26.3; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -63.08 (3F).

4.4. Biology

4.4.1. Biological activity methods for HepG2 cancer cell lines

Details for cytotoxic activity by using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay), cells were plated at a density of 8×10⁴ cells/well onto a 96-well plate and incubated for 12 h. Afterward, 100 μL of media containing serial 2-fold diluted compounds were added to each well to the final concentration of 100–3.125 μM. DMSO was used as vehicle control and its concentration was maintained at 0.5% v/v throughout all tested conditions. Cells were exposed for 72 h to the compounds and cell viability was determined by MTT assay. Briefly, cells were washed with phosphate buffer saline (PBS) solution then incubated with 1 mg/mL for 4 h. Afterward a 100 μL of DMSO was added to each well and mixed to dissolve formazan crystals. The absorbance at 550 nm was measured using a microplate reader. All experiments were performed in triplicate. Data were expressed as the IC₅₀ and 95% confidence interval.

4.4.2. Biological activity methods for A549, HuCCA-1, T47-D, and MDA-MB-231 cancer cell lines and for MRC-5 cells

Details for cytotoxic activity by using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay), cells were plated at a density of 2×10^4 cells/well onto a 96-well plate and incubated for 24 h. Afterward, 100 μ L of media containing serial 2-fold diluted compounds were added to each well to the final concentration. DMSO was used as vehicle control and its concentration was maintained at 0.1% v/v throughout all tested conditions. Cells were exposed for 48 h to the compounds and cell viability was determined by MTT assay. Briefly, cells were washed with 0.5 mL of 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) solution then incubated with 50 μ L of 0.5 mg/mL thiazolyl blue tetrazolium bromide for 4 h. Afterward a 100 μ L of DMSO was added to each well and mixed to dissolve formazan crystals. The absorbance at 570-590 nm was measured using a microplate reader. All experiments were performed in triplicate. Data were expressed as the IC_{50} confidence interval.⁴³

4.4.3. Biological activity methods for MOLT-3 and HL-60 cancer cell lines

Details for cytotoxic activity by using sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid hydrate (XTT assay), cells were plated at a density of 5×10^4 cells/well onto a 96-well plate and incubated for 24 h. Add 50 μ L of the XTT labeling mixture and incubate for 18 h. Measure the absorbance of the samples using a microplate reader. The wavelength to measure absorbance of the formazan product is between 550 and 600 nm.⁴⁴⁻⁴⁶

4.5. Molecular modeling

To gain more information on protein-ligand interactions and binding energies, molecular docking studies were conducted using iGEMDOCK v2.1 software. The active

site of wild type B-Raf [PDB ID: 1UWH] and VEGFR-2 [PDB ID: 4ASD] were obtained from the Protein Data Bank.



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

อนุพันธ์ sorafenib ที่ออกแบบโดยเปลี่ยนแปลงวงฟีนอกซี (phenoxy ring) ที่เป็นแกนกลาง และวงพิโคลินาไมด์ (picolinamide ring) ของ sorafenib ถูกแทนที่ด้วยวง 1,2,3-ไตรเอโซล (1,2,3-triazole ring) ที่เชื่อมกับวงเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ (substituted benzene) สามารถสังเคราะห์ผ่านปฏิกิริยาที่สำคัญ ได้แก่ ปฏิกิริยานิวคลีโอฟิลิกแอดดิชัน (nucleophilic addition) และปฏิกิริยา 1,3-ไดโพลาร์ไซโคลแอดดิชัน (1,3-dipolar cycloaddition) ได้สารผลิตภัณฑ์ **12a-12p'** รวม 42 โมเลกุล ที่มีร้อยละผลผลิตที่ดีถึงดีมาก และนำอนุพันธ์ sorafenib มาทำปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ด้วย Sn/HCl ตามด้วยการทำปฏิกิริยานิวคลีโอฟิลิกสับสติตูชัน (nucleophilic substitution) และทำปฏิกิริยาเอไมด์ฟอเมชัน (amide formation) ได้สารผลิตภัณฑ์ **12q'-12w'** เพิ่ม 7 โมเลกุล ที่มีร้อยละผลผลิตที่ดีถึงดีมาก ซึ่งรวมการสังเคราะห์อนุพันธ์ sorafenib ทั้งหมด 49 โมเลกุล (ในจำนวนนี้เป็นโมเลกุลที่สังเคราะห์เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาเบื้องต้นในระดับปริญญาตรีทั้งหมด 13 โมเลกุล)³⁶

จากการนำโมเลกุลเป้าหมายมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิดด้วยวิธี MTT assay พบว่าอนุพันธ์ sorafenib ที่มีวงไตรเอโซลมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D ได้อย่างโดดเด่นเมื่อเปรียบเทียบกับกรยับยั้งในเซลล์มะเร็งชนิดอื่น จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพ (Structure-Activity Relationships, SARs) พบว่าฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์มะเร็ง, หมู่ฟังก์ชัน และตำแหน่งการแทนที่บนวงเบนซีนที่ต่อกับวงไตรเอโซล ซึ่งอนุพันธ์ sorafenib ที่มีกลุ่มแอลคิล (alkyl) และอะตอมคลอรีนกับโบรมีนในกลุ่มฮาโลเจน (halogen) บนวงอะโรมาติกในตำแหน่ง *ortho* และ *para* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าสารที่มีหมู่แทนที่ในตำแหน่ง *meta* อย่างชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์มะเร็งตับ HepG2 อนุพันธ์ sorafenib **12e** (R = *o*-Cl), **12y** (R = *p*-CF₃), **12i'** (R = *o*-isopropyl) และ **12m'** (R = *p*-*tert*-Bu) มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์นี้ได้ดีเทียบเท่ากับยา sorafenib ต้นแบบ แต่น้อยกว่ายา doxorubicin ประมาณ 10 เท่า แต่อย่างไรก็ตามอนุพันธ์ sorafenib มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงกว่า โดย **12e** (R = *o*-Cl) และ **12m'** (R = *p*-*t*-Bu) มีค่า SI เทียบกับเซลล์ปกติ MRC-5 สูงที่สุดในกลุ่มสารที่สังเคราะห์ได้ และดีกว่า sorafenib 3.71 และ 4.44 เท่า และดีกว่า doxorubicin 3.19 และ 3.83 เท่า ตามลำดับ ส่วนการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D นั้น อนุพันธ์ sorafenib **12g** (R = *p*-Cl) และ **12j** (R = *p*-Br) สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D ได้ดีกว่ายา sorafenib ประมาณ 3

เท่า แต่น้อยกว่ายา doxorubicin 8 เท่า นอกจากนี้อนุพันธ์ **12h'** (R = *p*-ethyl) และ **12p'** (R = *p*-NHAc) ยังมีความสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D ได้เทียบเท่ากับ sorafenib โดยจากการศึกษา SARs พบว่าอนุพันธ์ sorafenib ที่มีหมู่ฟังก์ชันทุกประเภทที่แทนที่บนวง aromatic ในตำแหน่ง *para*- จะมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าตำแหน่ง *meta*- และ *ortho*- อย่างชัดเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตำแหน่งการแทนที่ของหมู่ฟังก์ชันบนวงแหวนเบนซีนเป็นส่วนที่มีความสำคัญต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ sorafenib ที่จะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D ได้ดีขึ้นอย่างมาก และจากการศึกษาความปลอดภัยของอนุพันธ์ พบว่าโมเลกุล **12j** (R = *p*-Br) มีค่า SI เทียบกับเซลล์ปกติ MRC-5 สูงที่สุดกับเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D โดยดีกว่า sorafenib 7.60 เท่า และดีกว่า doxorubicin 3.00 เท่า ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม พบว่าอนุพันธ์ sorafenib มีฤทธิ์ยับยั้งและ SI กับเซลล์มะเร็งปอด A549, เซลล์มะเร็งถุงน้ำดี HuCCA-1, เซลล์มะเร็งเม็ดเลือด HL-60 และเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ได้ไม่ดีขึ้น

การศึกษากลไกการเกิด binding mechanism ในโปรตีน B-Raf และ VEGFR-2 ของอนุพันธ์ sorafenib **12e** (R = *o*-Cl) และ **12m'** (R = *p-t*-Bu) ที่พบว่ามียุทธวิธีดี เทียบกับยา sorafenib ด้วย molecular docking พบว่าโมเลกุลทั้งสองมีการเกิด binding mechanism คล้ายกับยา sorafenib และยังพบว่าส่วนของวงพิโคลินาไมด์ (picolinamide ring) และวงฟีนอกซี (phenoxy ring) นั้นสามารถถูกแทนที่ได้ดีด้วยวงไตรเอโซลที่เชื่อมต่อกับวงเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ได้ ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งเต้านม T47-D

ดังนั้นอนุพันธ์ sorafenib ที่มีวงไตรเอโซลเป็นแกนกลางมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ดีที่สุดเทียบกับการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ๆ และยับยั้งได้ใกล้เคียงกับ sorafenib ต้นแบบและยา doxorubicin แต่มีความจำเพาะเจาะจงสูงกว่ามาก แสดงถึงความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติ จึงทำให้อนุพันธ์ sorafenib กลุ่มนี้สามารถถูกพัฒนาโครงสร้างไปสู่อนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ๆ ให้ดีขึ้นได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้วิจัยพบว่าอนุพันธ์ **12e** (R = *o*-Cl) และ **12m'** (R = *p-t*-Bu) มีความน่าสนใจในการนำไปศึกษาสมบัติทางเภสัชวิทยาเชิงลึกต่อไป เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนายาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งตับที่มีความจำเพาะเจาะจงในอนาคต

รายการอ้างอิง

1. (BDMS), B. D. M. S. เช็กด่วน ! สัญญาณเตือนมะเร็งที่คุณต้องรู้
<https://www.pptvhd36.com/health-station/%E0%B8%A1%E0%B8%B0%E0%B9%80%E0%B8%A3%E0%B9%87%E0%B8%87/24>
(accessed 5).
2. World Health Organization, W. Cancer Today. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id= (accessed 5).
3. สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข, ก.
http://bps.moph.go.th/new_bps/sites/default/files/statistic%2061.pdf (accessed 23).
4. Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A. D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P., *Essential cell biology*. Garland Science: 2013.
5. Ravina, E., *The evolution of drug discovery: from traditional medicines to modern drugs*. John Wiley & Sons: 2011.
6. Drugs.com Doxorubicin Hydrochloride
<https://www.drugs.com/monograph/doxorubicin-hydrochloride.html> (accessed 5).
7. Martindale: The Complete Drug Reference Brayfield Alison (Ed) Martindale: The Complete Drug Reference £459 4,688pp Pharmaceutical Press 9780857111395 0857111396 [Formula: see text]. *Emerg Nurse* 2014, 22 (5), 12.
8. Rossi, S., Australian Medicines Handbook. 2013 edition. *Adelaide: The Australian Medicines Handbook Unit Trust* 2013.
9. นันทากวีรัตน์, พ. ส.; ชิวเกรียงไกร, ผ. น. ฉ. Basic Chemotherapy in Gynecologic Oncology.
https://w1.med.cmu.ac.th/obgyn/index.php?option=com_content&view=article&id=1221:basic-chemotherapy-in-gynecologic-oncology&catid=45:topic-review&Itemid=561
(accessed 5).

10. POBPAD Doxorubicin (ดีออกโซรูบิซิน). <https://www.pobpad.com/doxorubicin> (accessed 5).
11. Du, J.; Qian, X.; Liu, B., Long-term progression-free survival in a case of hepatocellular carcinoma with vertebral metastasis treated with a reduced dose of sorafenib: Case report and review of the literature. *Oncology letters* 2013, 5 (1), 381-385.
12. Li, Y.; Gao, Z. H.; Qu, X. J., The adverse effects of sorafenib in patients with advanced cancers. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2015, 116 (3), 216-221.
13. Liu, C.; Chen, Z.; Chen, Y.; Lu, J.; Li, Y.; Wang, S.; Wu, G.; Qian, F., Improving oral bioavailability of sorafenib by optimizing the “spring” and “parachute” based on molecular interaction mechanisms. *Molecular pharmaceuticals* 2016, 13 (2), 599-608.
14. Daher, S.; Massarwa, M.; Benson, A. A.; Khoury, T., Current and future treatment of hepatocellular carcinoma: an updated comprehensive review. *Journal of clinical and translational hepatology* 2018, 6 (1), 69.
15. Pan, X.; Liang, L.; Si, R.; Wang, J.; Zhang, Q.; Zhou, H.; Zhang, L.; Zhang, J., Discovery of novel anti-angiogenesis agents. Part 10: Multi-target inhibitors of VEGFR-2, Tie-2 and EphB4 incorporated with 1, 2, 3-triazol. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2019, 163, 1-9.
16. Sanphanya, K.; Wattanapitayakul, S. K.; Phowichit, S.; Fokin, V. V.; Vajragupta, O., Novel VEGFR-2 kinase inhibitors identified by the back-to-front approach. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2013, 23 (10), 2962-2967.
17. Zhang, Q.; Zheng, P.; Zhu, W., Research Progress of Small Molecule VEGFR/c-Met Inhibitors as Anticancer Agents (2016–Present). *Molecules* 2020, 25 (11), 2666.
18. Zhu, Y.-j.; Zheng, B.; Wang, H.-y.; Chen, L., New knowledge of the mechanisms of sorafenib resistance in liver cancer. *Acta Pharmacologica Sinica* 2017, 38 (5), 614-622.
19. Qin, M.; Yan, S.; Wang, L.; Zhang, H.; Zhao, Y.; Wu, S.; Wu, D.; Gong, P., Discovery of novel diaryl urea derivatives bearing a triazole moiety as potential antitumor agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2016, 115, 1-13.
20. Ye, W.; Yao, Q.; Yu, S.; Gong, P.; Qin, M., Synthesis and antitumor activity of triazole-containing sorafenib analogs. *Molecules* 2017, 22 (10), 1759.
21. Zeidan, M. A.; Mostafa, A. S.; Gomaa, R. M.; Abou-Zeid, L. A.; El-Mesery, M.; Magda, A.-A.; Selim, K. B., Design, synthesis and docking study of novel picolinamide

derivatives as anticancer agents and VEGFR-2 inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* 2019, 168, 315-329.

22. Walko, C. M.; Grande, C. In *Management of common adverse events in patients treated with sorafenib: nurse and pharmacist perspective*, Seminars in oncology, Elsevier: 2014; pp S17-S28.

23. Wu, P.; Nielsen, T. E.; Clausen, M. H., FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in pharmacological sciences* 2015, 36 (7), 422-439.

24. Ul-Haq, Z.; Mahmood, U.; Reza, S., A combined 3D-QSAR and molecular docking strategy to understand the binding mechanism of V600E B-RAF inhibitors. *Molecular diversity* 2012, 16 (4), 771-785.

25. Zhan, W.; Li, Y.; Huang, W.; Zhao, Y.; Yao, Z.; Yu, S.; Yuan, S.; Jiang, F.; Yao, S.; Li, S., Design, synthesis and antitumor activities of novel bis-aryl ureas derivatives as Raf kinase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2012, 20 (14), 4323-4329.

26. Zhao, C.-r.; Wang, R.-q.; Li, G.; Xue, X.-x.; Sun, C.-j.; Qu, X.-j.; Li, W.-b., Synthesis of indazole based diarylurea derivatives and their antiproliferative activity against tumor cell lines. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2013, 23 (7), 1989-1992.

27. Tang, K.; Luo, C.; Li, Y.; Lu, C.; Zhou, W.; Huang, H.; Chen, X., The study of a novel sorafenib derivative HLC-080 as an antitumor agent. *Plos one* 2014, 9 (7), e101889.

28. Wu, C.; Wang, M.; Tang, Q.; Luo, R.; Chen, L.; Zheng, P.; Zhu, W., Design, synthesis, activity and docking study of sorafenib analogs bearing sulfonylurea unit. *Molecules* 2015, 20 (10), 19361-19371.

29. El-Din, M. M. G.; El-Gamal, M. I.; Abdel-Maksoud, M. S.; Yoo, K. H.; Oh, C.-H., Synthesis and broad-spectrum antiproliferative activity of diarylamides and diarylureas possessing 1, 3, 4-oxadiazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2015, 25 (8), 1692-1699.

30. Chen, J.-N.; Wang, X.-F.; Li, T.; Wu, D.-W.; Fu, X.-B.; Zhang, G.-J.; Shen, X.-C.; Wang, H.-S., Design, synthesis, and biological evaluation of novel quinazolinyl-diaryl urea derivatives as potential anticancer agents. *European journal of medicinal chemistry* 2016, 107, 12-25.

31. El-Damasy, A. K.; Lee, J.-H.; Seo, S. H.; Cho, N.-C.; Pae, A. N.; Keum, G., Design and synthesis of new potent anticancer benzothiazole amides and ureas featuring

pyridylamide moiety and possessing dual B-RafV600E and C-Raf kinase inhibitory activities. *European journal of medicinal chemistry* 2016, 115, 201-216.

32. Wang, M.; Xu, S.; Lei, H.; Wang, C.; Xiao, Z.; Jia, S.; Zhi, J.; Zheng, P.; Zhu, W., Design, synthesis and antitumor activity of Novel Sorafenib derivatives bearing pyrazole scaffold. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2017, 25 (20), 5754-5763.

33. Sun, S.; He, Z.; Huang, M.; Wang, N.; He, Z.; Kong, X.; Yao, J., Design and discovery of thioether and nicotinamide containing sorafenib analogues as multikinase inhibitors targeting B-Raf, B-RafV600E and VEGFR-2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2018, 26 (9), 2381-2391.

34. Arnott, J. A.; Planey, S. L., The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert opinion on drug discovery* 2012, 7 (10), 863-875.

35. Haider, S.; Alam, M. S.; Hamid, H., 1, 2, 3-Triazoles: scaffold with medicinal significance. *Inflamm Cell Signal* 2014, 1, e95.

36. Oekchuae, S. Capital Letter Synthesis of Sorafenib Analogues with Triazole as a Core Structure and Their Anti-Cancer Activities towards HepG2, MOLT-3, A549, and HuCCA-1. Silpakorn University, 2017.

37. Prayong, P.; Barusrux, S.; Weerapreeyakul, N., Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia* 2008, 79 (7-8), 598-601.

38. Thongnest, S.; Chawengrum, P.; Keeratichamroen, S.; Lirdprapamongkol, K.; Eurtivong, C.; Boonsombat, J.; Kittakooop, P.; Svasti, J.; Ruchirawat, S., Vernodalidimer L, a sesquiterpene lactone dimer from *Vernonia extensa* and anti-tumor effects of vernodalin, vernolepin, and vernolide on HepG2 liver cancer cells. *Bioorganic chemistry* 2019, 92, 103197.

39. Ryu, B.-Y.; Emrick, T., Bisphenol-1, 2, 3-triazole (BPT) epoxies and cyanate esters: synthesis and self-catalyzed curing. *Macromolecules* 2011, 44 (14), 5693-5700.

40. Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., Copper (I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *Journal of the American Chemical Society* 2005, 127 (1), 210-216.

41. Vershinina, I.; Gornukhina, O.; Lubimova, T.; Golubchikov, O.; Semeikin, A., 4-(8-quinolyazo) resorcinol and 1-(8-quinolyazo)-2-naphthol: Synthesis and sorption

properties. *Russian Journal of General Chemistry* 2016, 86 (9), 2232-2235.

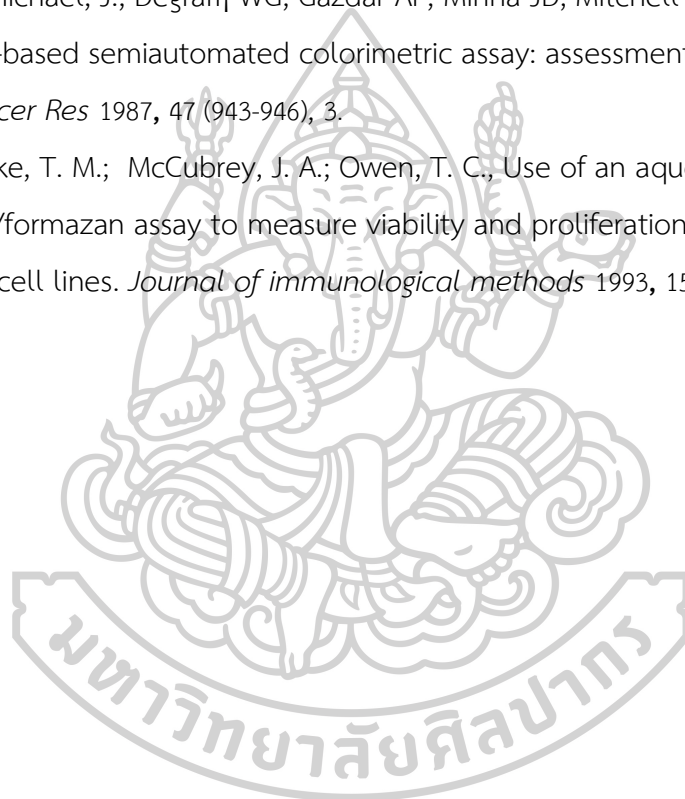
42. Beutner, G. L.; Young, I. S.; Davies, M. L.; Hickey, M. R.; Park, H.; Stevens, J. M.; Ye, Q., TCFH–NMI: Direct access to N-acyl imidazoliums for challenging amide bond formations. *Organic letters* 2018, 20 (14), 4218-4222.

43. Stoddart, M. J., *Mammalian cell viability: methods and protocols*. Springer: 2011.

44. Doyle, A.; Griffiths, J. B., *Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology*. John Wiley & Sons, Ltd: 1998.

45. Carmichael, J., Degraffj WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987, 47 (943-946), 3.

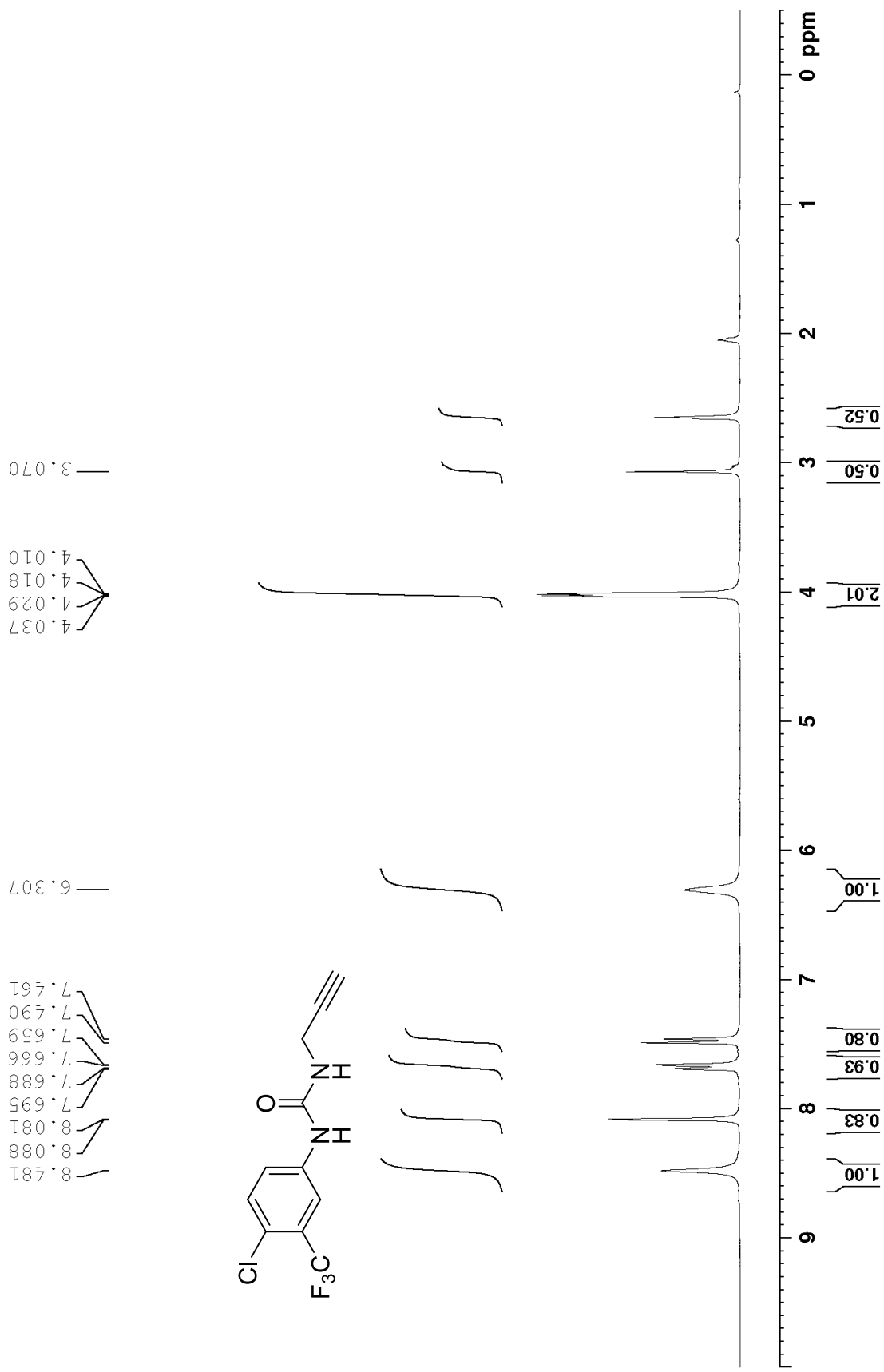
46. Buttke, T. M.; McCubrey, J. A.; Owen, T. C., Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *Journal of immunological methods* 1993, 157 (1-2), 233-240.



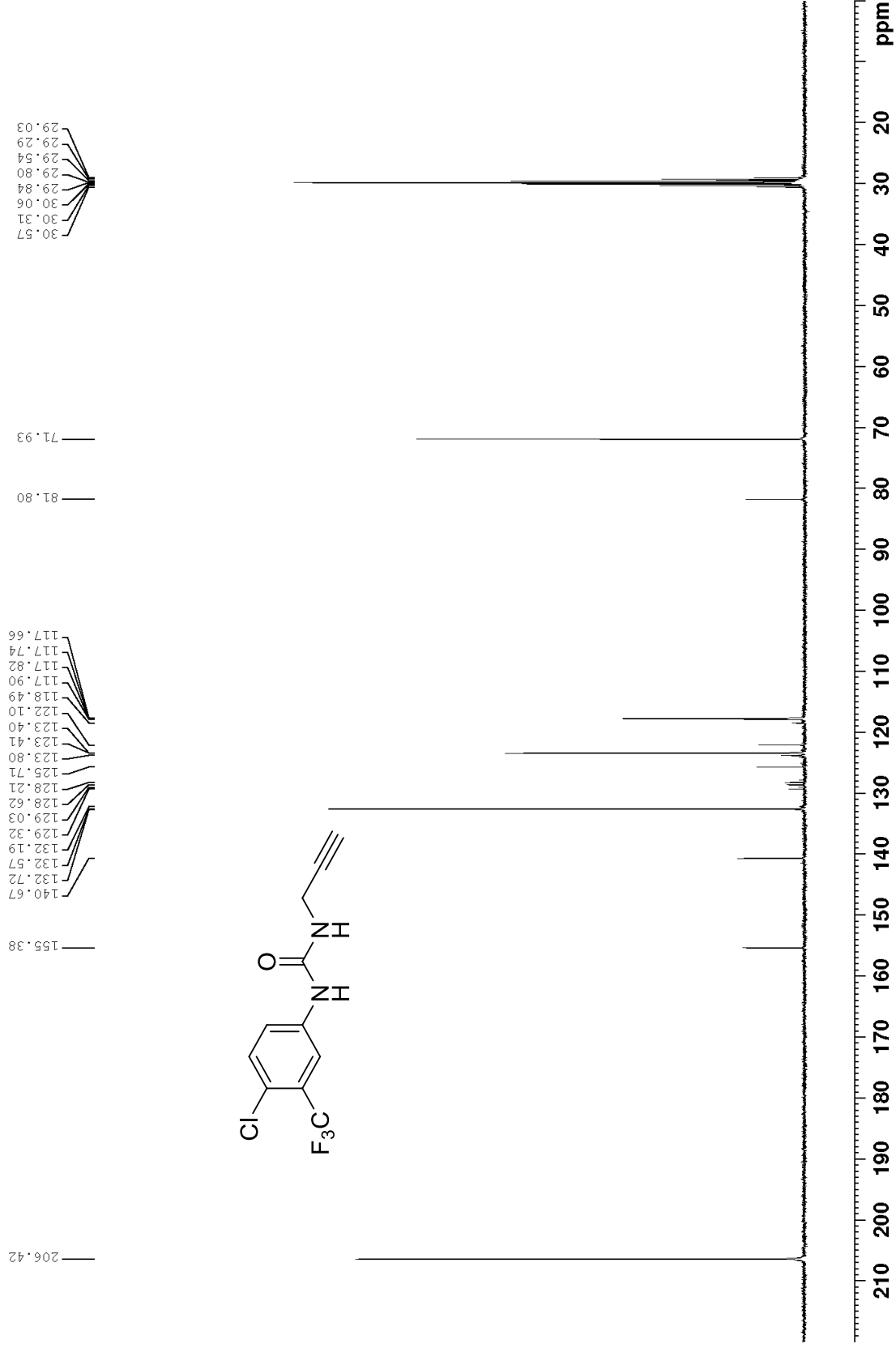


ภาคผนวก

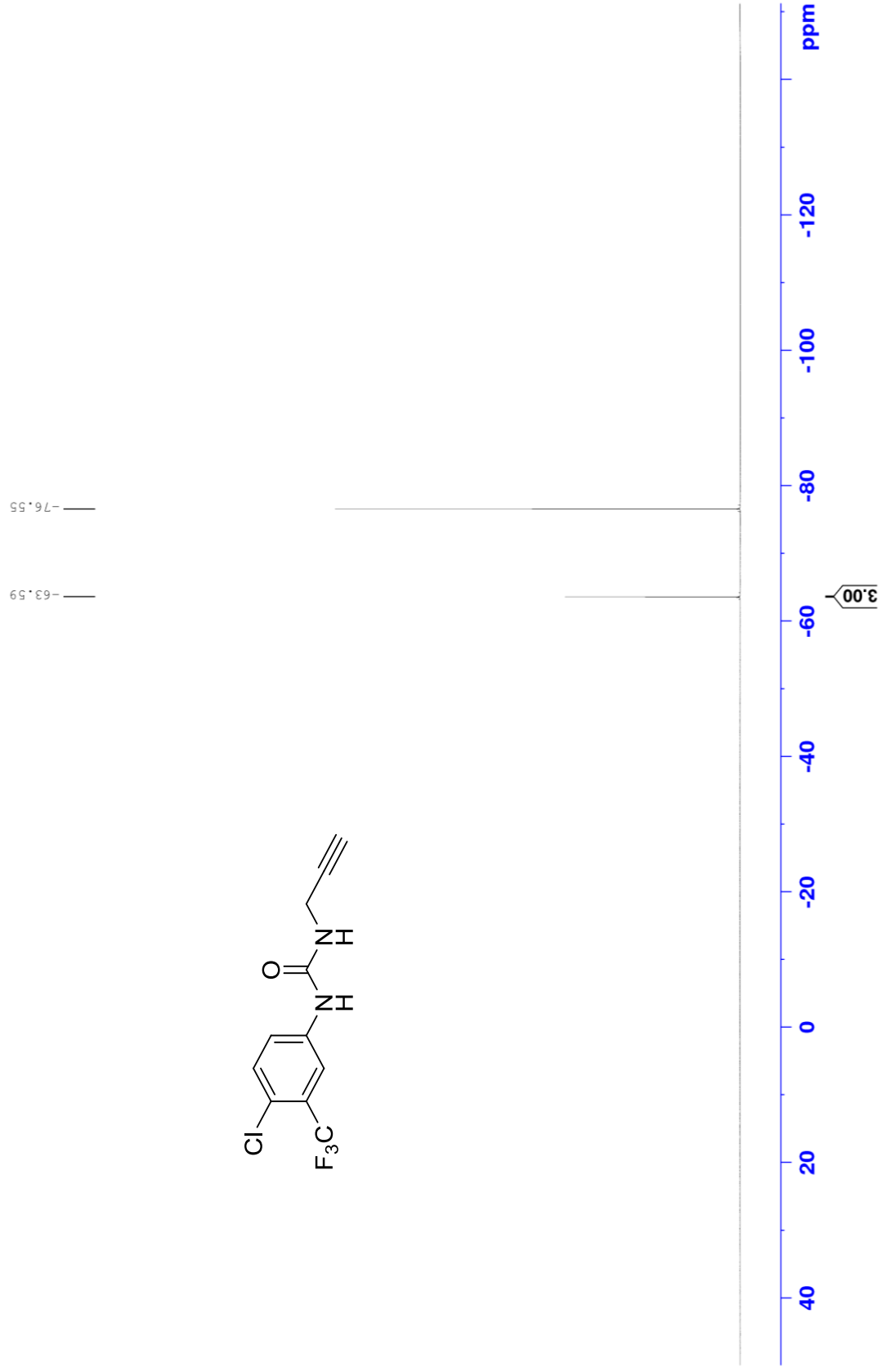
^1H NMR of compound **9** (300 MHz, Acetone- d_6)



^{13}C NMR of compound **9** (75 MHz, Acetone- d_6)



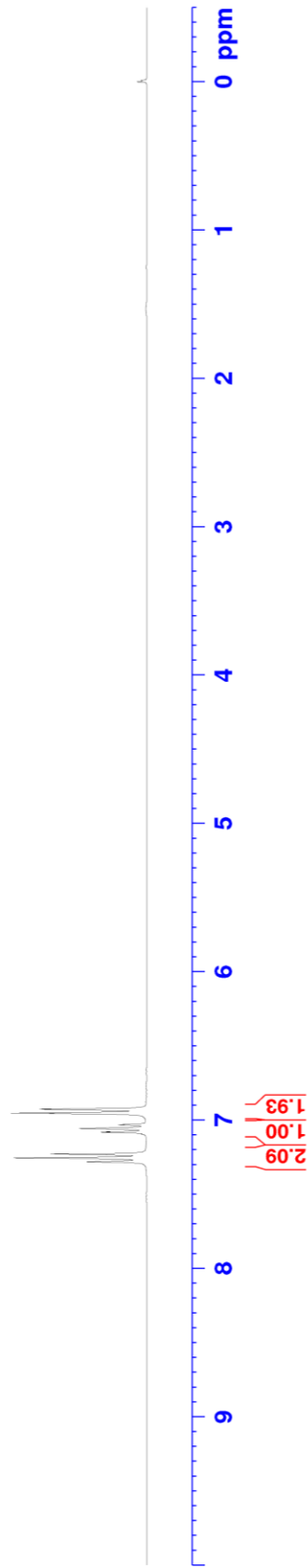
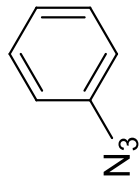
^{19}F NMR of compound **9** (282 MHz, CDCl_3)



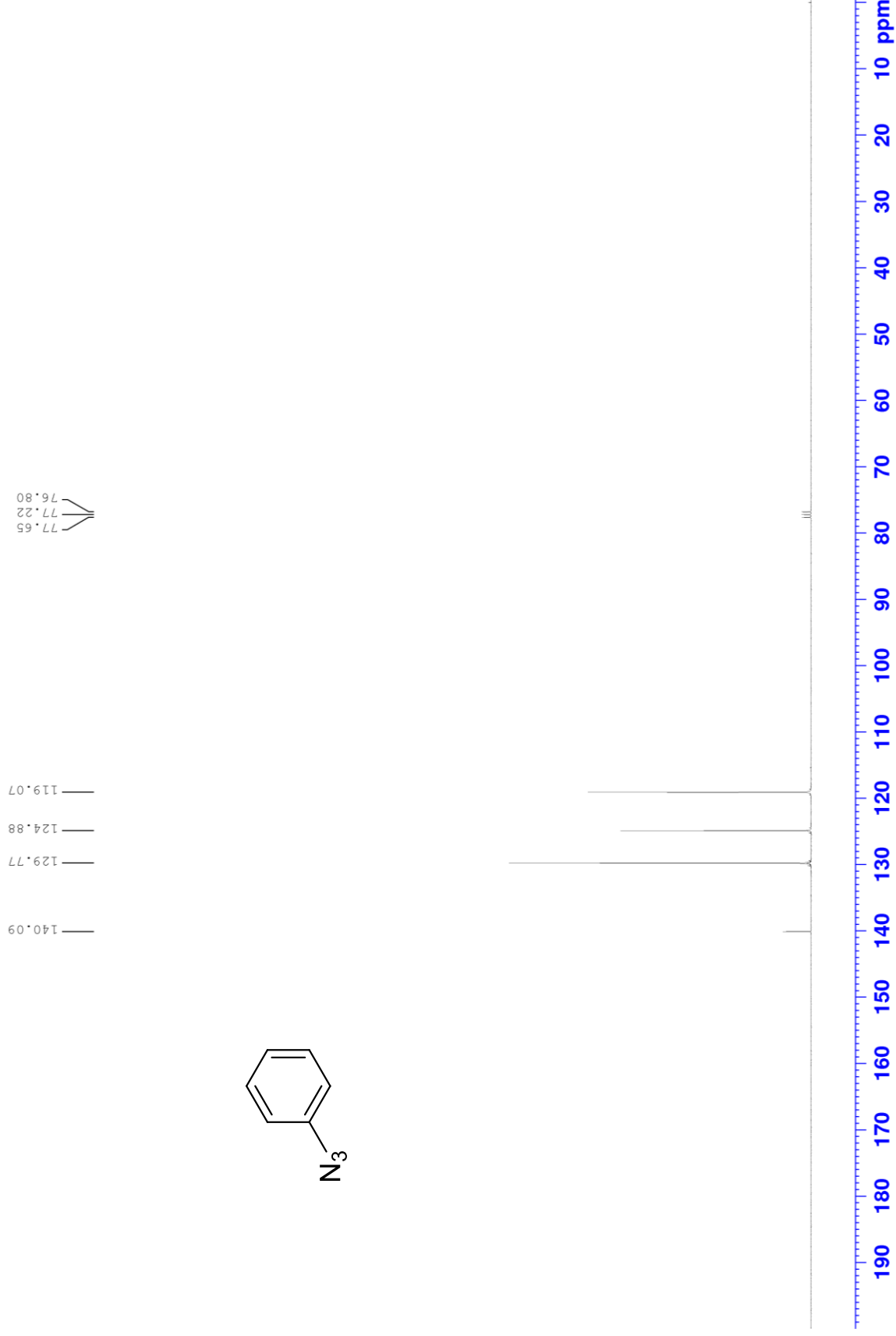
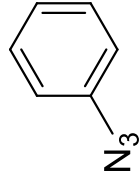
^1H NMR of compound **11a** (300 MHz, CDCl_3)

0.000
-0.010

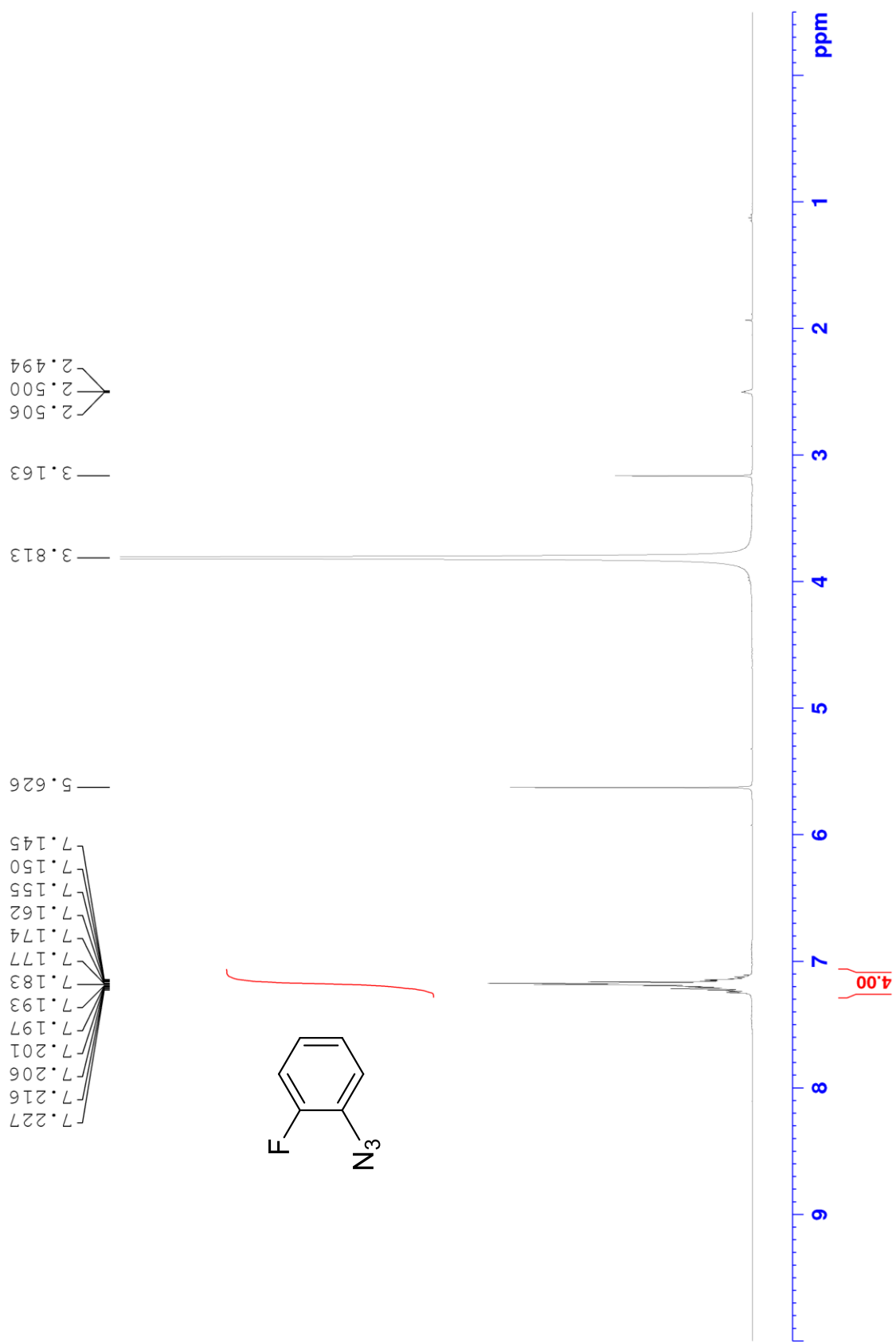
7.282
7.277
7.255
7.235
7.229
7.095
7.082
7.079
7.057
7.033
7.029
6.957
6.953
6.928
6.925



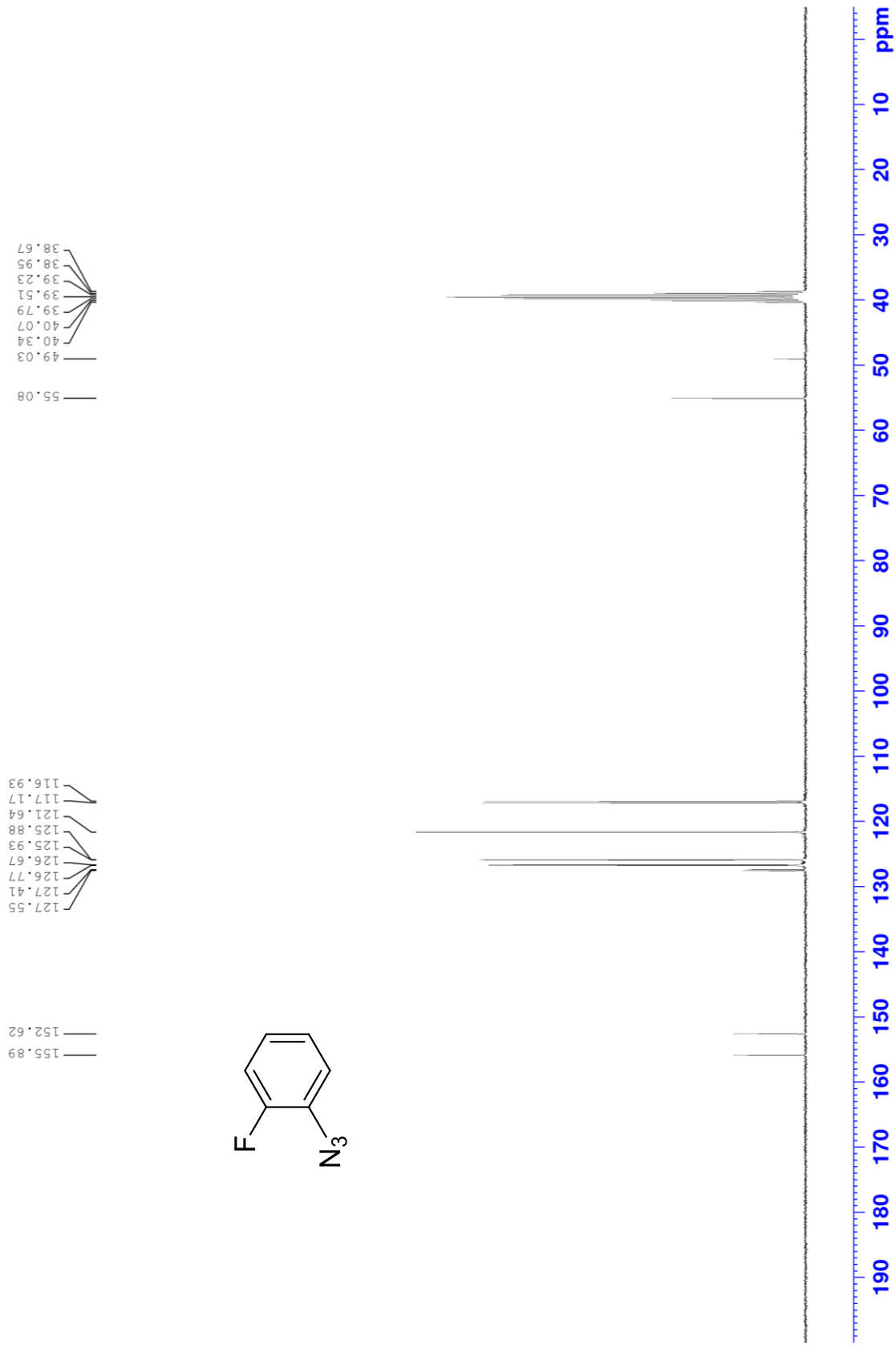
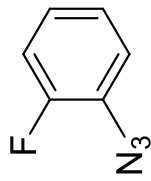
^{13}C NMR of compound **11a** (75 MHz, CDCl_3)



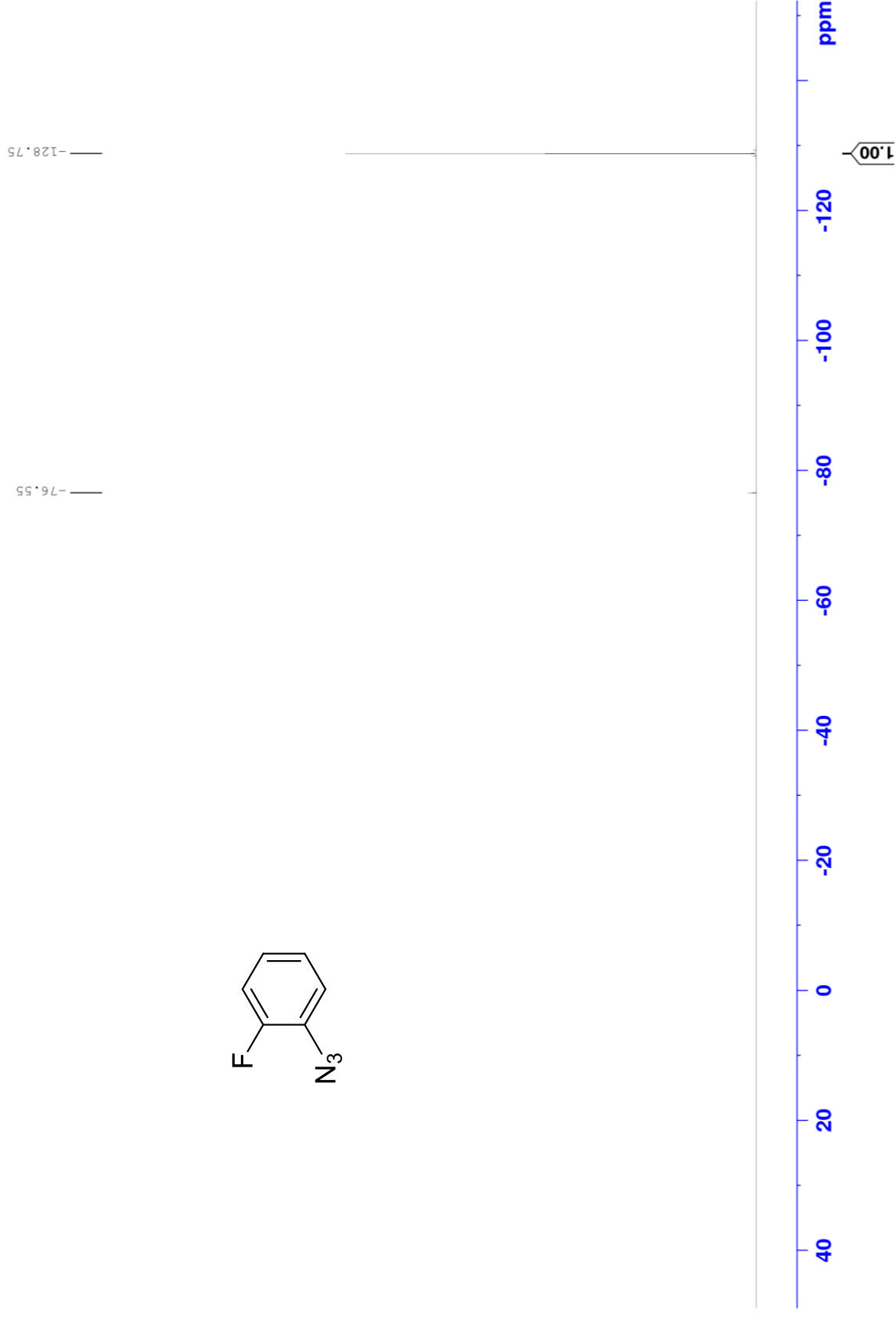
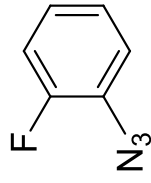
^1H NMR of compound **11b** (300 MHz, CDCl_3)



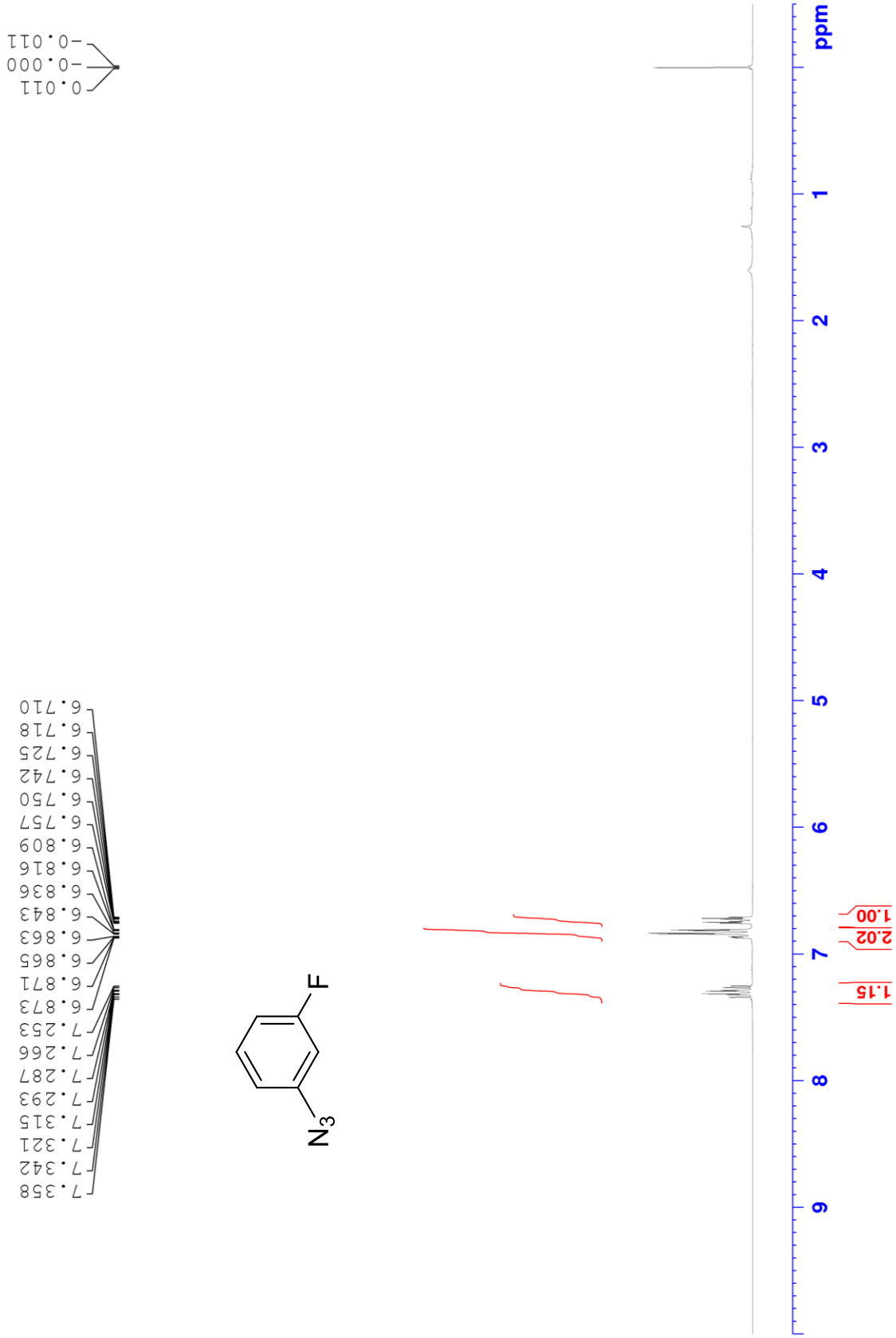
^{13}C NMR of compound **11b** (75 MHz, CDCl_3)



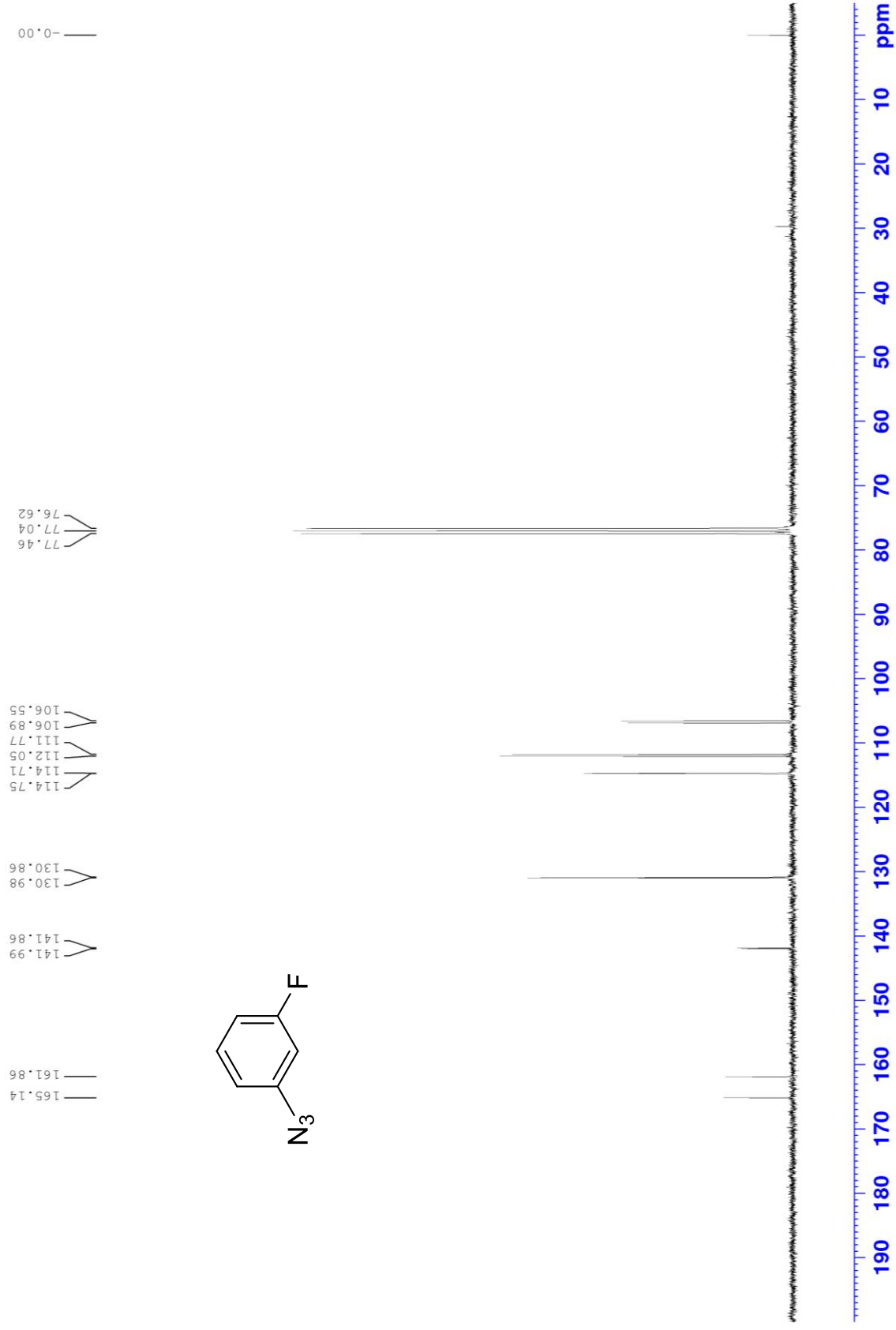
^{16}F NMR of compound **11b** (282 MHz, CDCl_3)



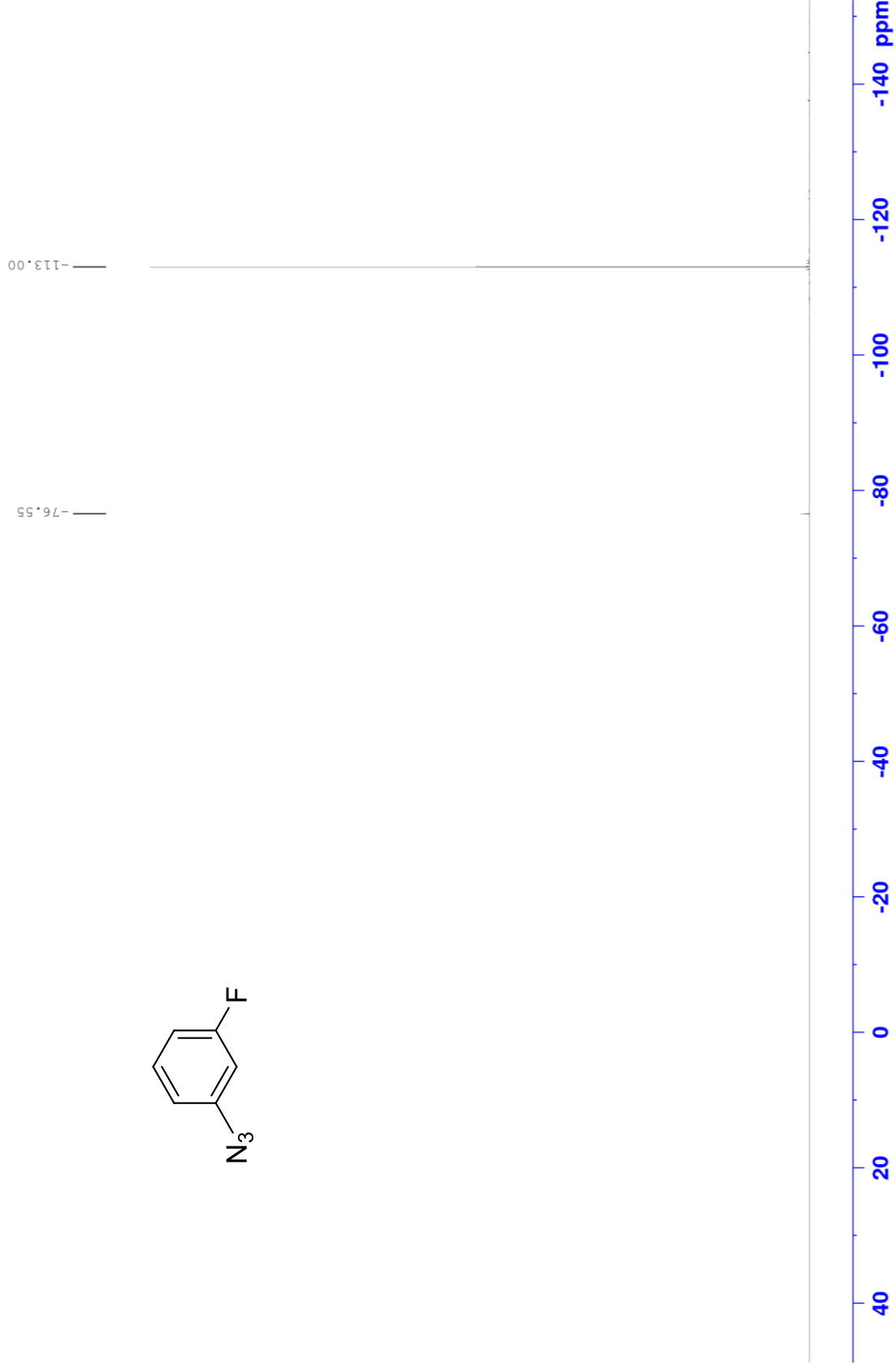
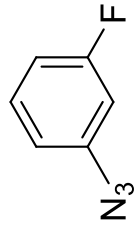
^1H NMR of compound **11c** (300 MHz, CDCl_3)



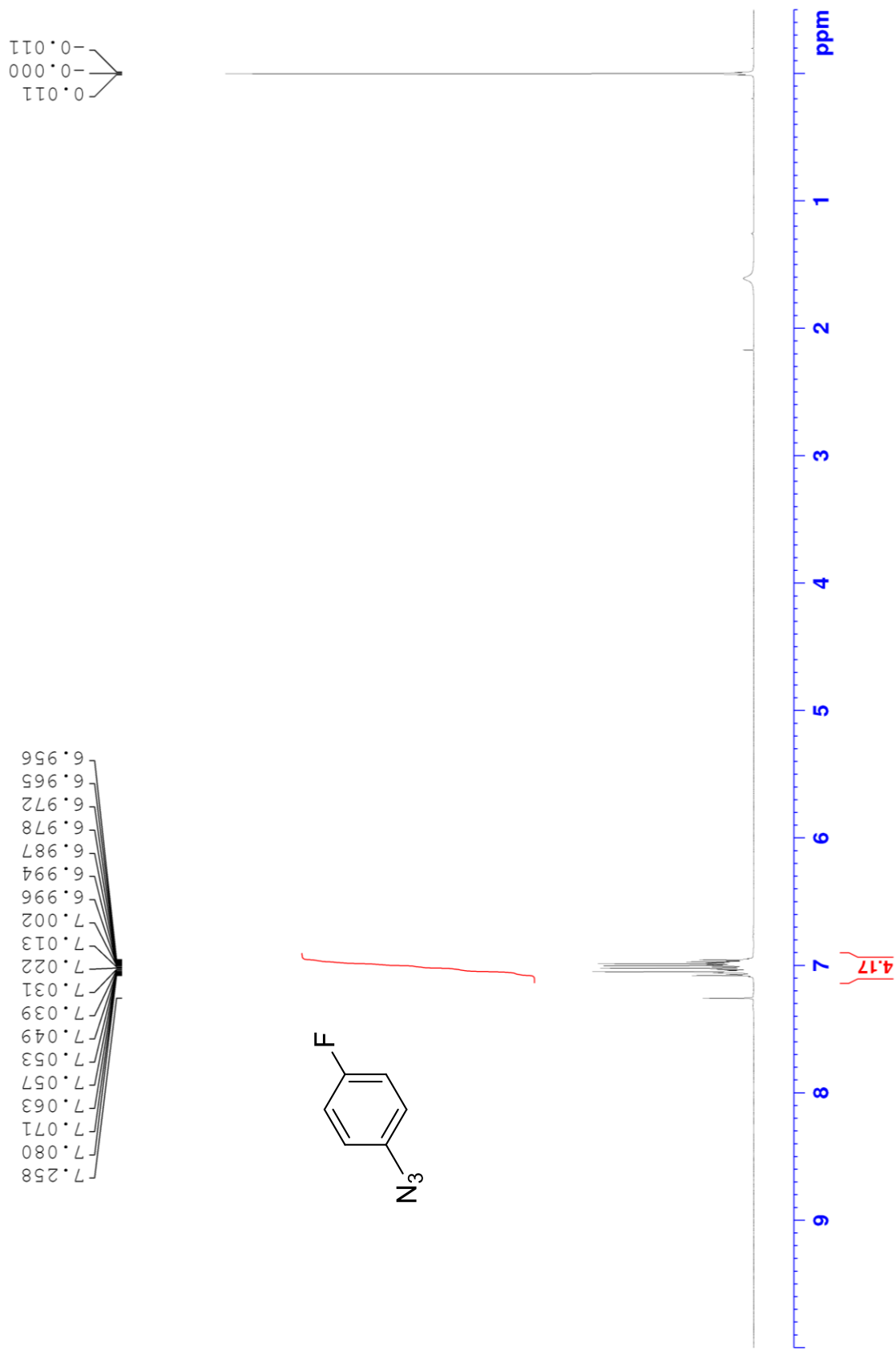
^{13}C NMR of compound **11c** (75 MHz, CDCl_3)



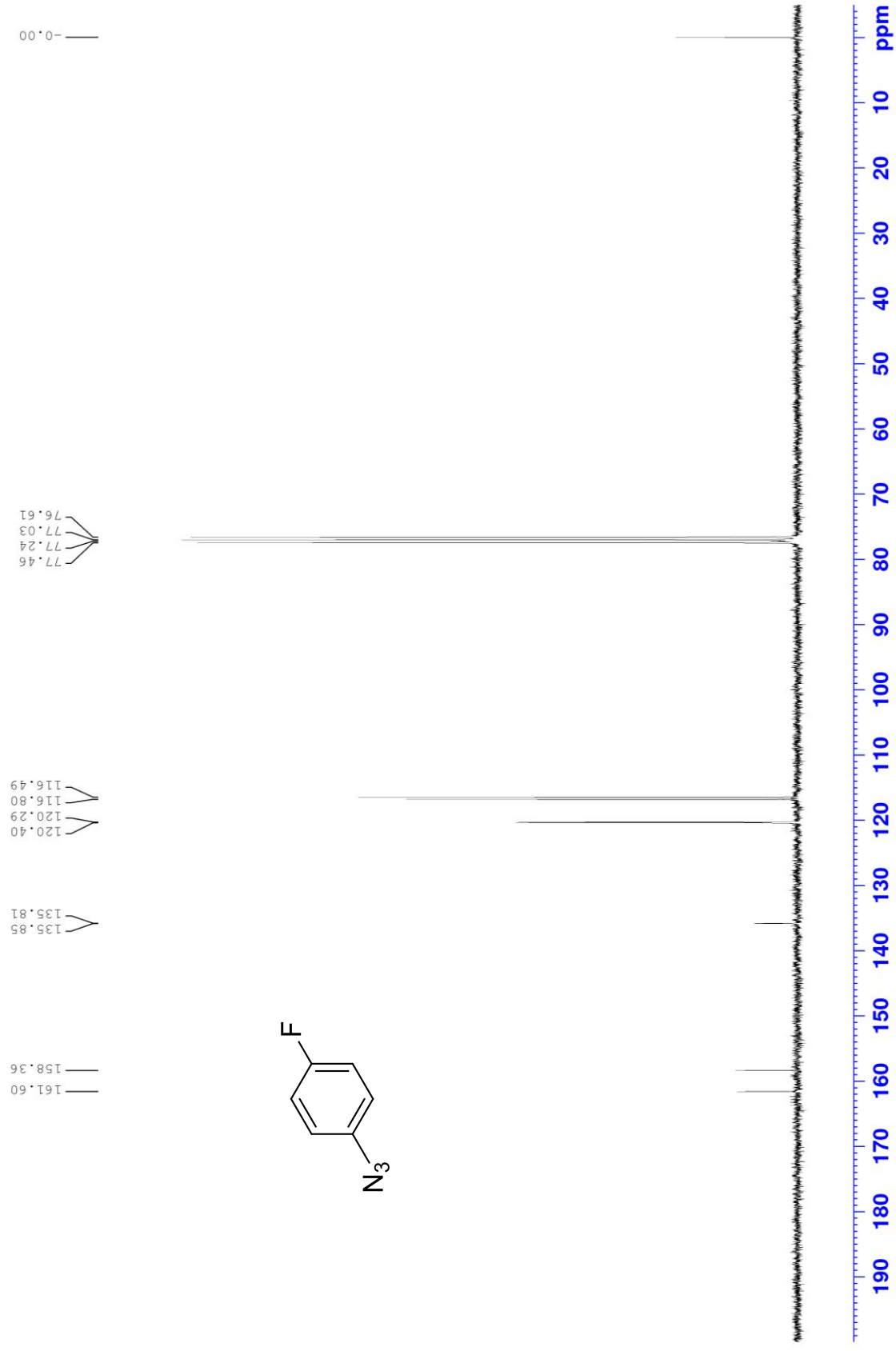
^{19}F NMR of compound **11c** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



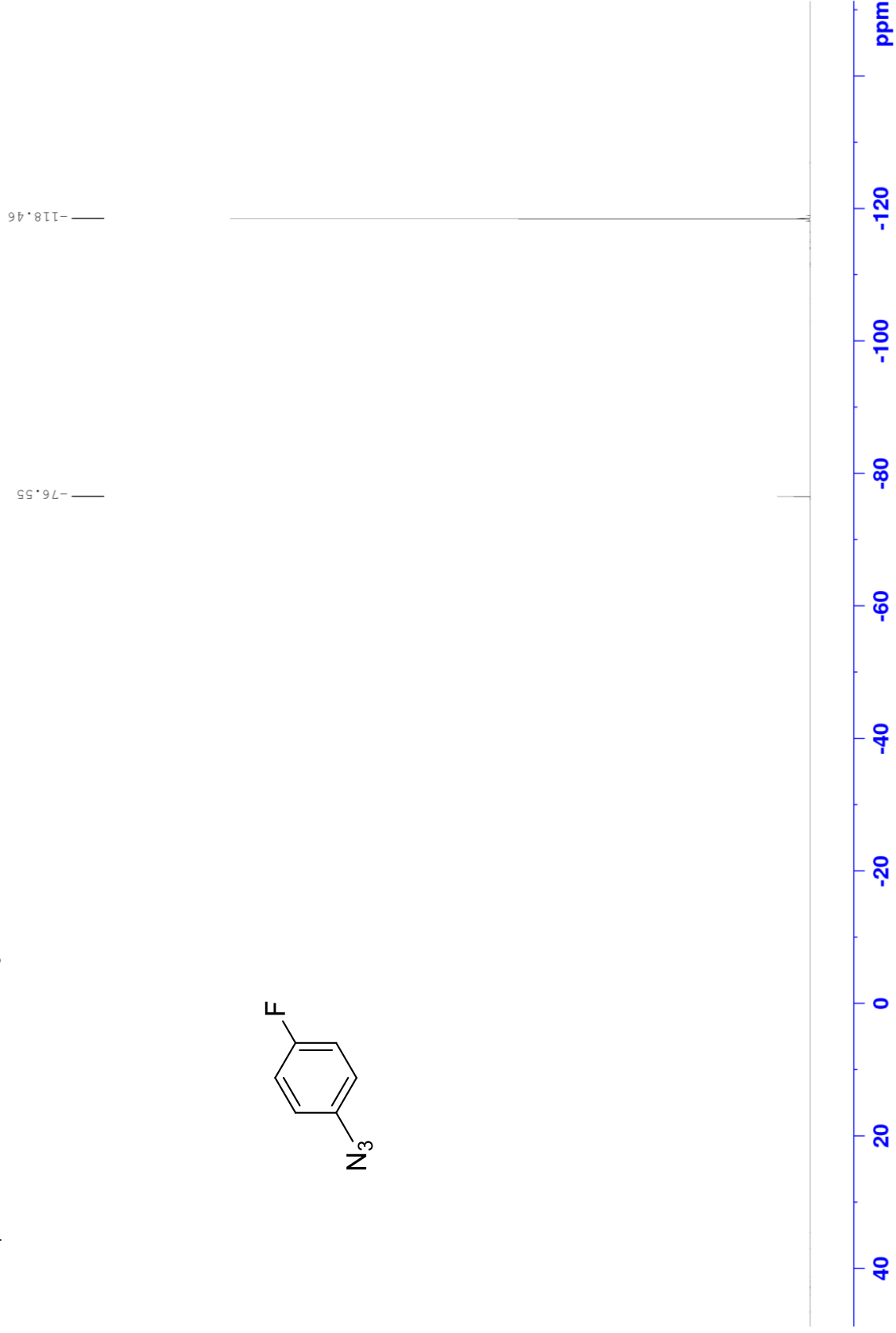
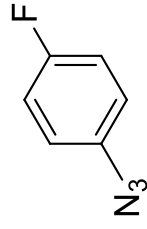
^1H NMR of compound **11d** (300 MHz, CDCl_3)



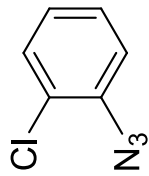
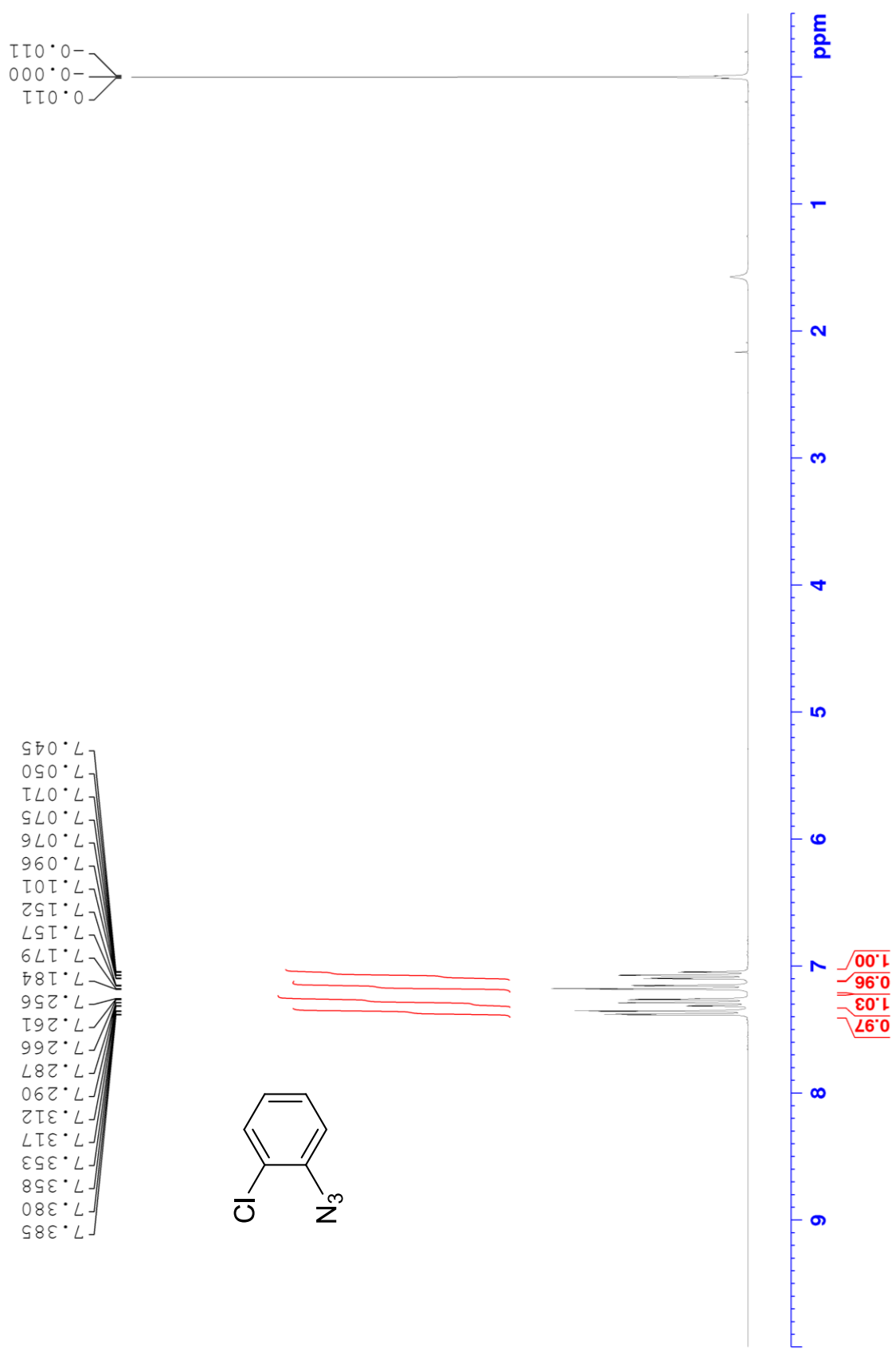
^{13}C NMR of compound **11d** (75 MHz, CDCl_3)



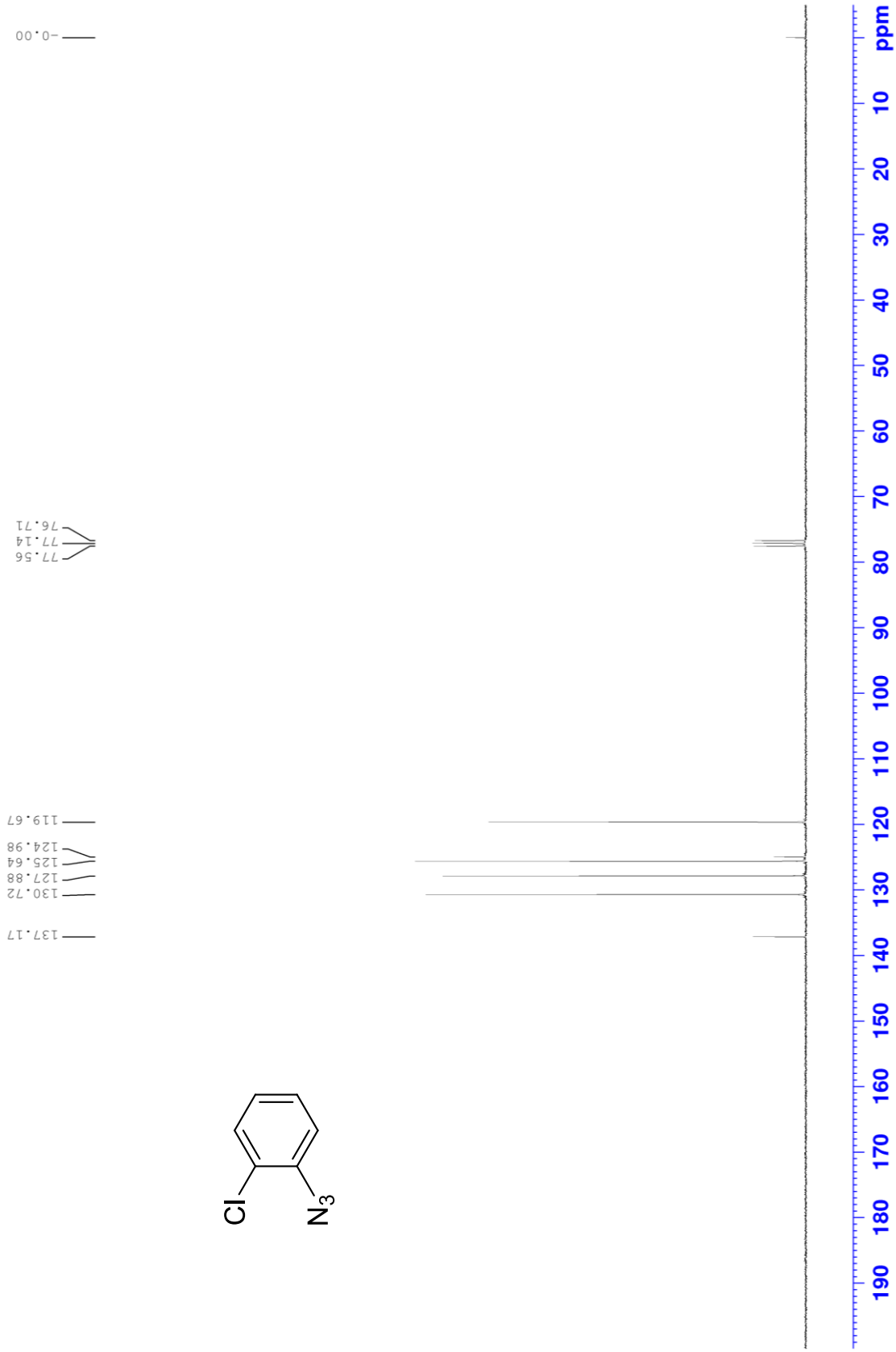
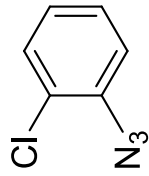
^{19}F NMR of compound **11d** (282 MHz, CDCl_3)



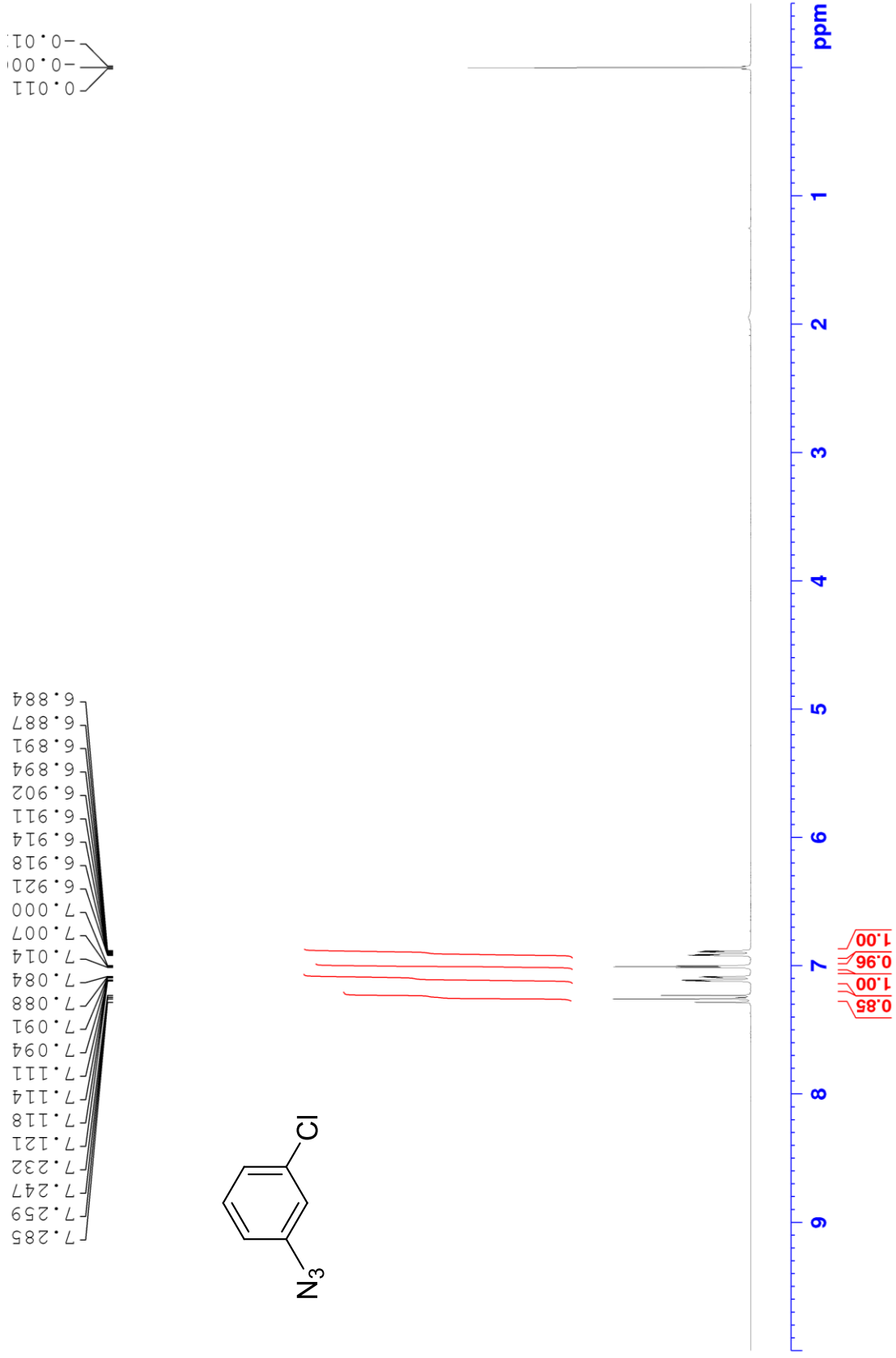
^1H NMR of compound **11e** (300 MHz, CDCl_3)



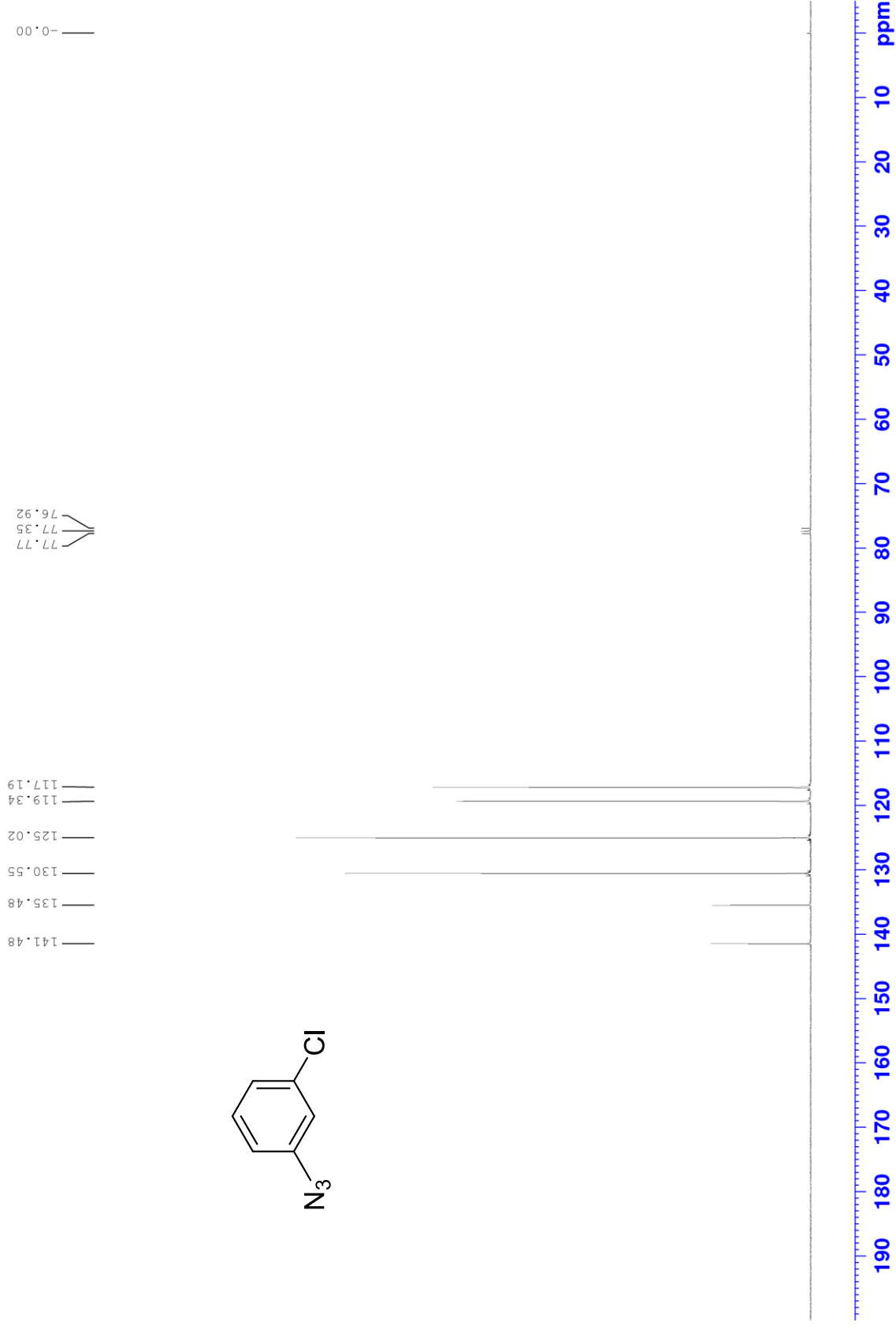
^{13}C NMR of compound **11e** (75 MHz, CDCl_3)



¹H NMR of compound **11f** (300 MHz, CDCl₃)

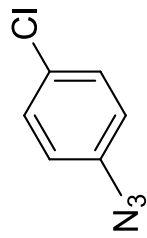


^{13}C NMR of compound **11f** (75 MHz, CDCl_3)

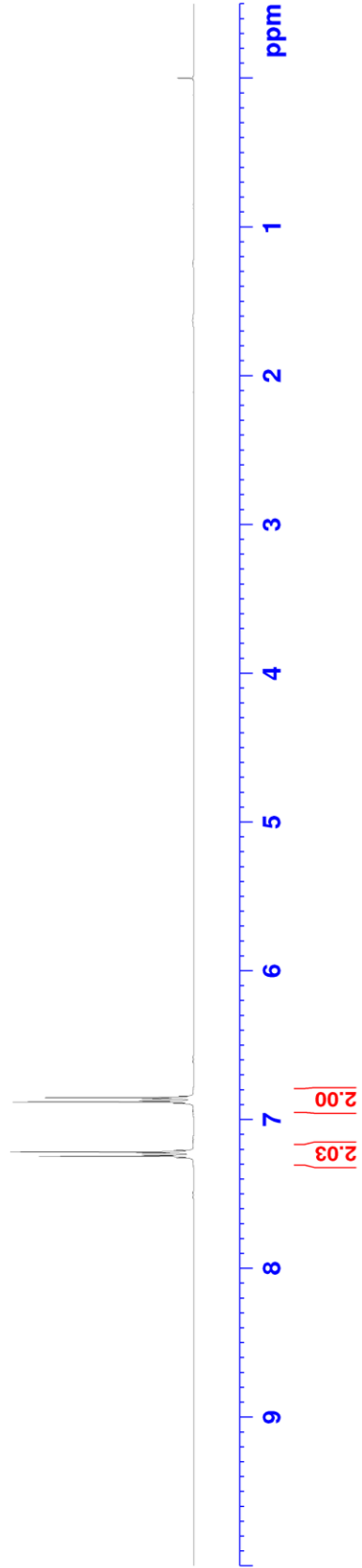


^1H NMR of compound **11g** (300 MHz, CDCl_3)

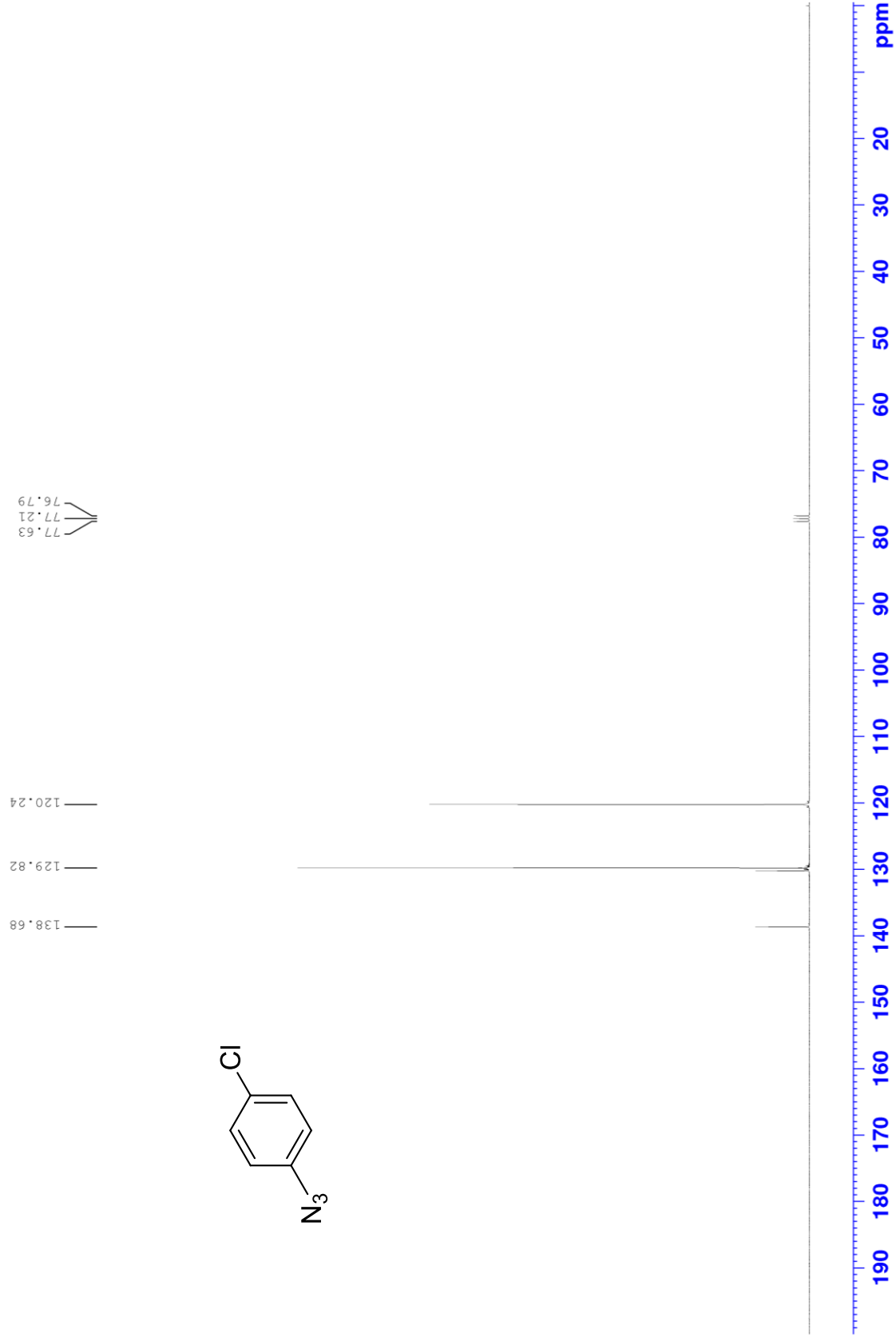
7.258
7.248
7.241
7.234
7.226
7.218
7.208
6.900
6.893
6.882
6.875
6.860
6.853
6.843



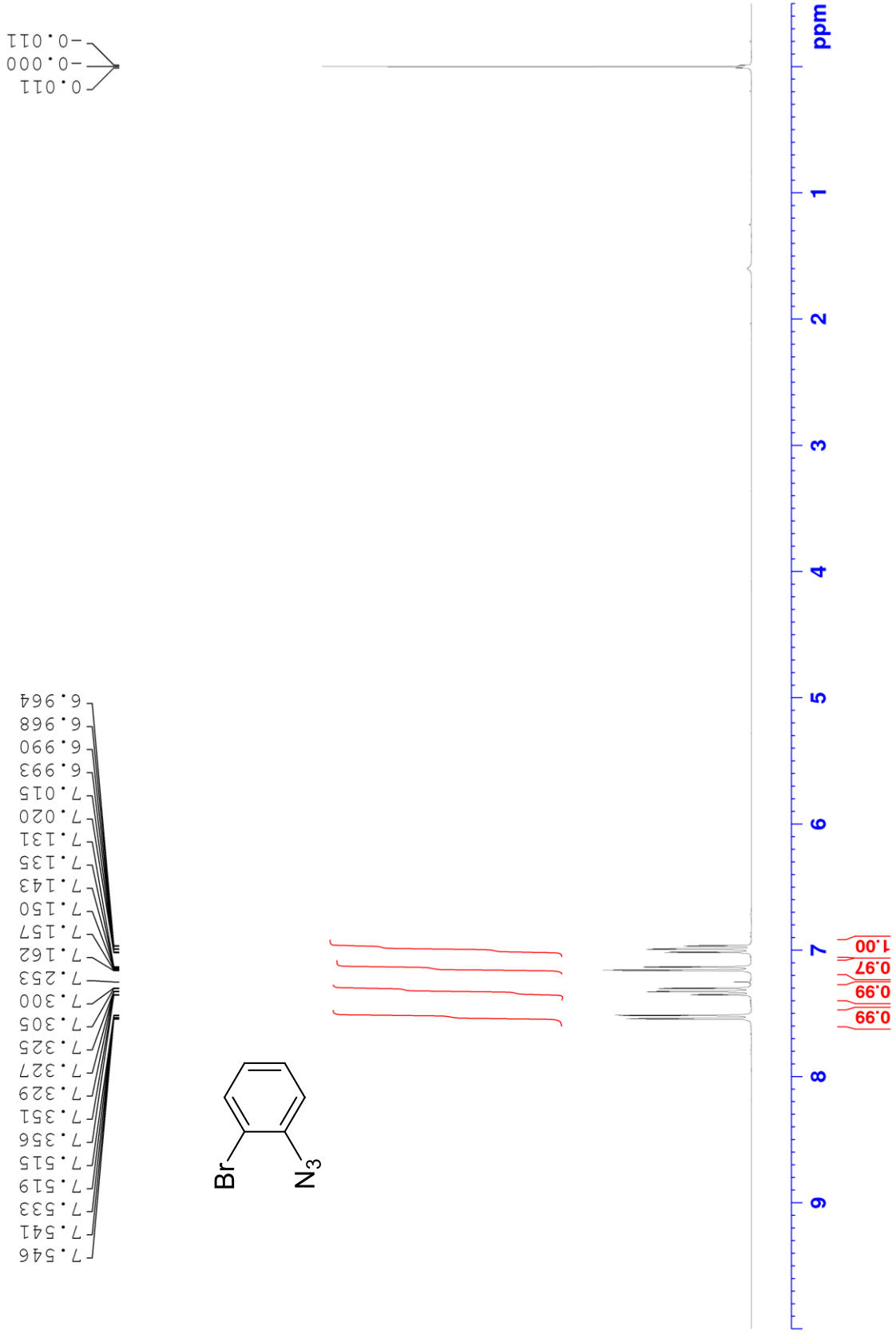
7.208-7.258
6.843-6.900



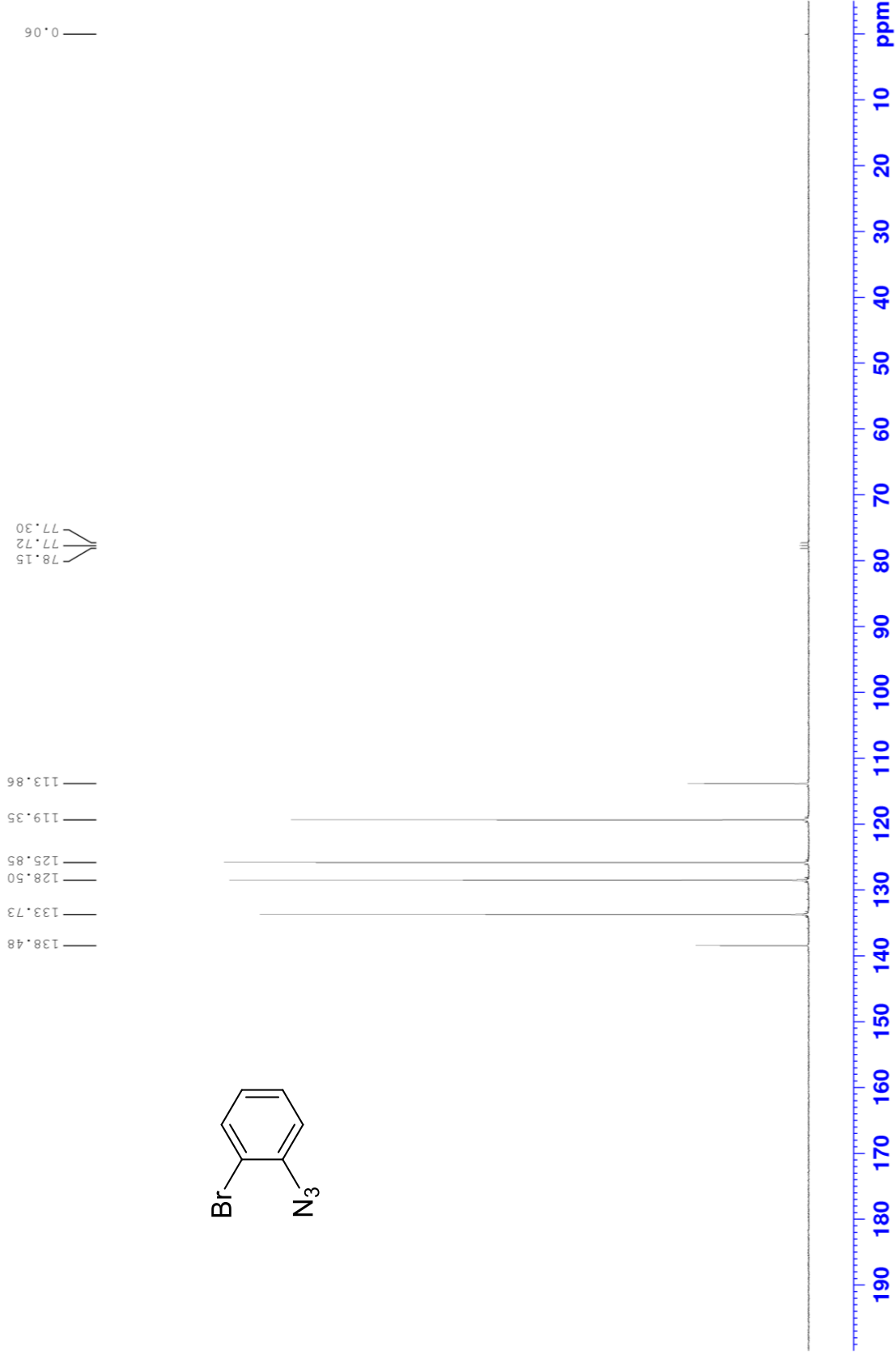
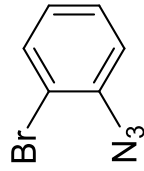
^{13}C NMR of compound **11g** (75 MHz, CDCl_3)



¹H NMR of compound **11h** (300 MHz, CDCl₃)



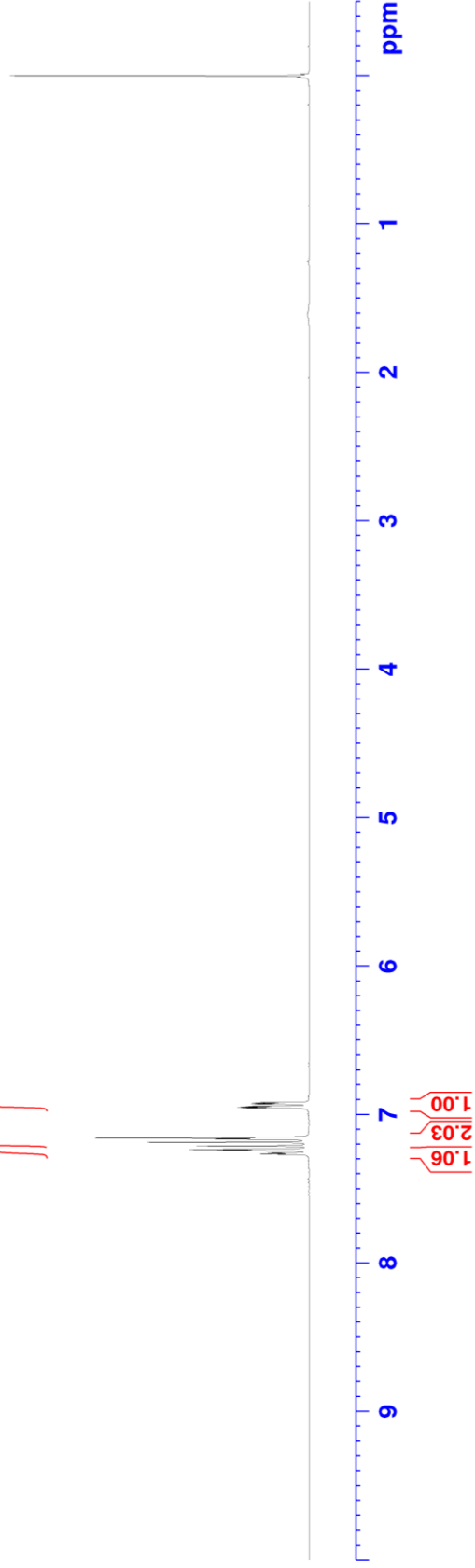
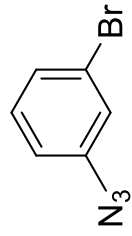
^{13}C NMR of compound **11h** (75 MHz, CDCl_3)



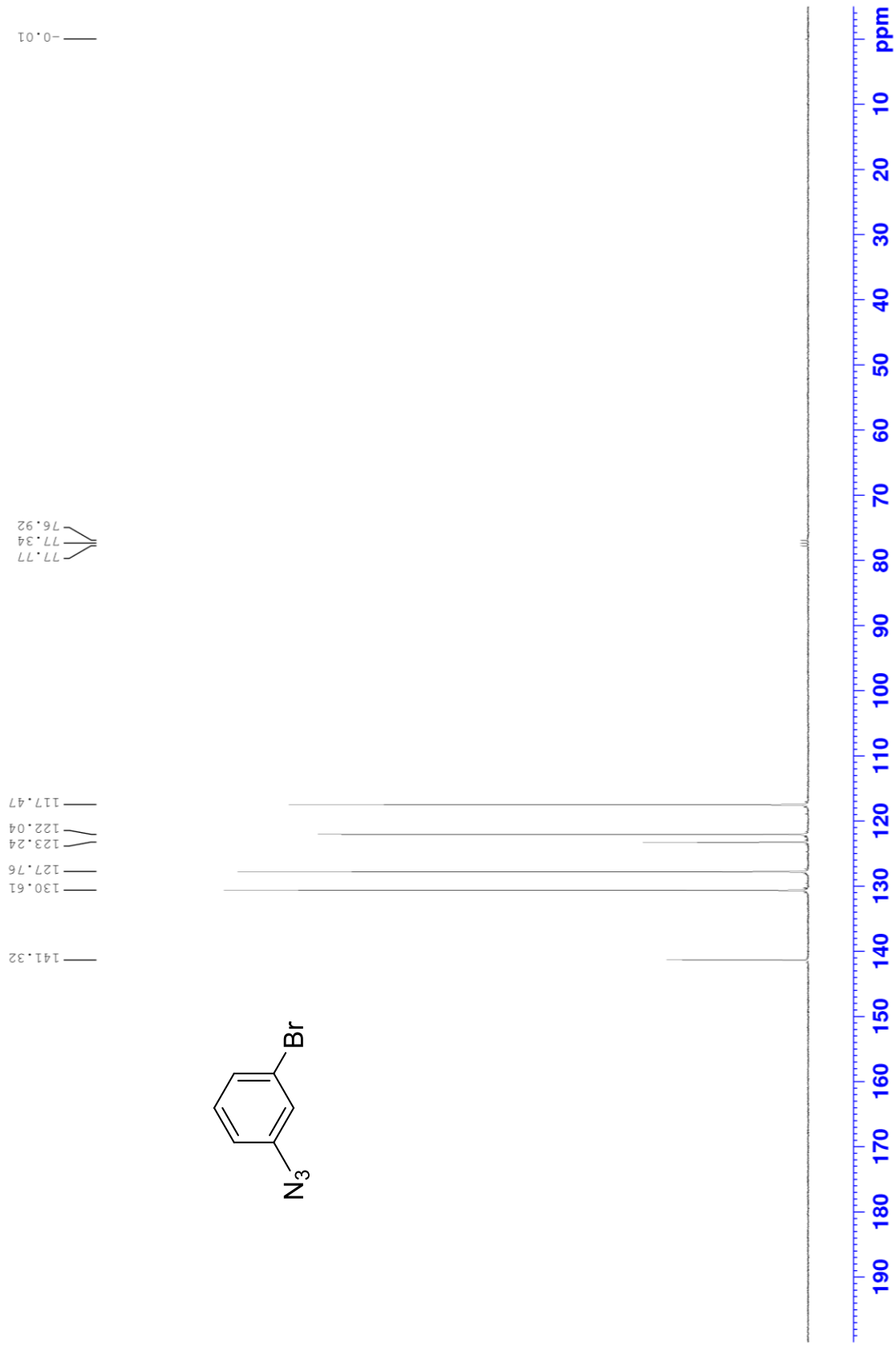
^1H NMR of compound **11i** (300 MHz, CDCl_3)

0.011
-0.000
-0.011

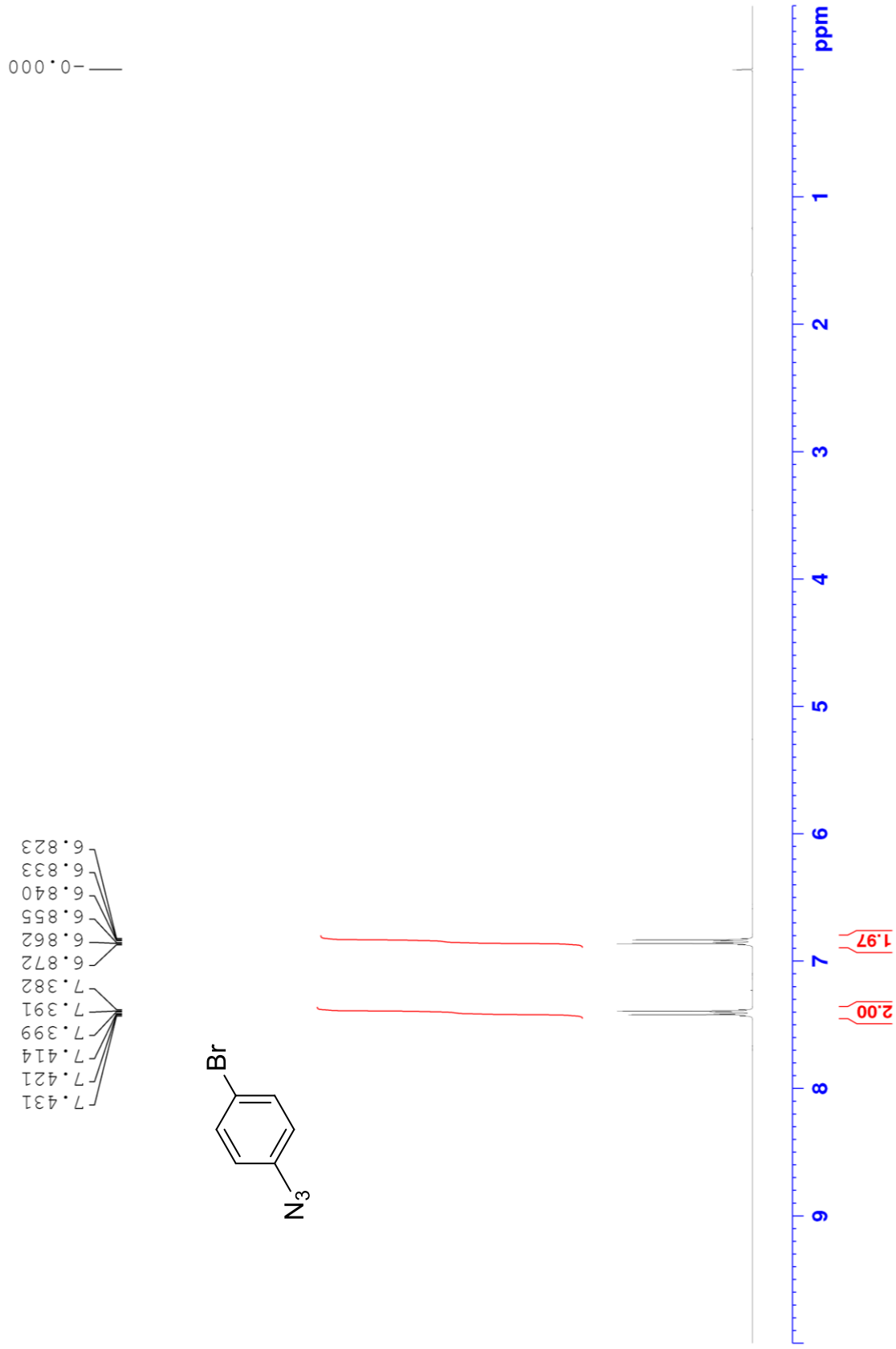
7.270
7.265
7.260
7.243
7.238
7.233
7.212
7.186
7.166
7.160
7.154
6.956
6.952
6.949
6.945
6.930
6.926
6.923
6.919



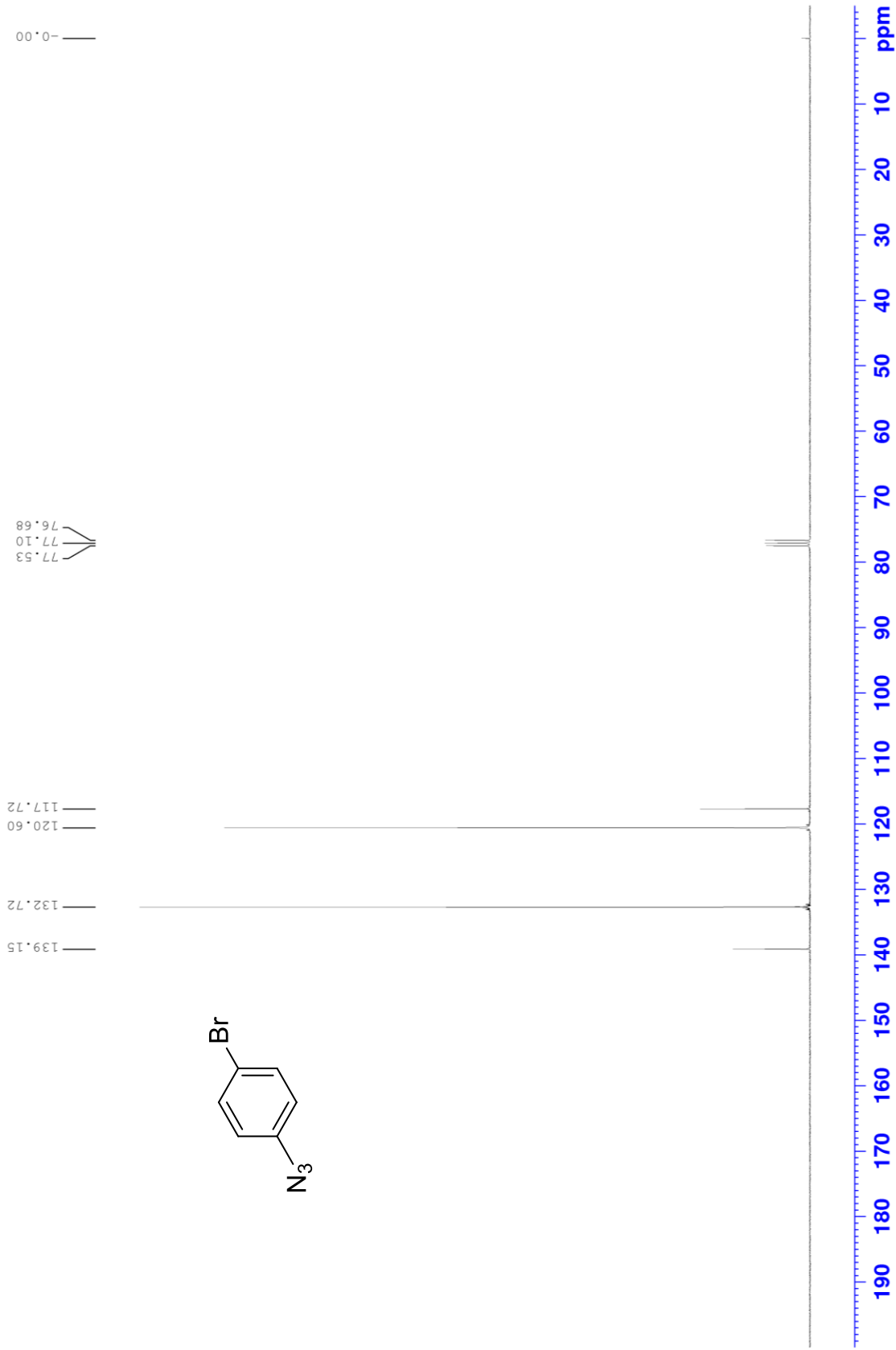
^{13}C NMR of compound **11i** (75 MHz, CDCl_3)



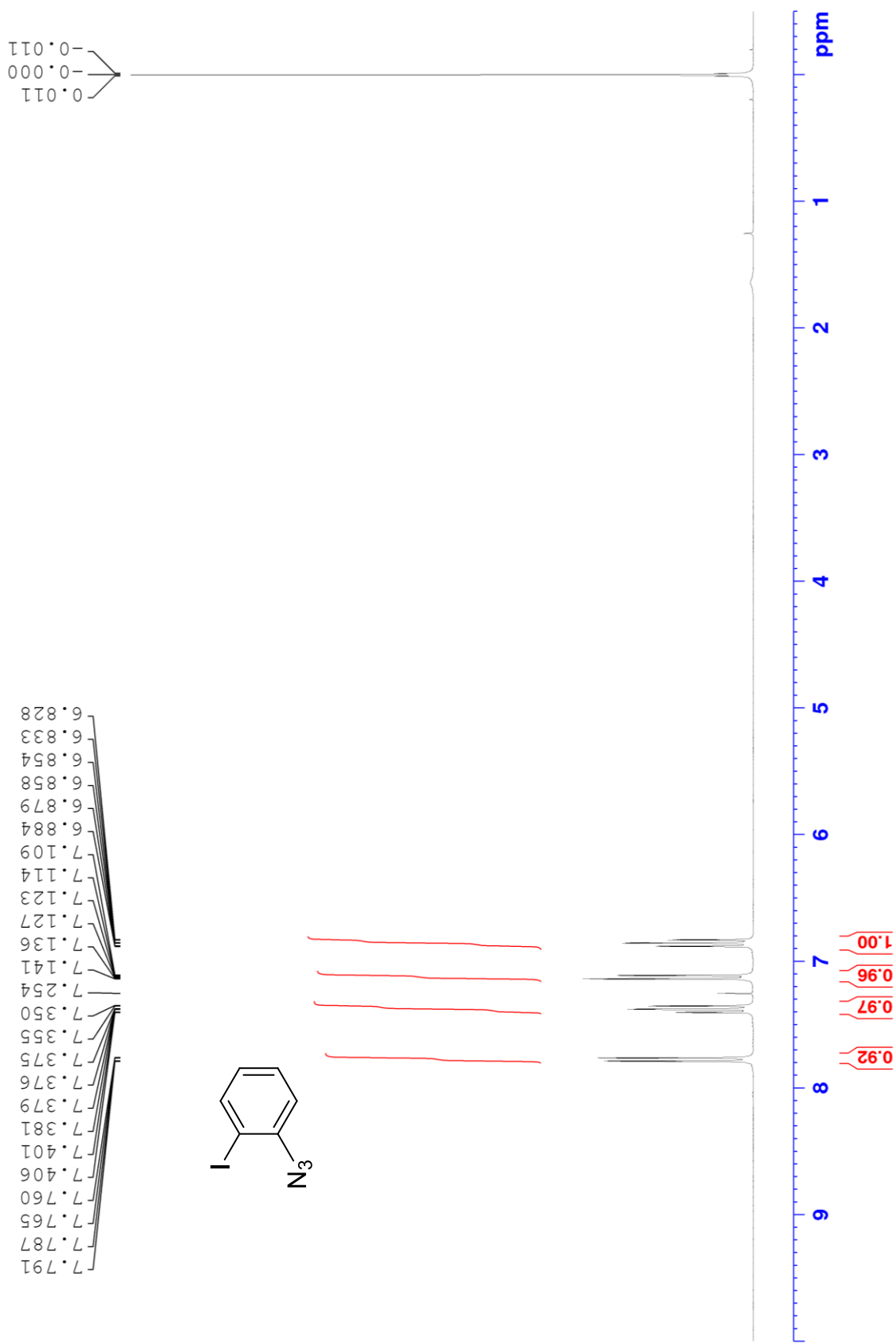
¹H NMR of compound **11j** (300 MHz, CDCl₃)



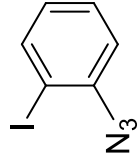
^{13}C NMR of compound **11j** (75 MHz, CDCl_3)



^1H NMR of compound **11k** (300 MHz, CDCl_3)

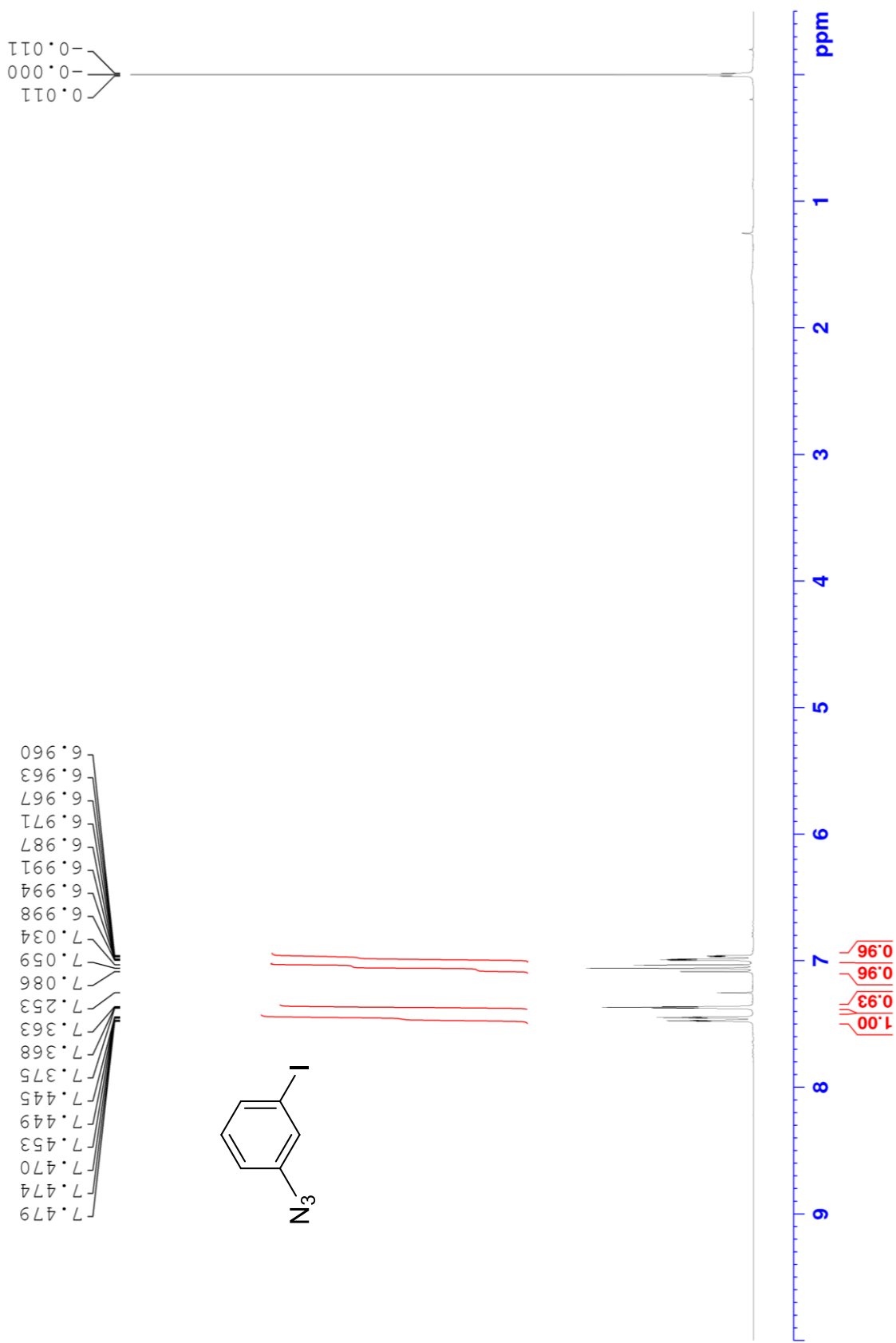


^{13}C NMR of compound **11k** (75 MHz, CDCl_3)

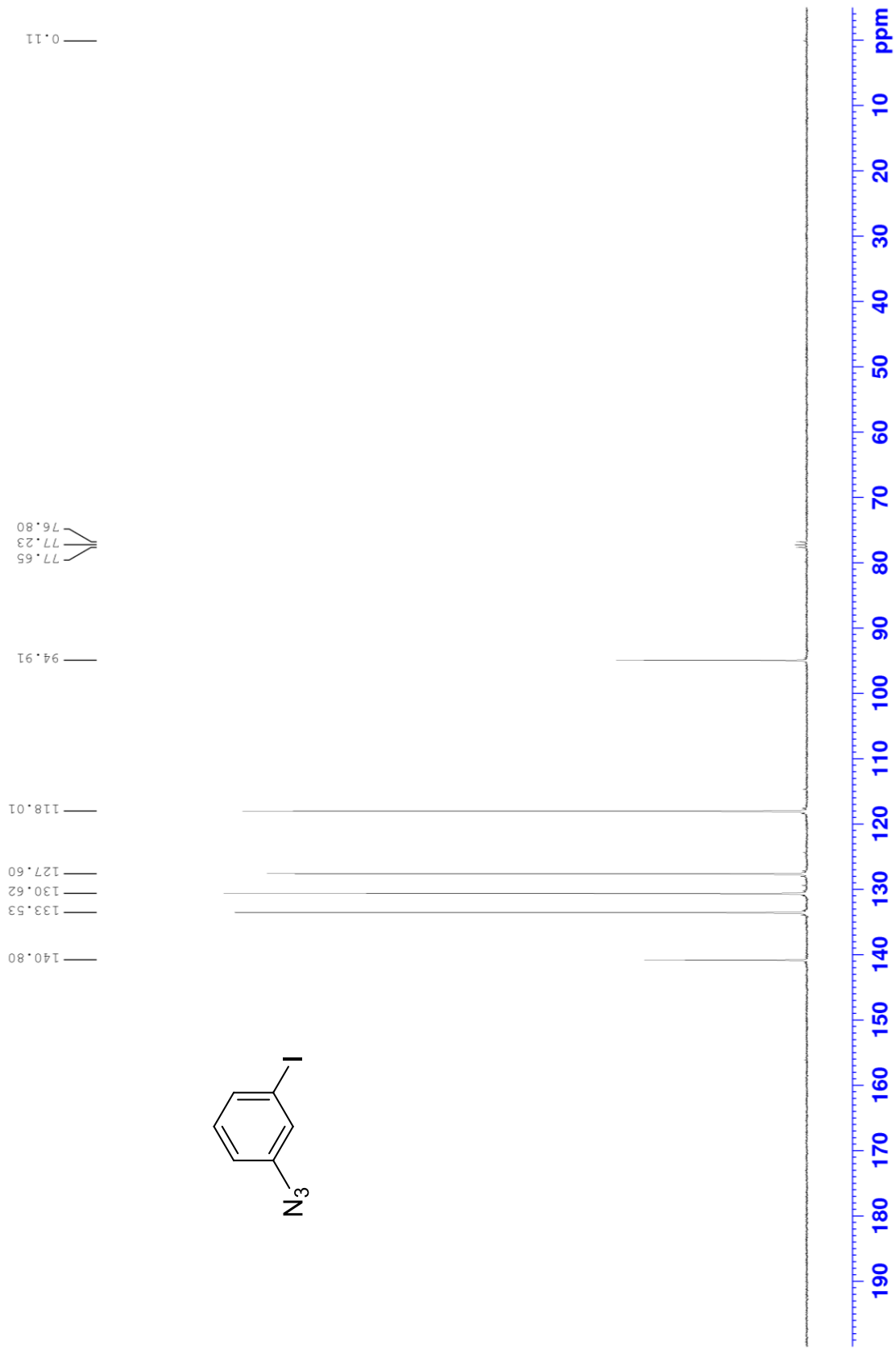


190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 ppm

^1H NMR of compound **11l** (300 MHz, CDCl_3)

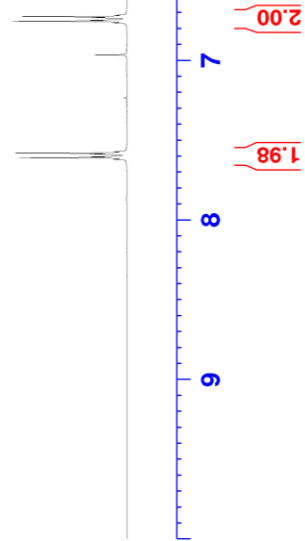
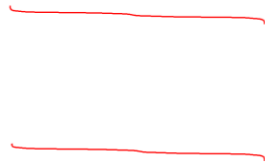
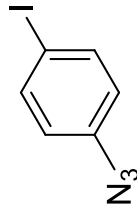


^{13}C NMR of compound **11l** (75 MHz, CDCl_3)

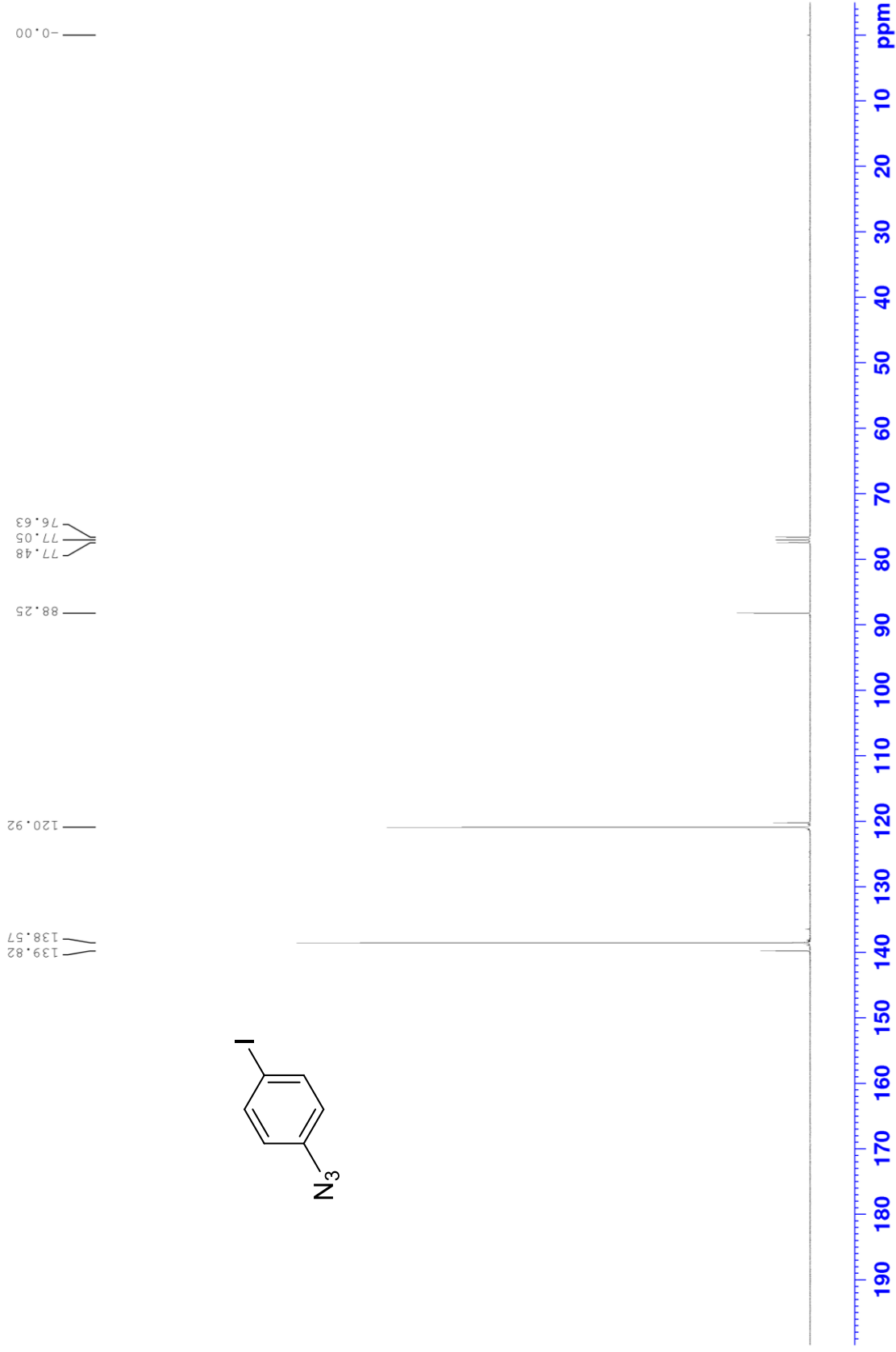


^1H NMR of compound **11m** (300 MHz, CDCl_3)

7.620
7.611
7.604
7.596
7.589
7.582
7.573
7.236
6.765
6.755
6.748
6.733
6.726
6.717
6.709



^{13}C NMR of compound **11m** (75 MHz, CDCl_3)

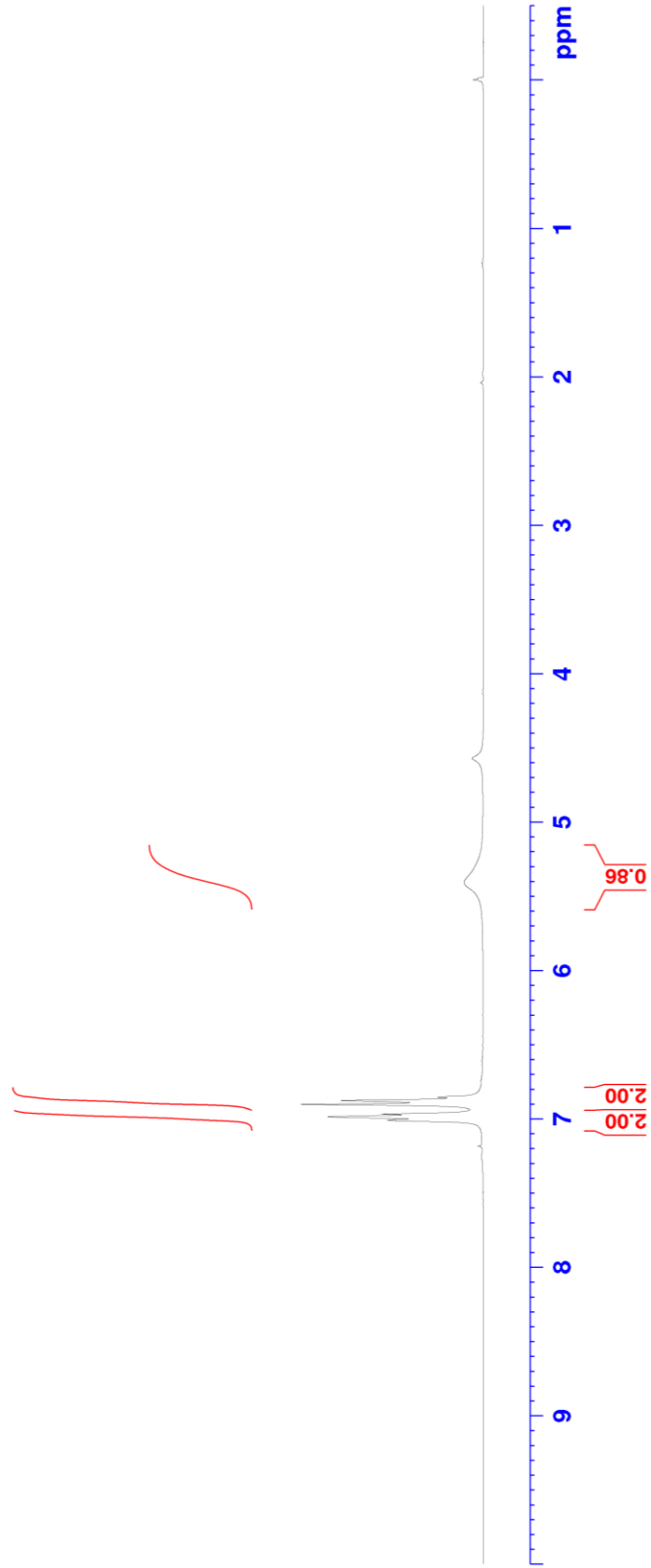
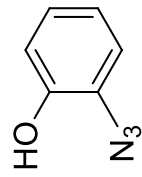


^1H NMR of compound **11n** (300 MHz, CDCl_3)

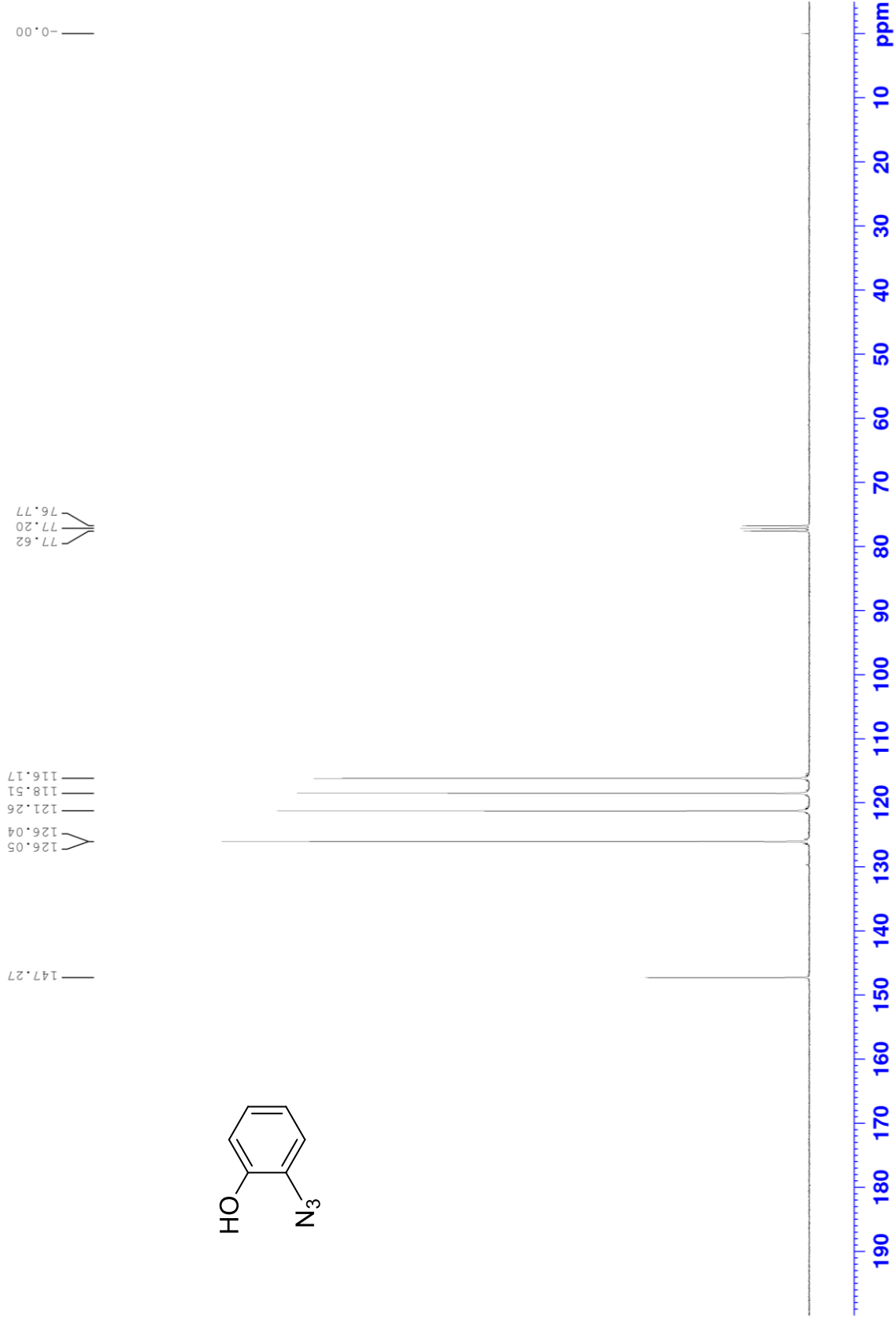
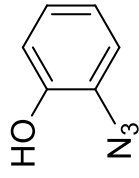
-0.011
-0.000

5.408

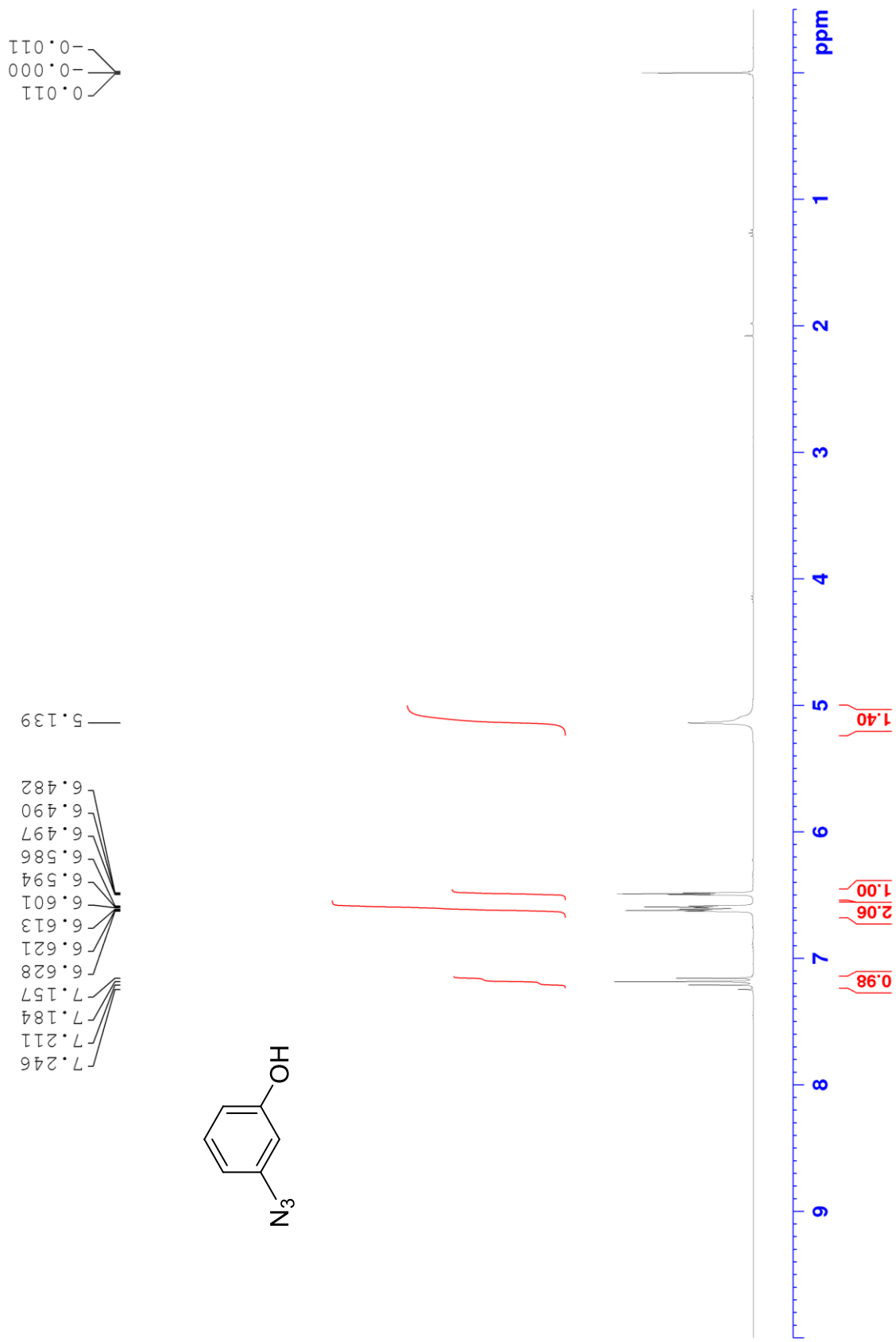
7.184
7.014
7.009
6.987
6.968
6.903
6.877
6.855
6.742



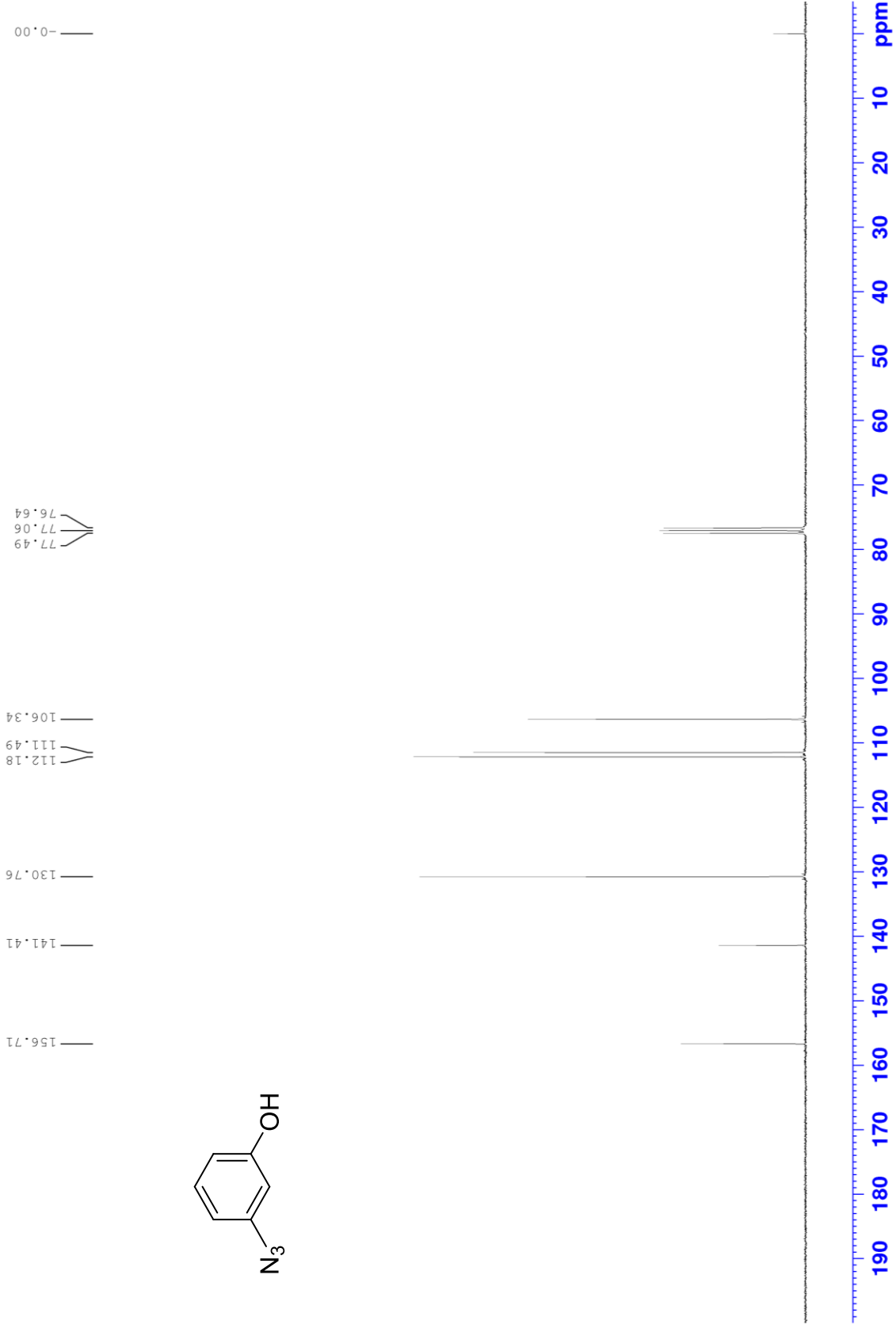
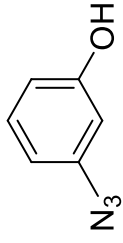
^{13}C NMR of compound **11n** (75 MHz, CDCl_3)



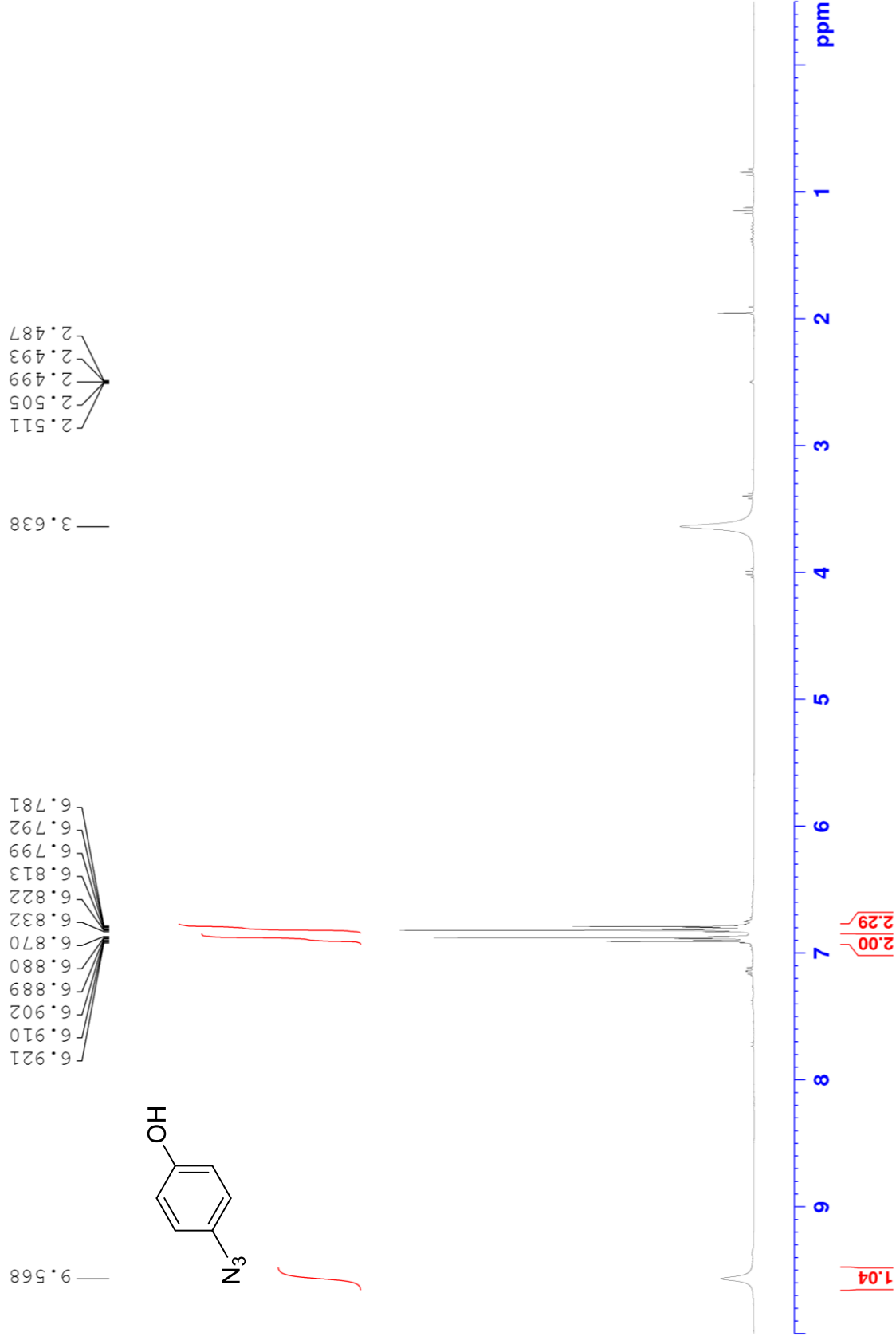
^1H NMR of compound **11o** (300 MHz, CDCl_3)



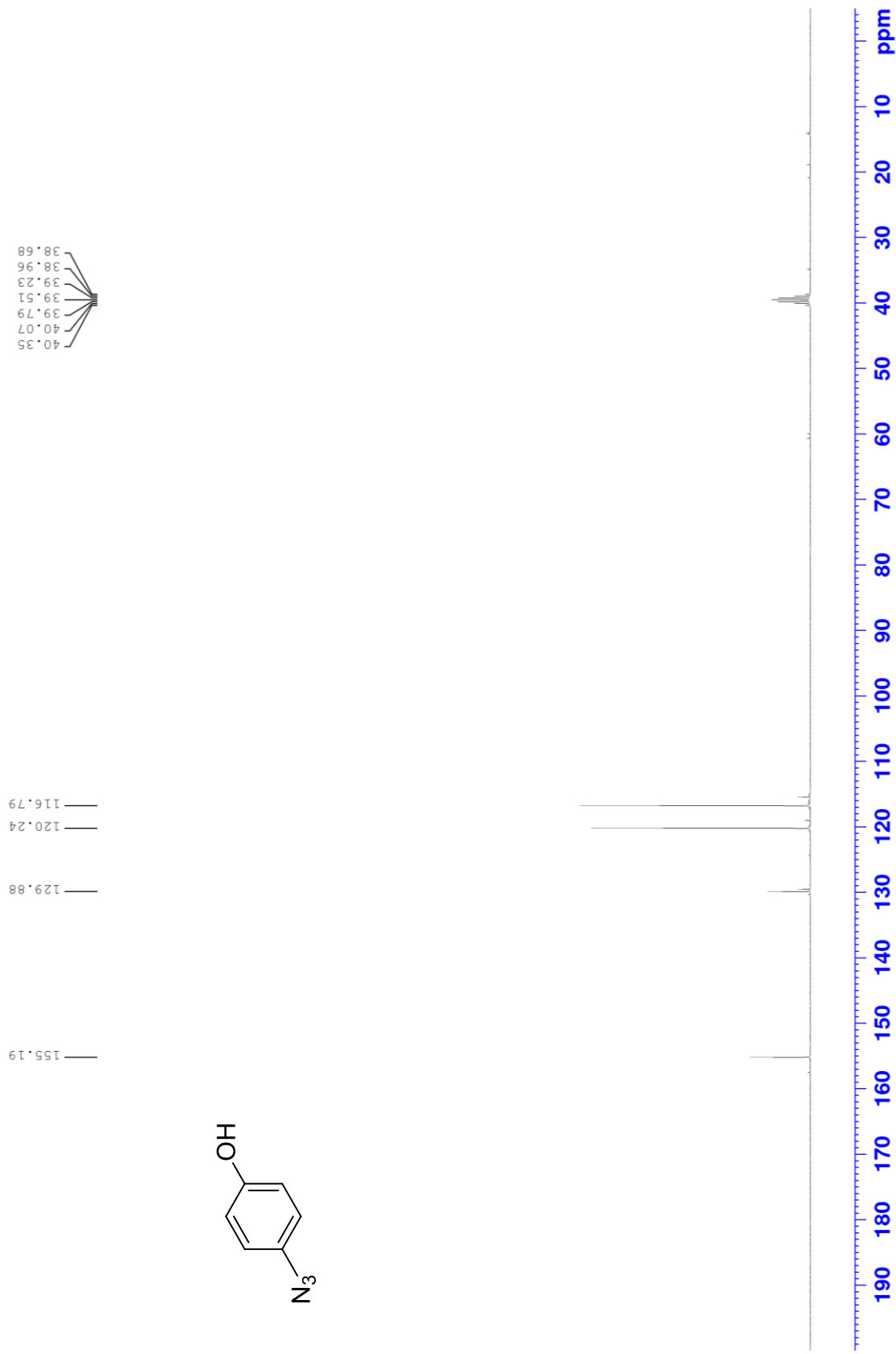
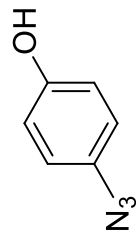
^{13}C NMR of compound **11o** (75 MHz, CDCl_3)



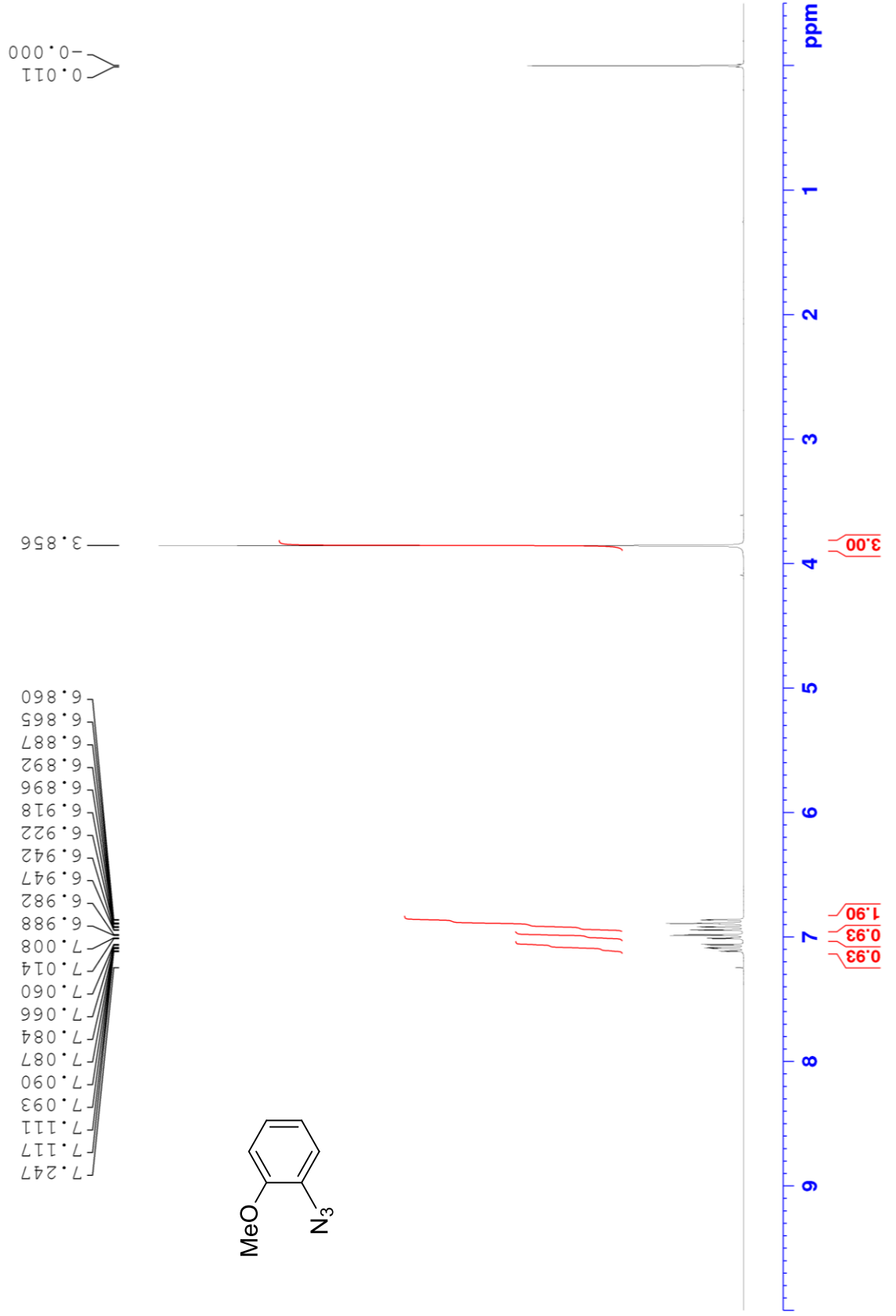
^1H NMR of compound **11p** (300 MHz, DMSO-d_6)



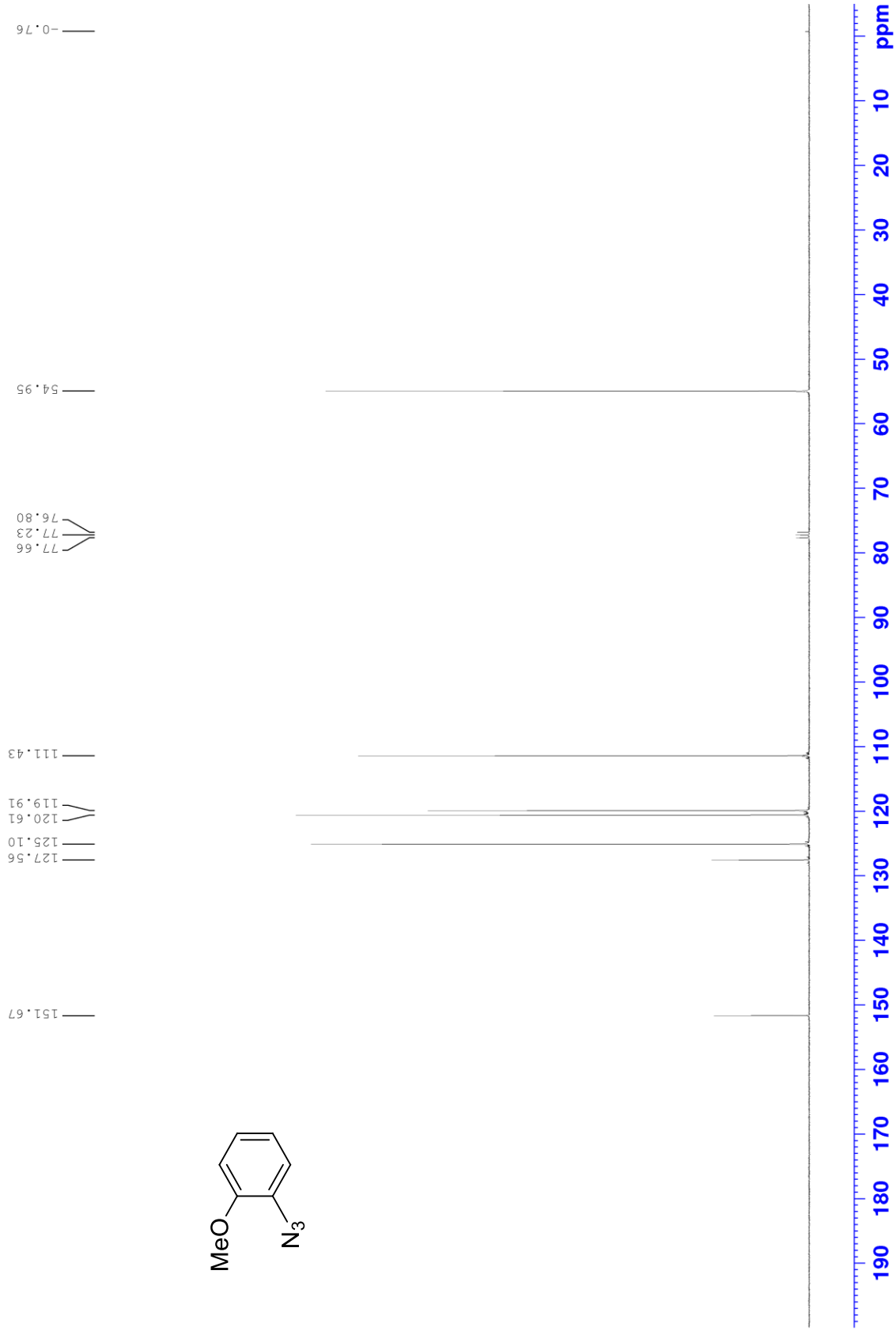
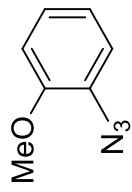
^{13}C NMR of compound **11p** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



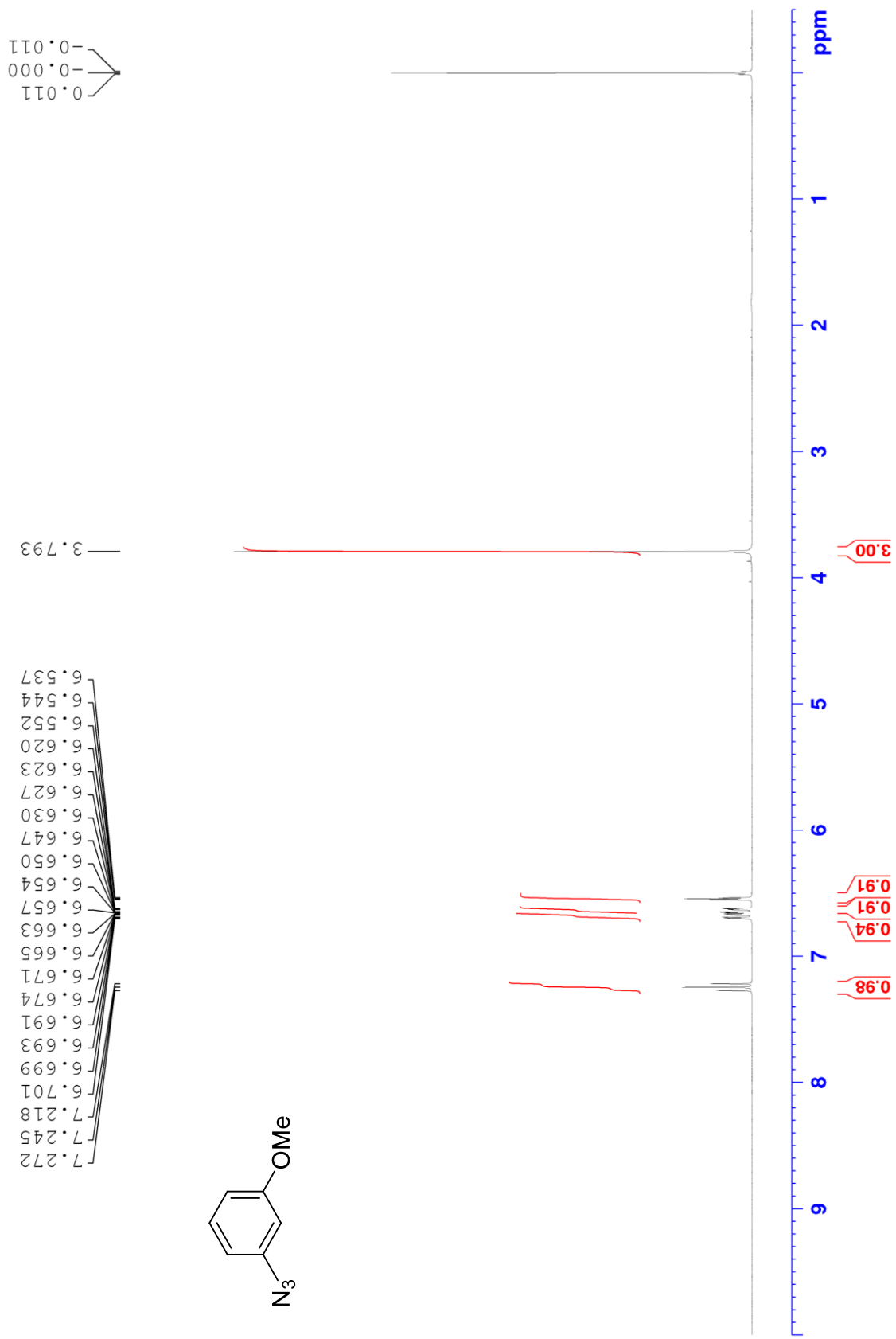
¹H NMR of compound **11q** (300 MHz, CDCl₃)



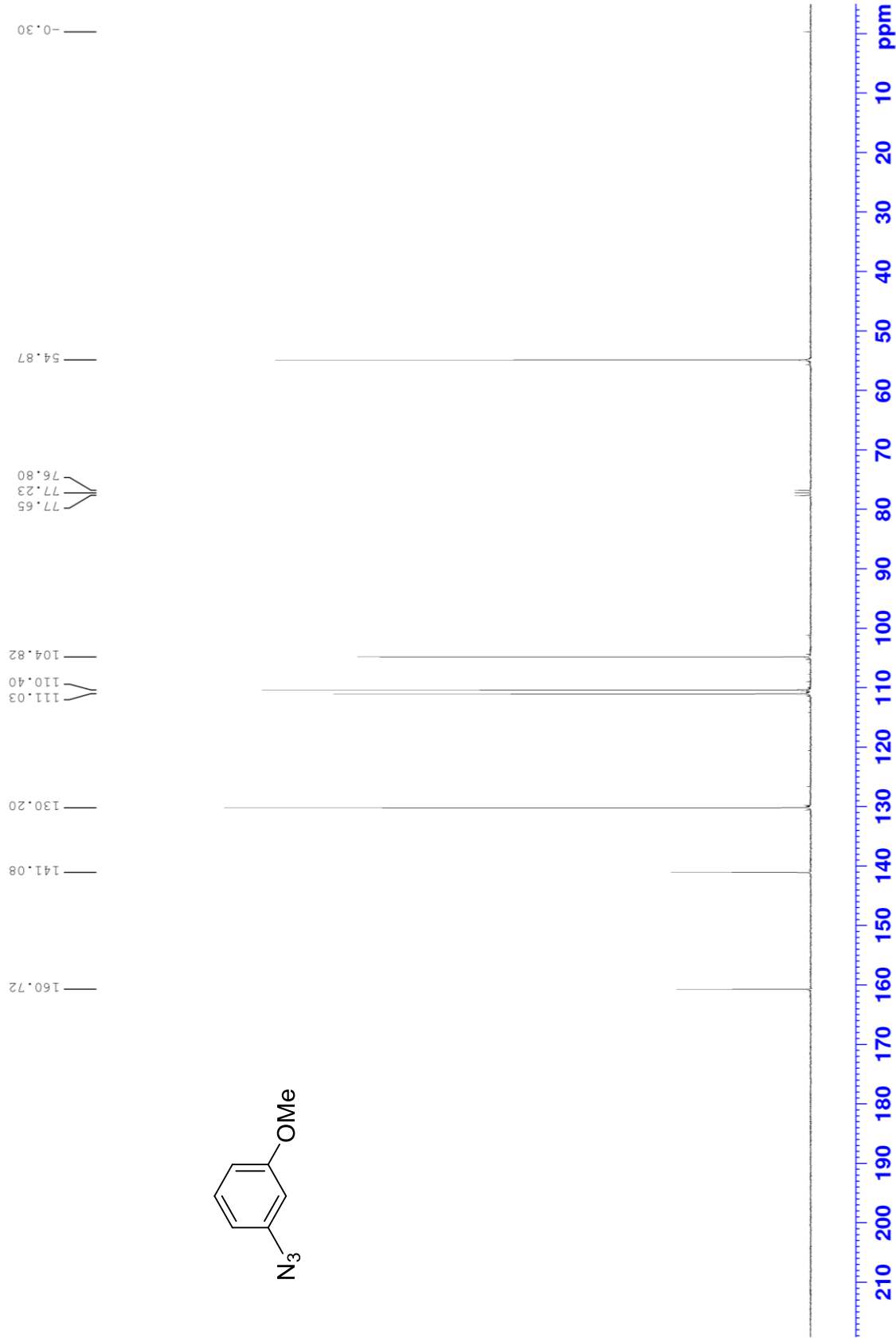
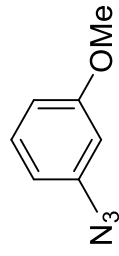
^{13}C NMR of compound **11q** (75 MHz, CDCl_3)



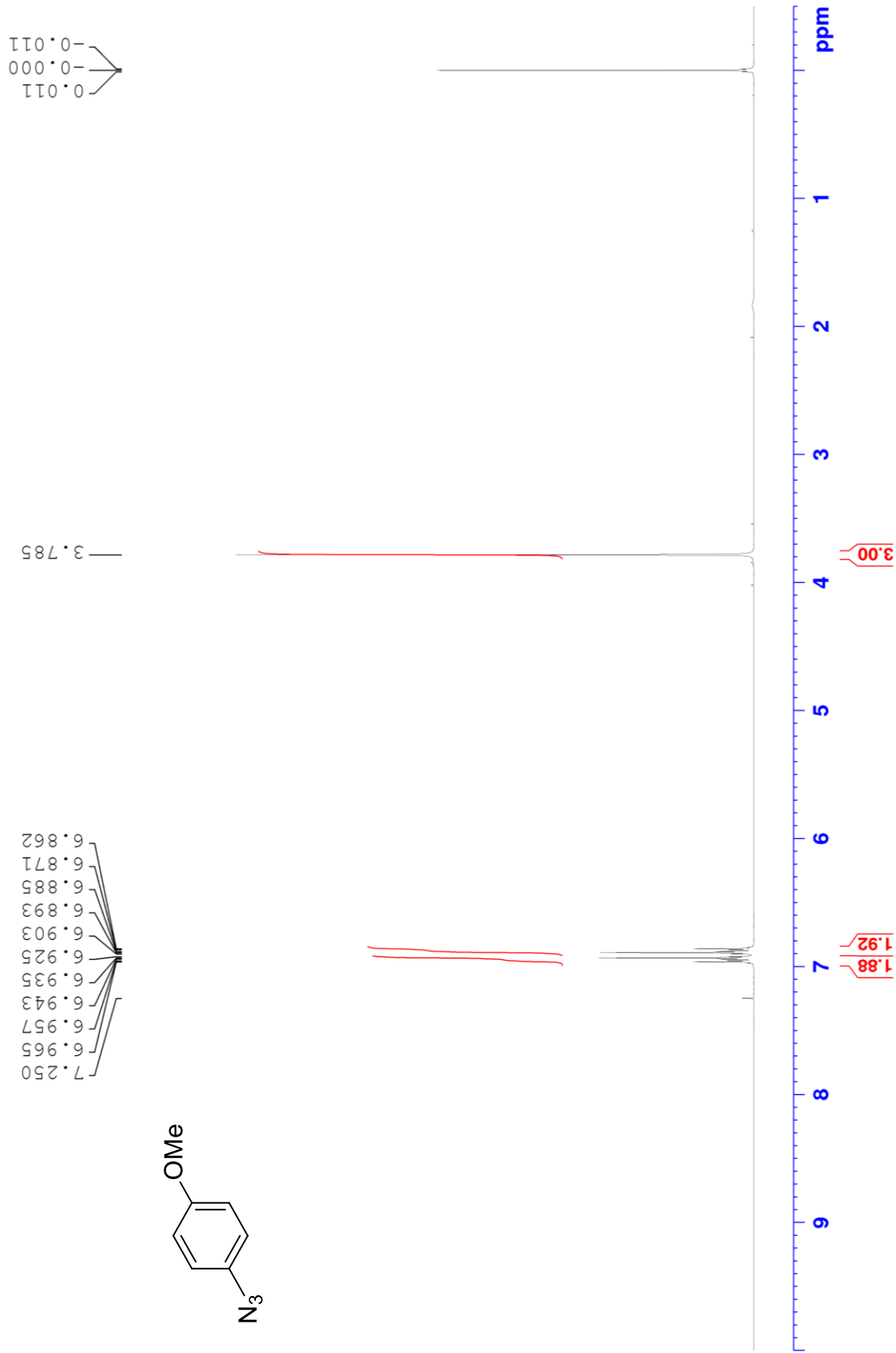
¹H NMR of compound **11r** (300 MHz, CDCl₃)



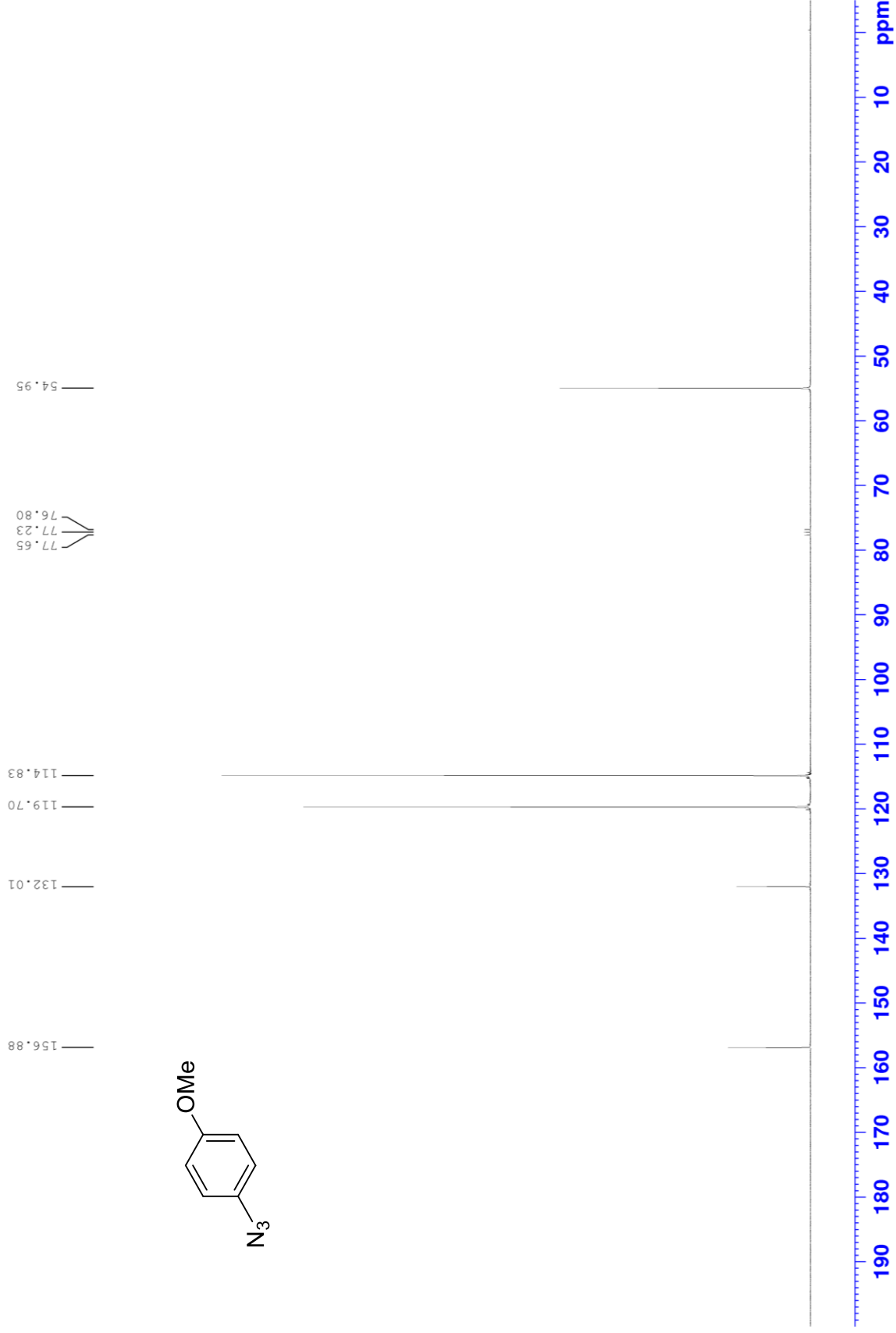
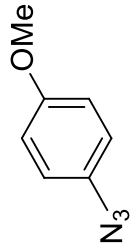
^{13}C NMR of compound **11r** (75 MHz, CDCl_3)



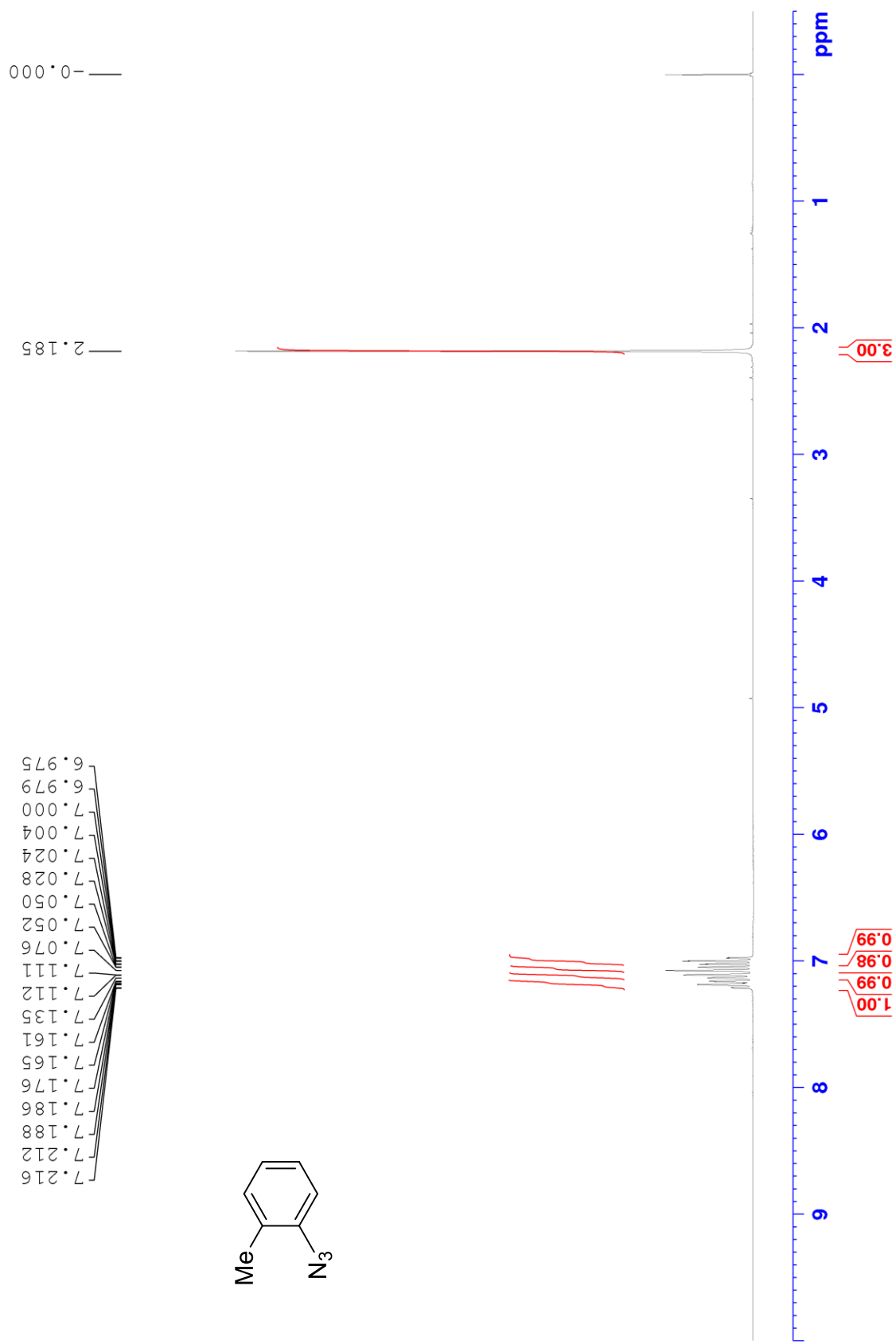
^1H NMR of compound **11s** (300 MHz, CDCl_3)



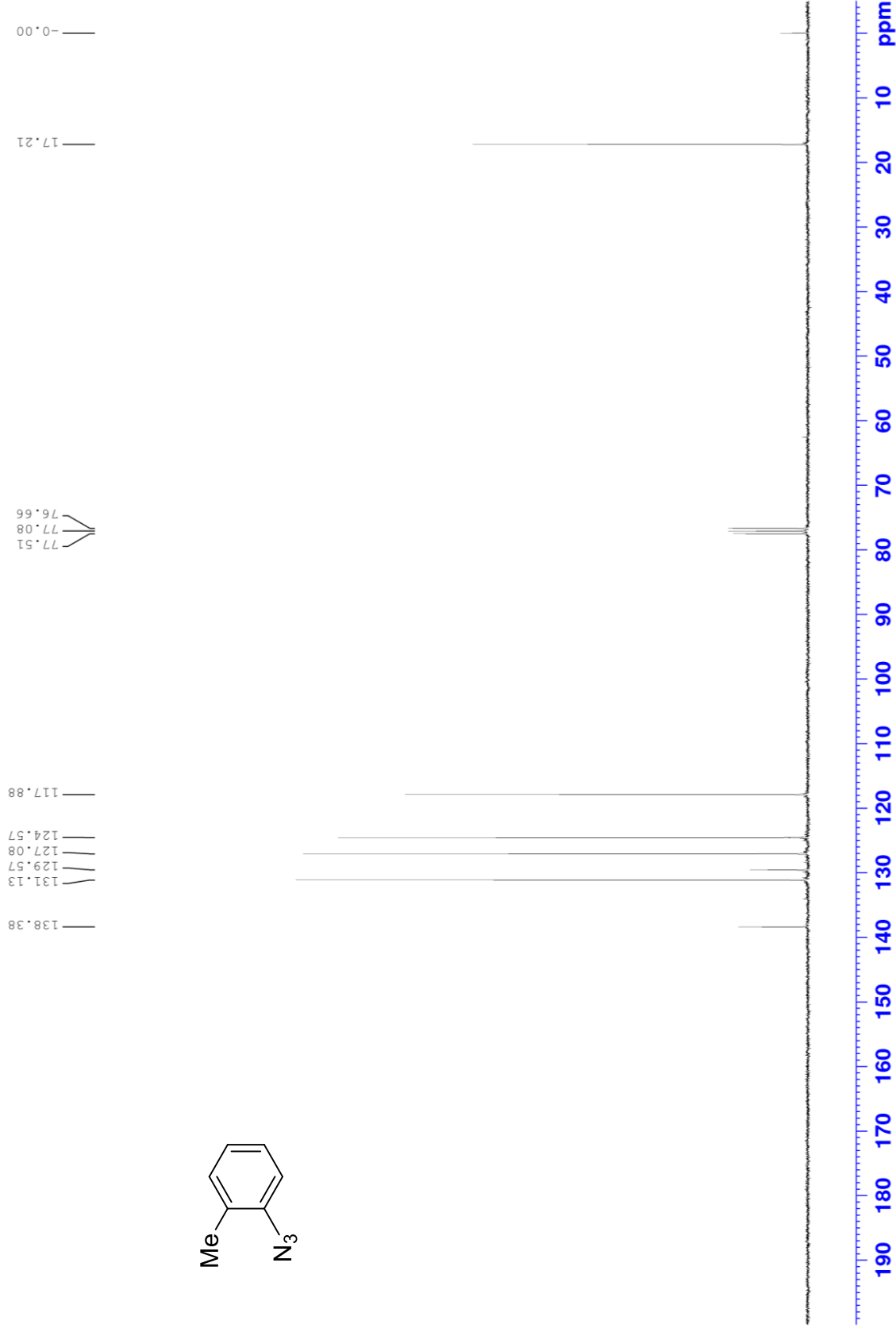
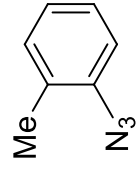
^{13}C NMR of compound **11s** (75 MHz, CDCl_3)



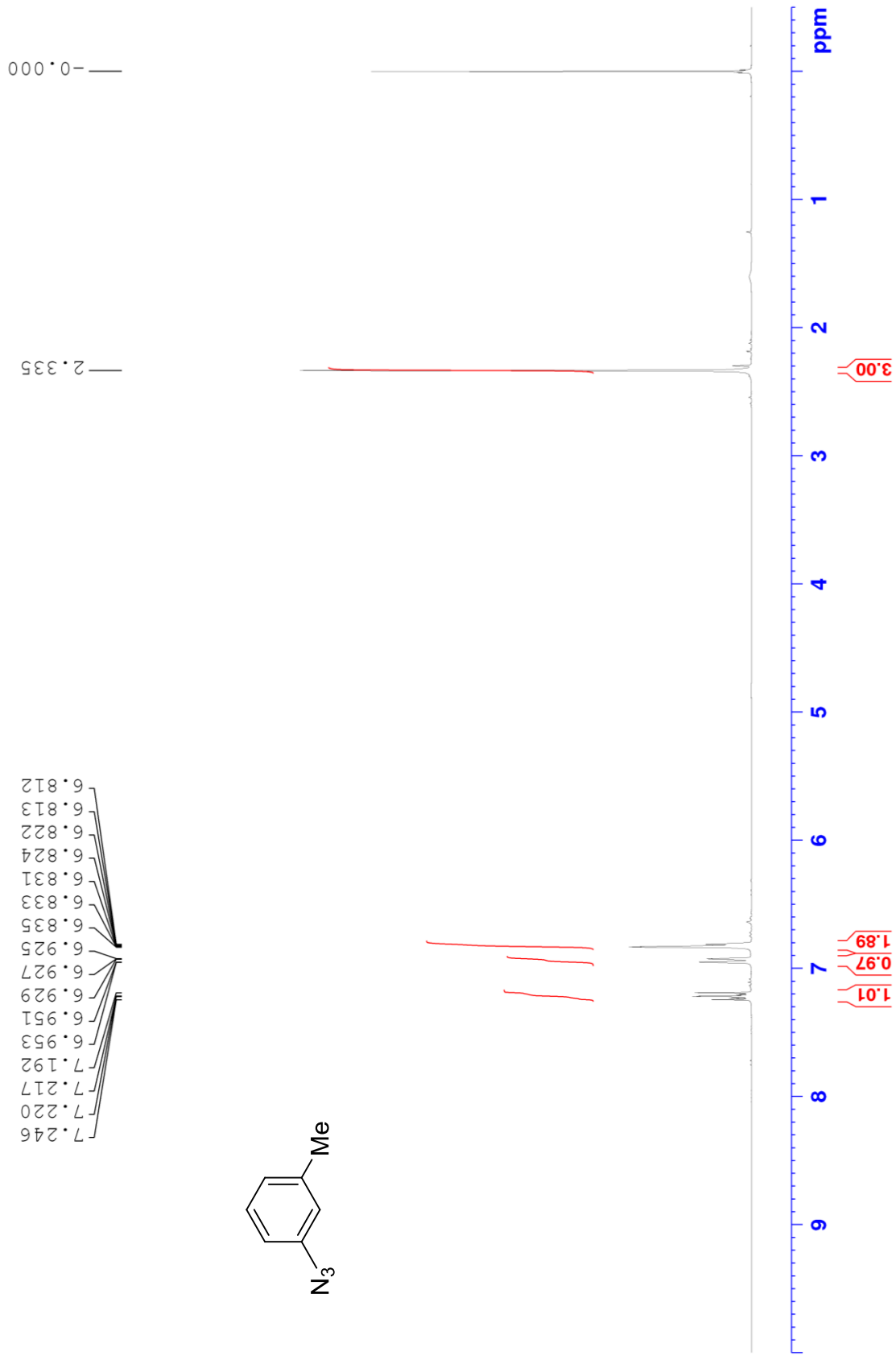
^1H NMR of compound **11t** (300 MHz, CDCl_3)



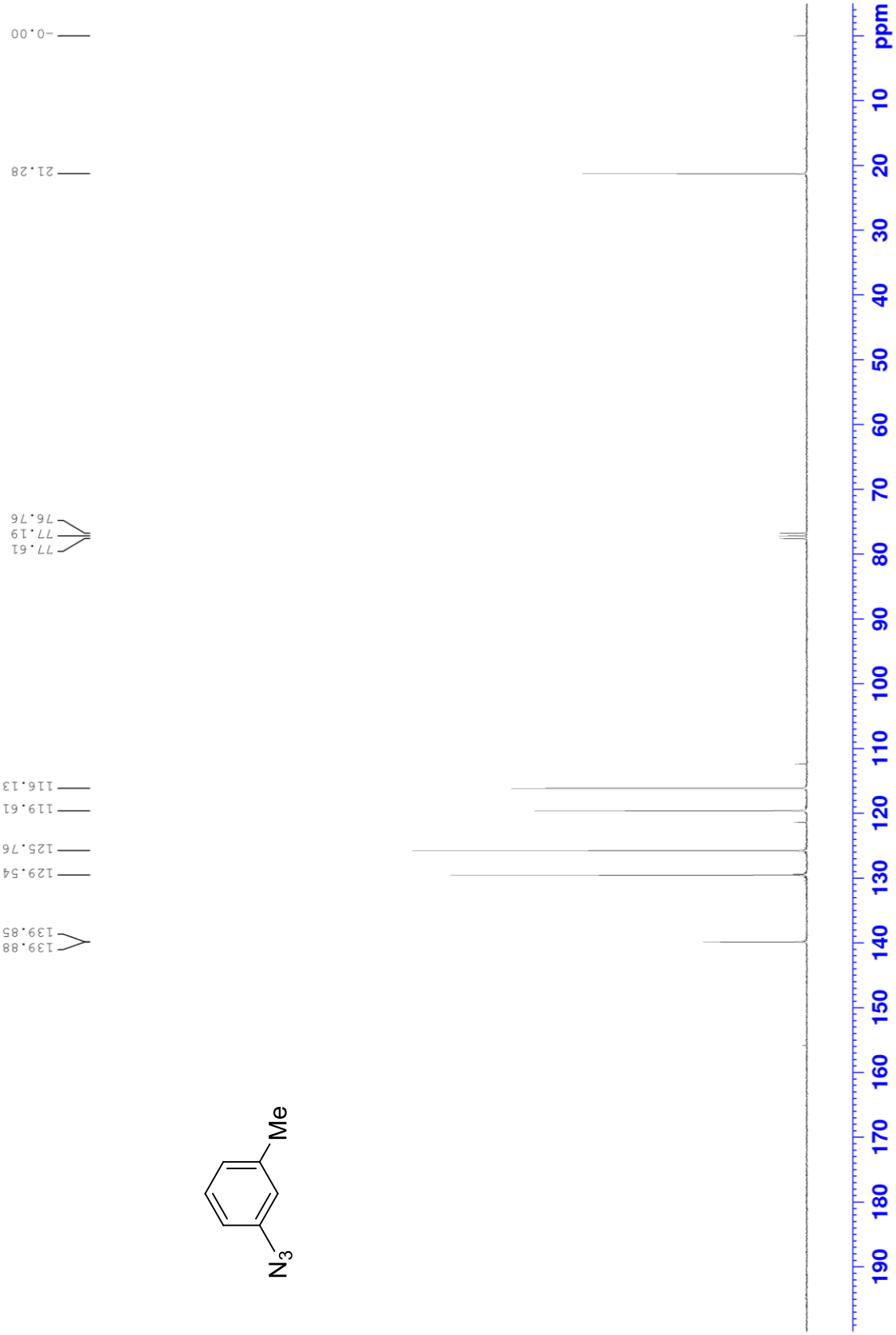
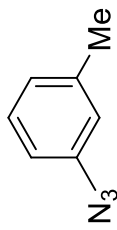
^{13}C NMR of compound **11t** (75 MHz, CDCl_3)



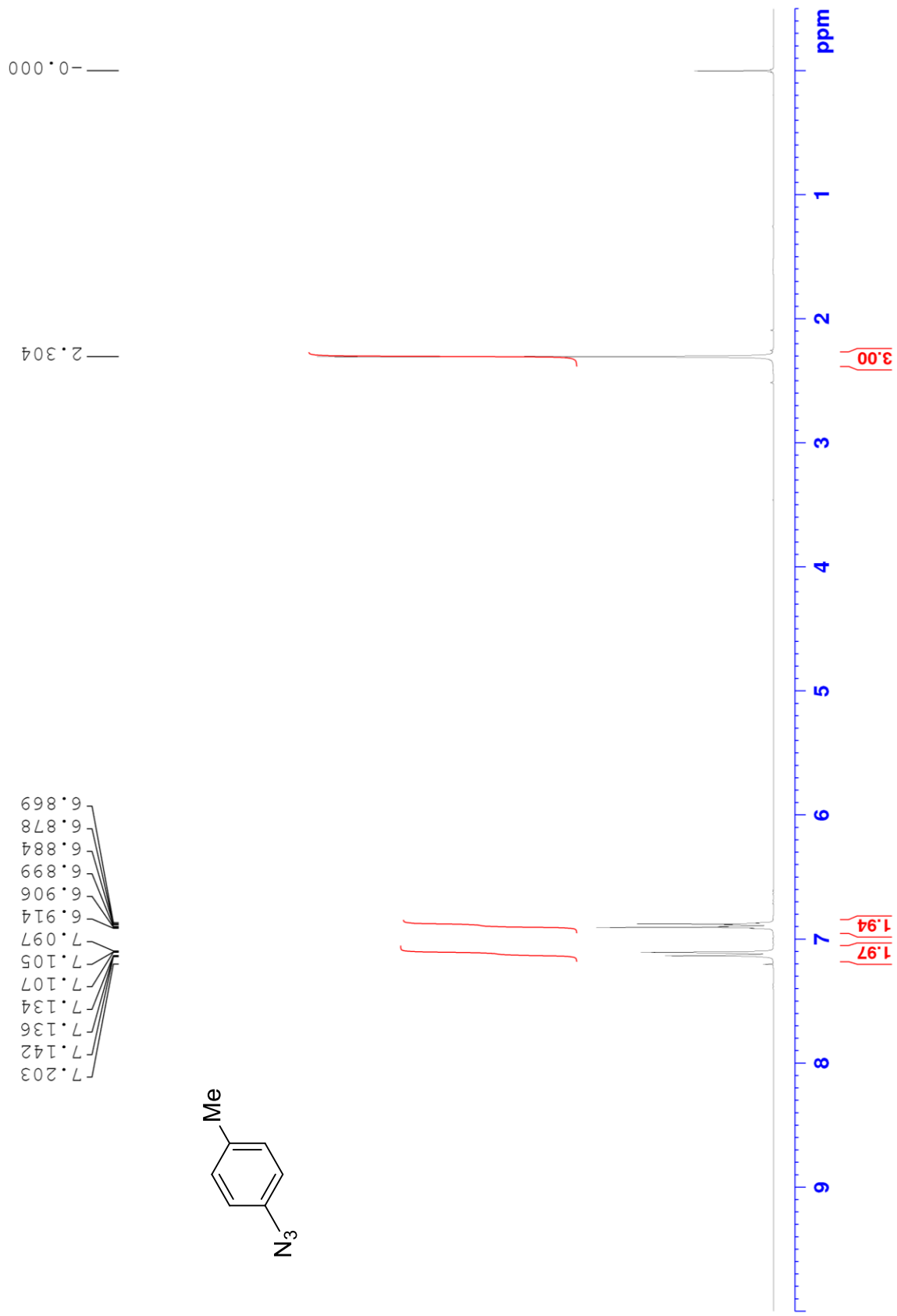
^1H NMR of compound **11u** (300 MHz, CDCl_3)



^{13}C NMR of compound **11u** (75 MHz, CDCl_3)



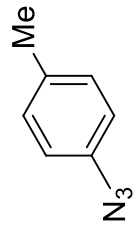
^1H NMR of compound **11v** (300 MHz, CDCl_3)



— 0.000

— 2.304

6.869
6.878
6.884
6.899
6.906
6.914
7.097
7.105
7.107
7.134
7.136
7.142
7.203



ppm

1

2

3

4

5

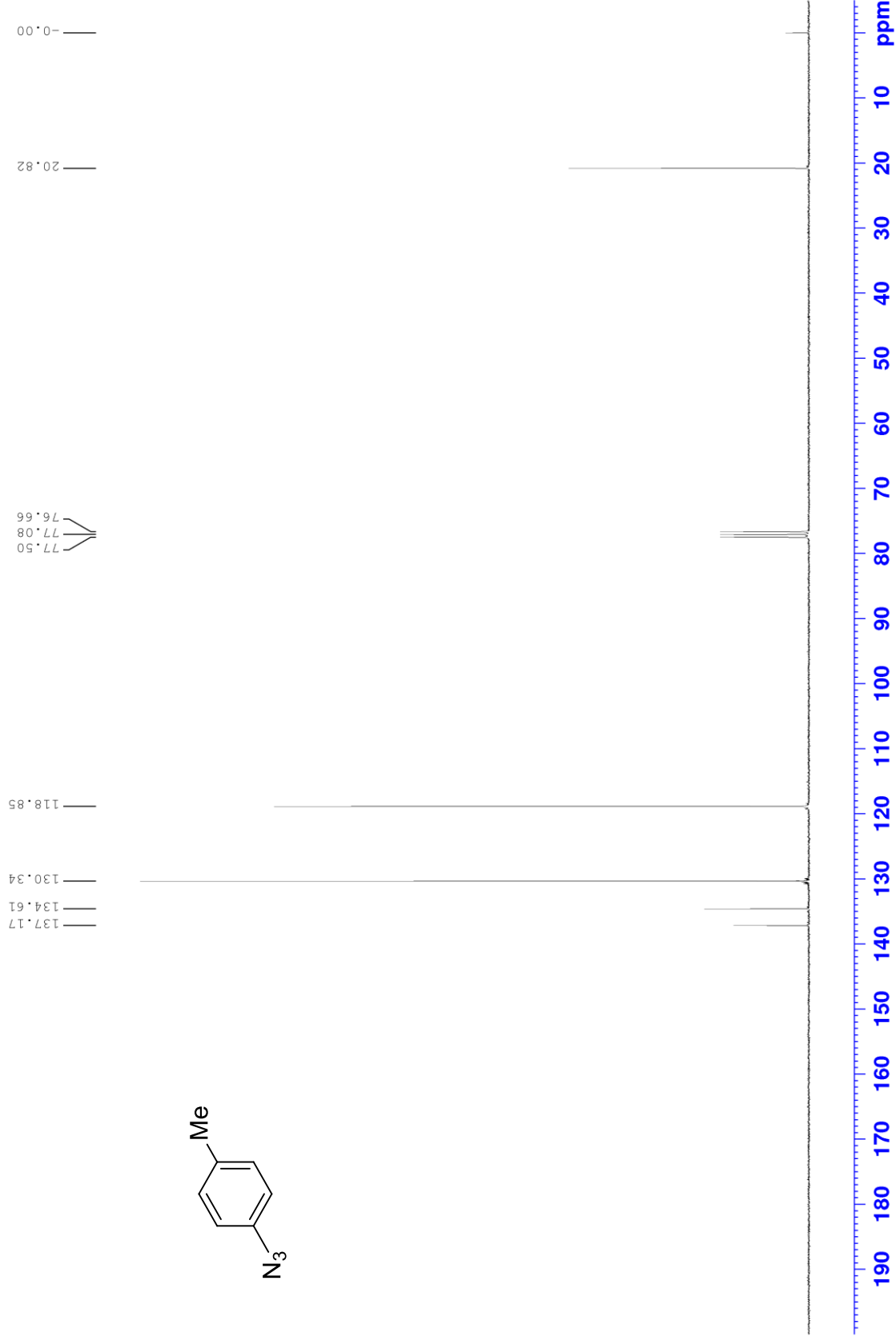
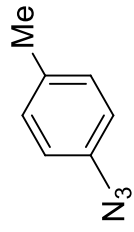
6

7

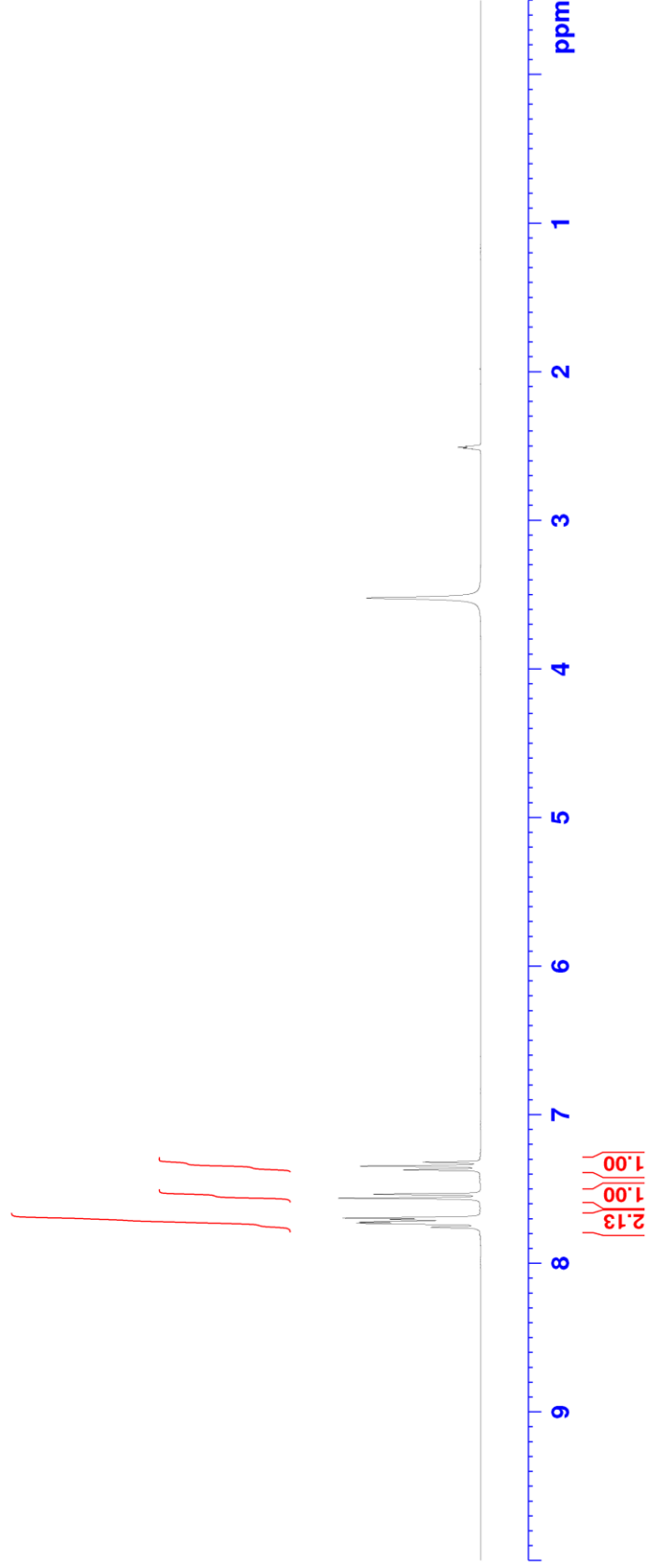
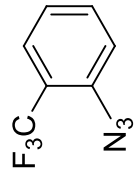
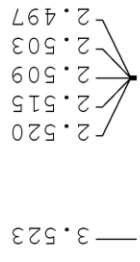
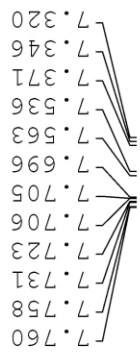
8

9

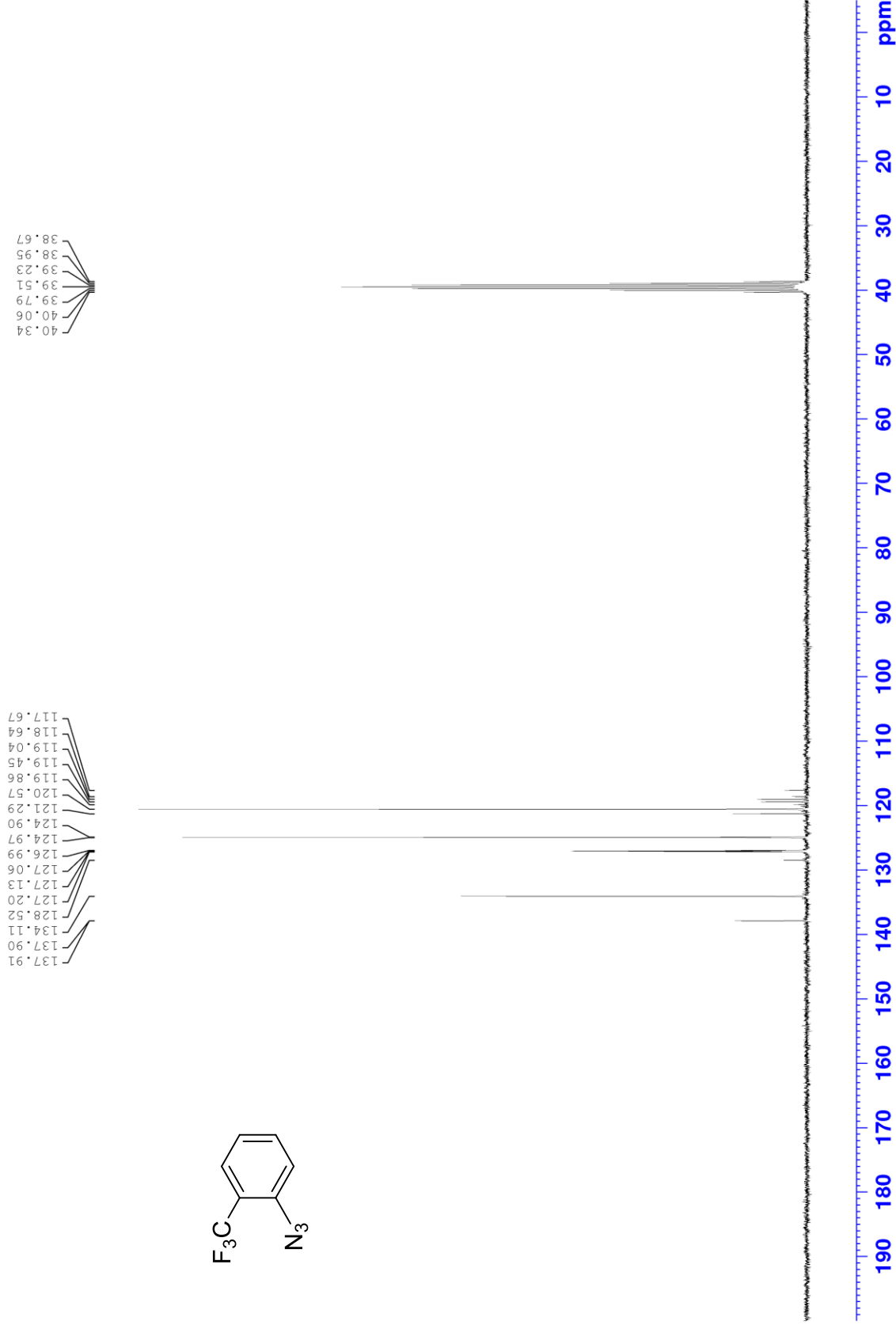
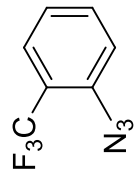
^{13}C NMR of compound **11v** (75 MHz, CDCl_3)



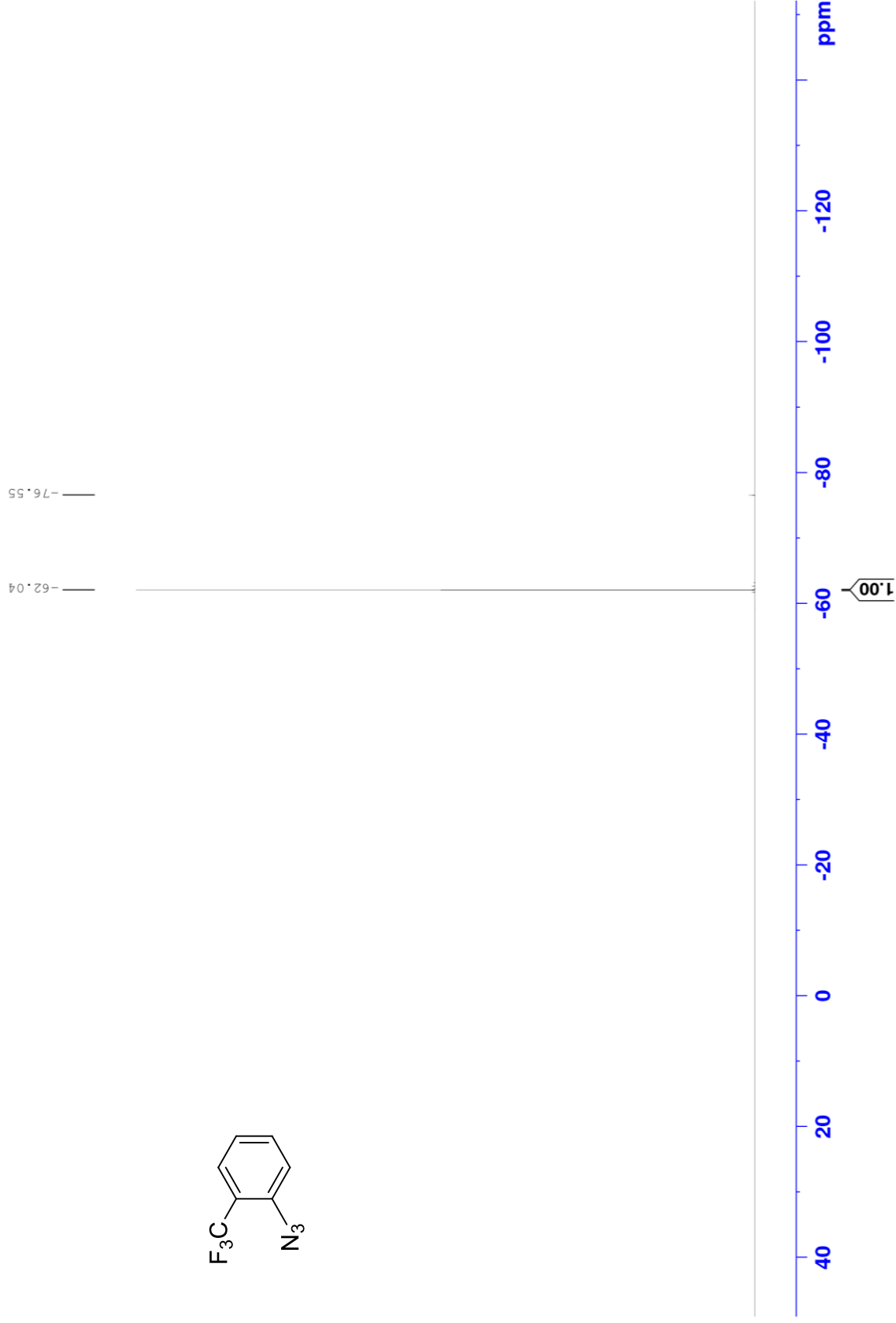
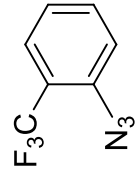
^1H NMR of compound **11w** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



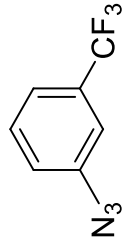
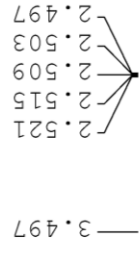
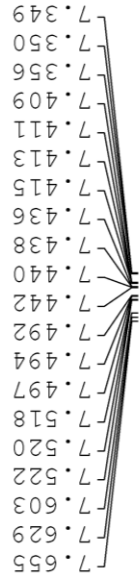
^{13}C NMR of compound **11w** (75 MHz, DMSO-d_6)



^{19}F NMR of compound **11w** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



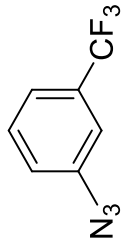
^1H NMR of compound **11x** (300 MHz, DMSO-d_6)



1.00
0.99
0.99
0.99

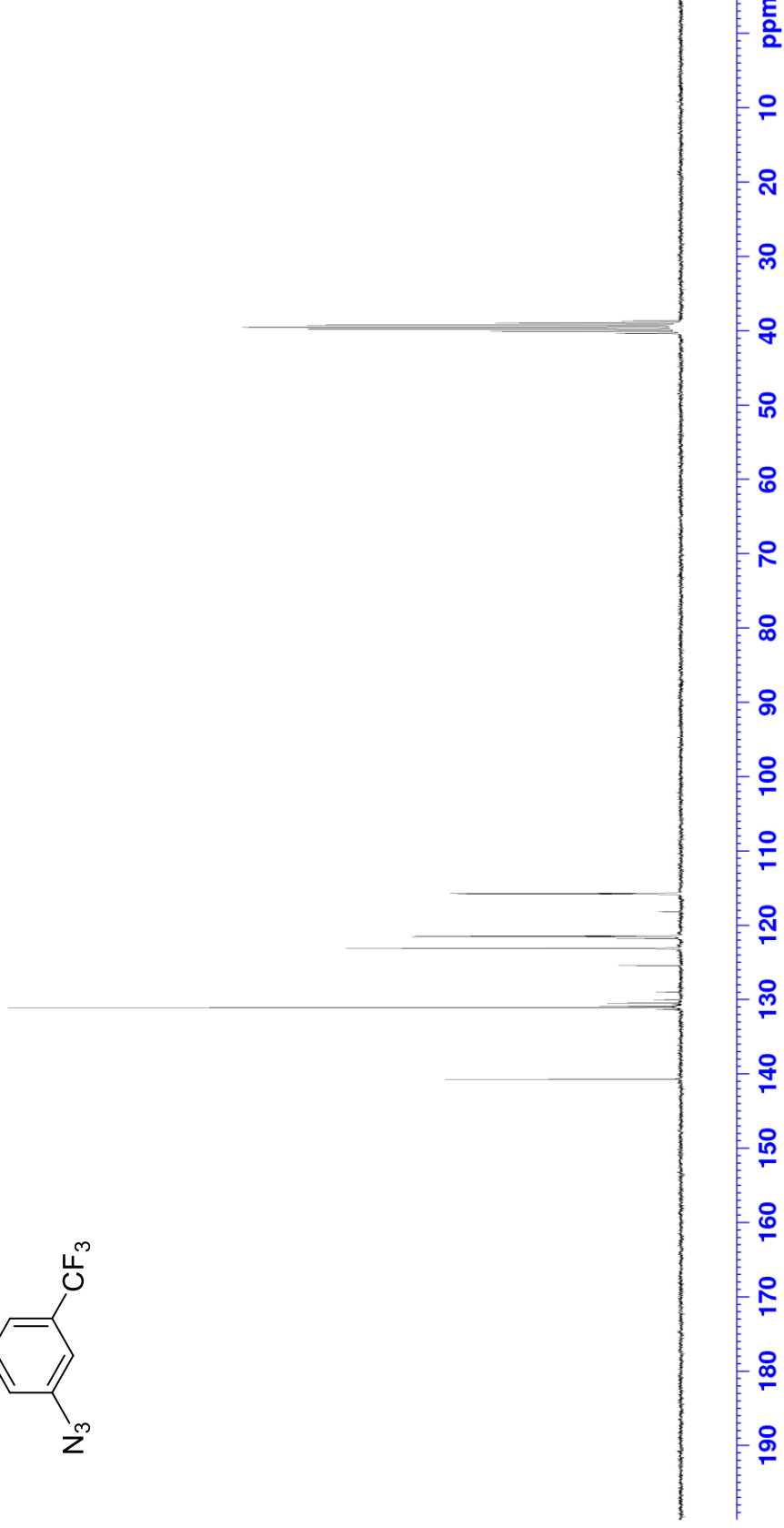


^{13}C NMR of compound **11x** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

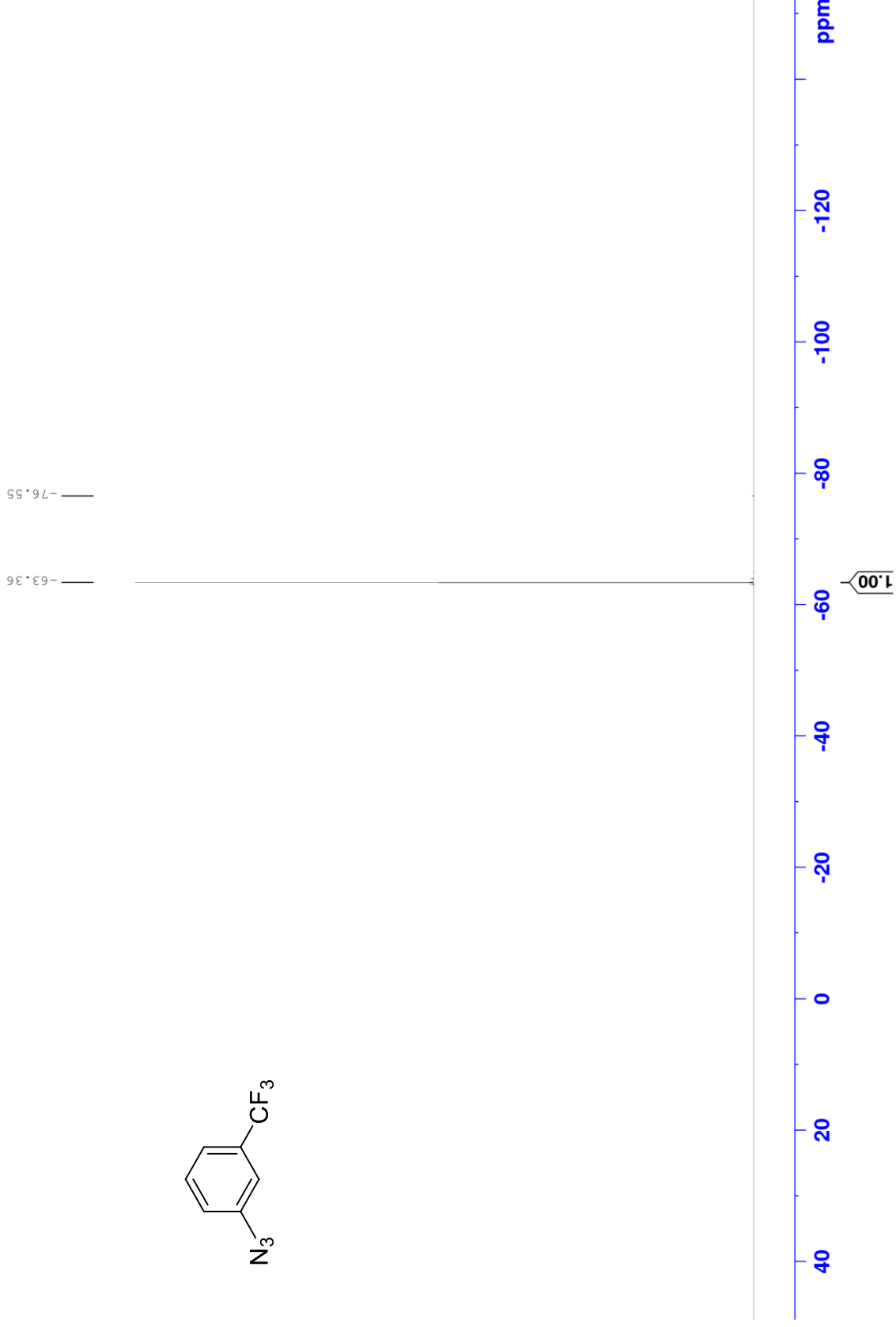
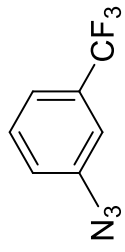


40.34
40.07
39.79
39.51
39.23
38.95
38.67

140.73
131.33
131.08
130.90
130.70
130.47
130.05
129.03
125.42
123.11
121.81
121.58
121.53
121.47
121.42
118.20
115.84
115.79
115.74
115.69



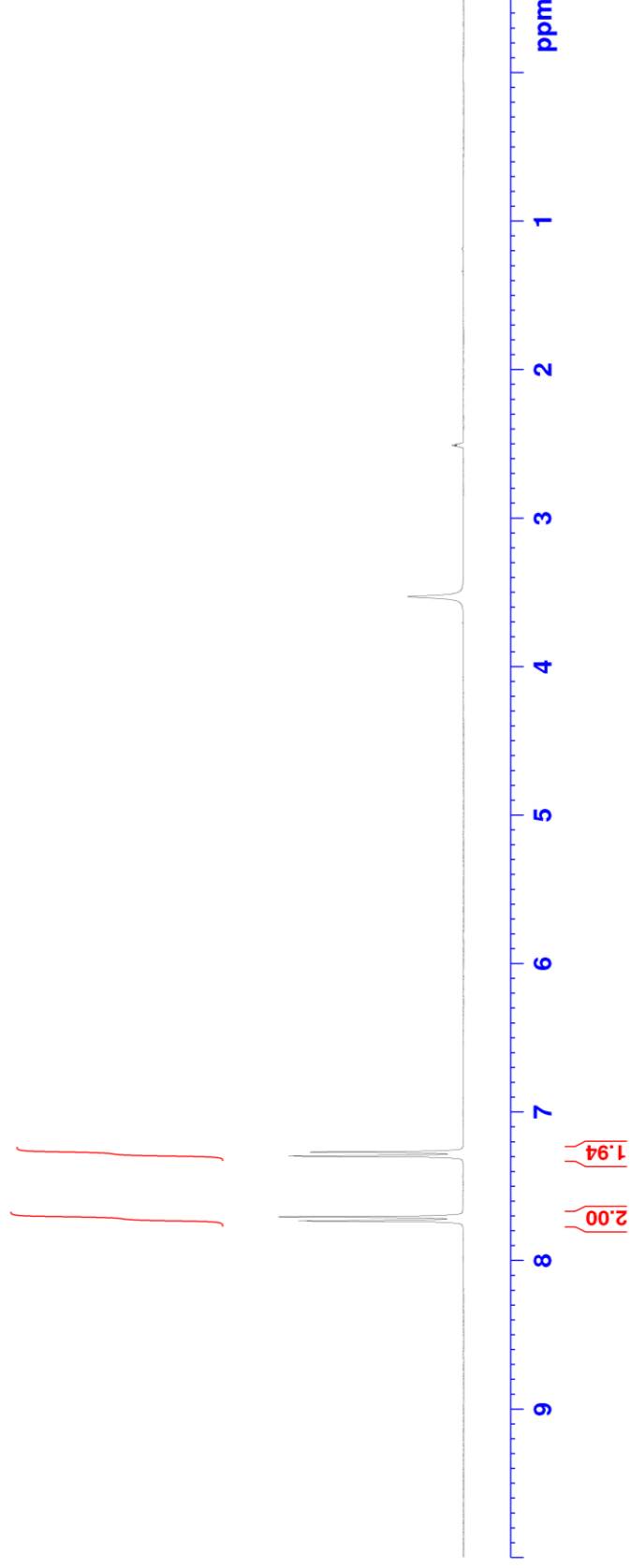
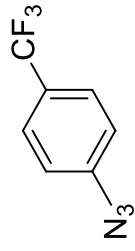
^{19}F NMR of compound **11x** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



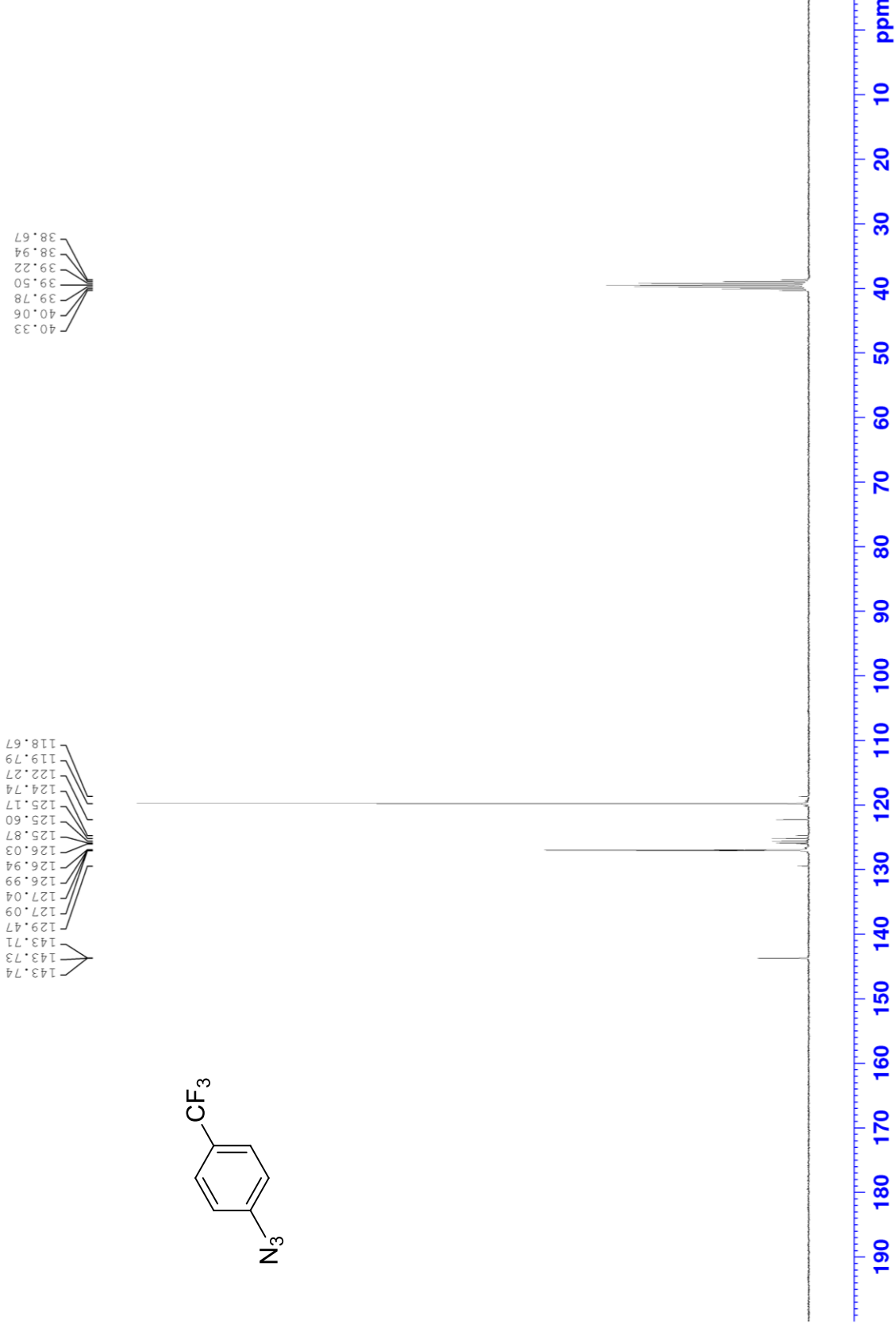
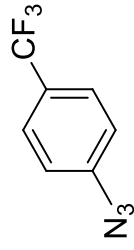
^1H NMR of compound **11y** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

7.733
7.705
7.297
7.269

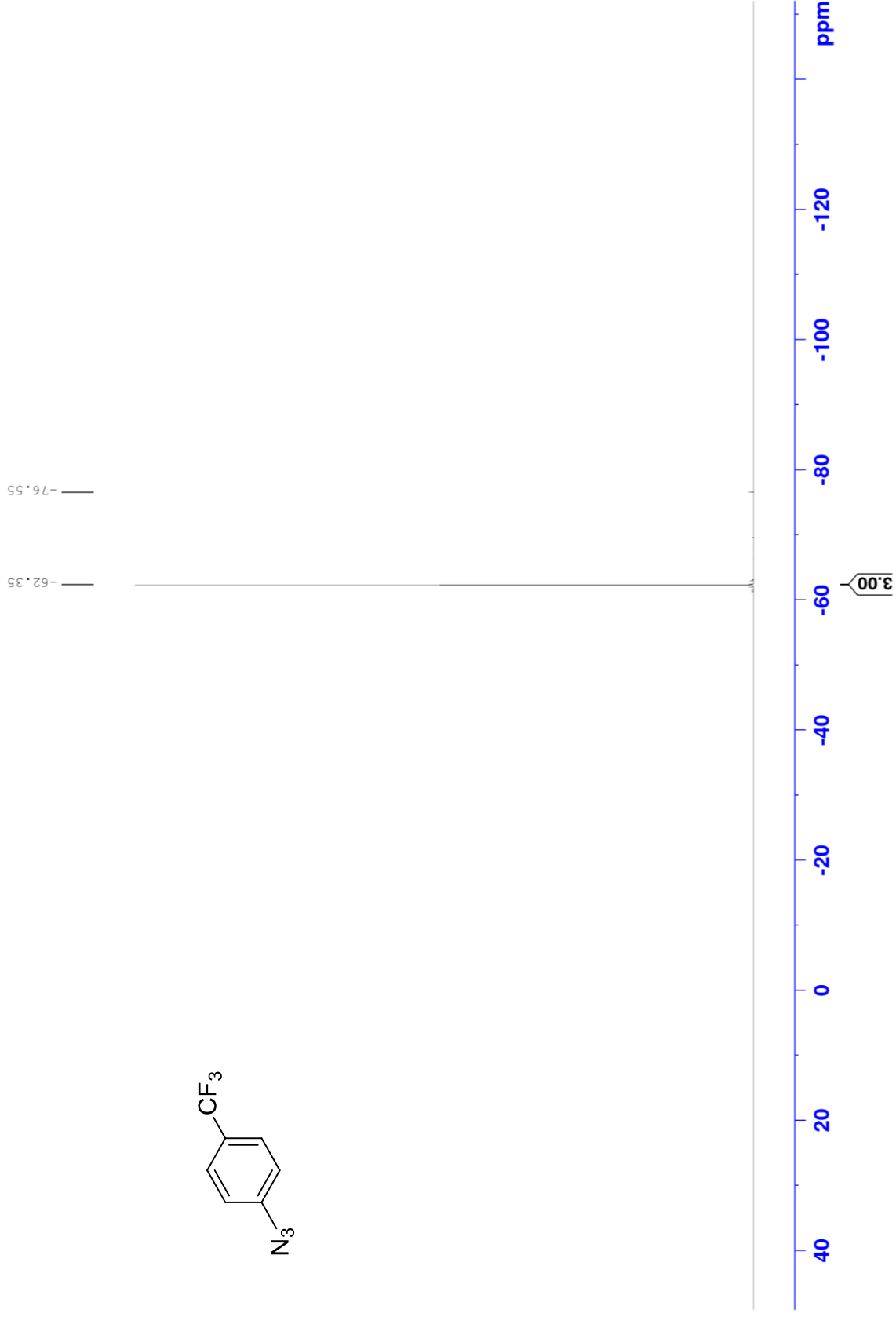
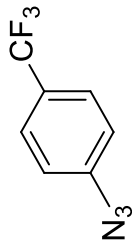
3.529
2.520
2.514
2.508
2.502
2.497



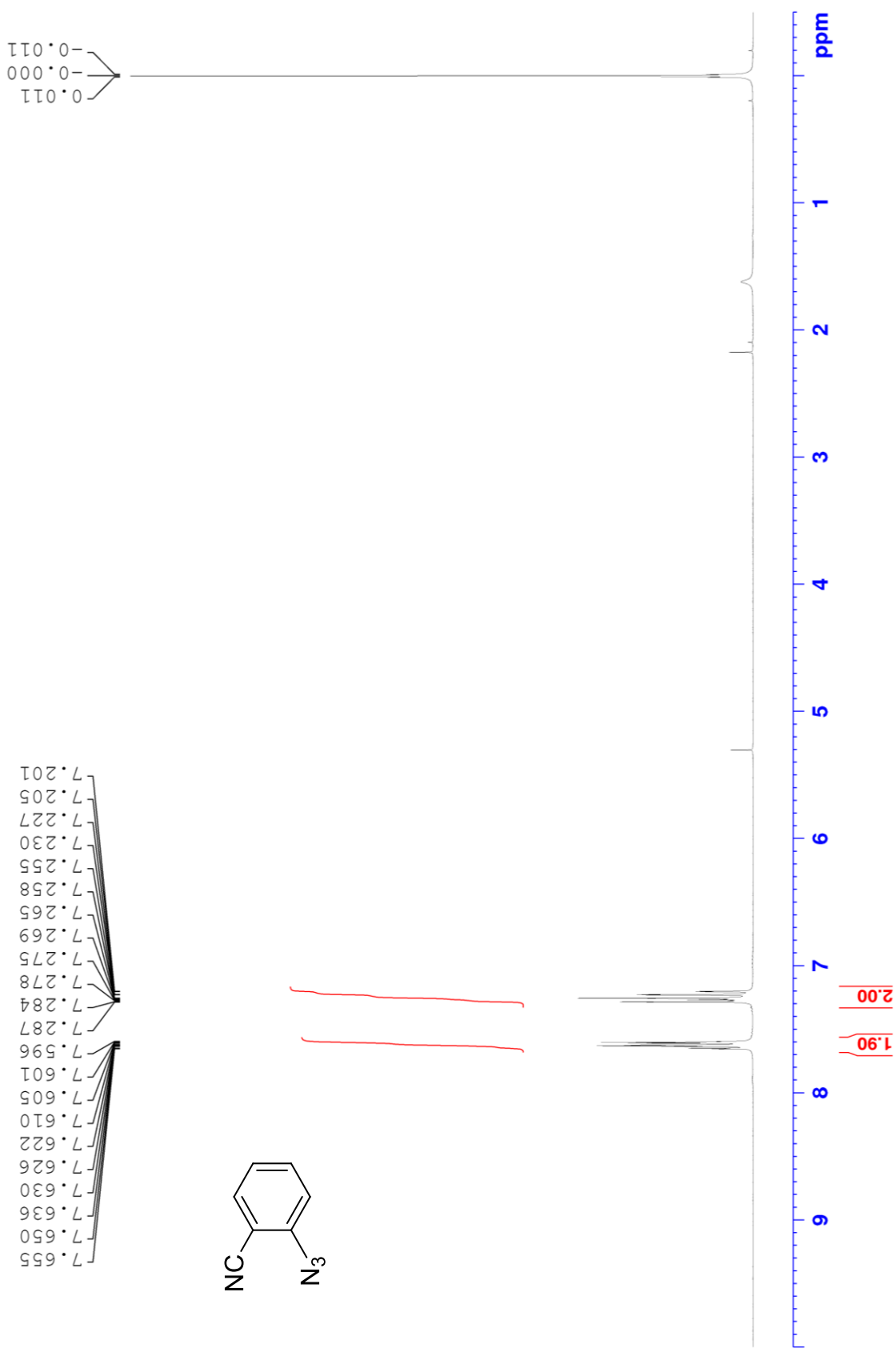
^{13}C NMR of compound **11y** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



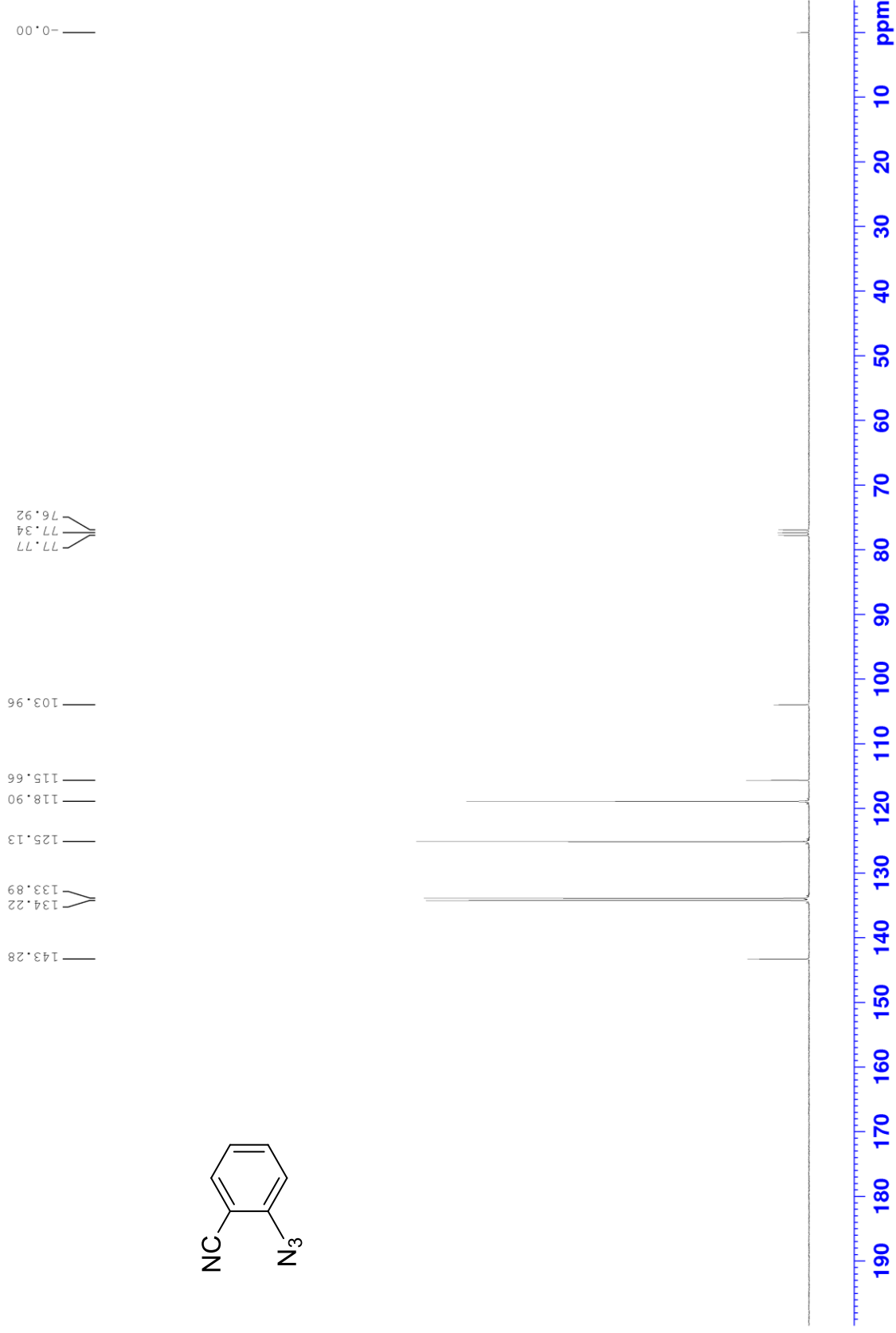
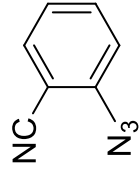
^{19}F NMR of compound **11y** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



^1H NMR of compound **11z** (300 MHz, CDCl_3)



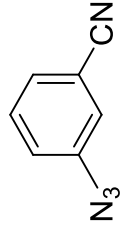
^{13}C NMR of compound **11z** (75 MHz, CDCl_3)



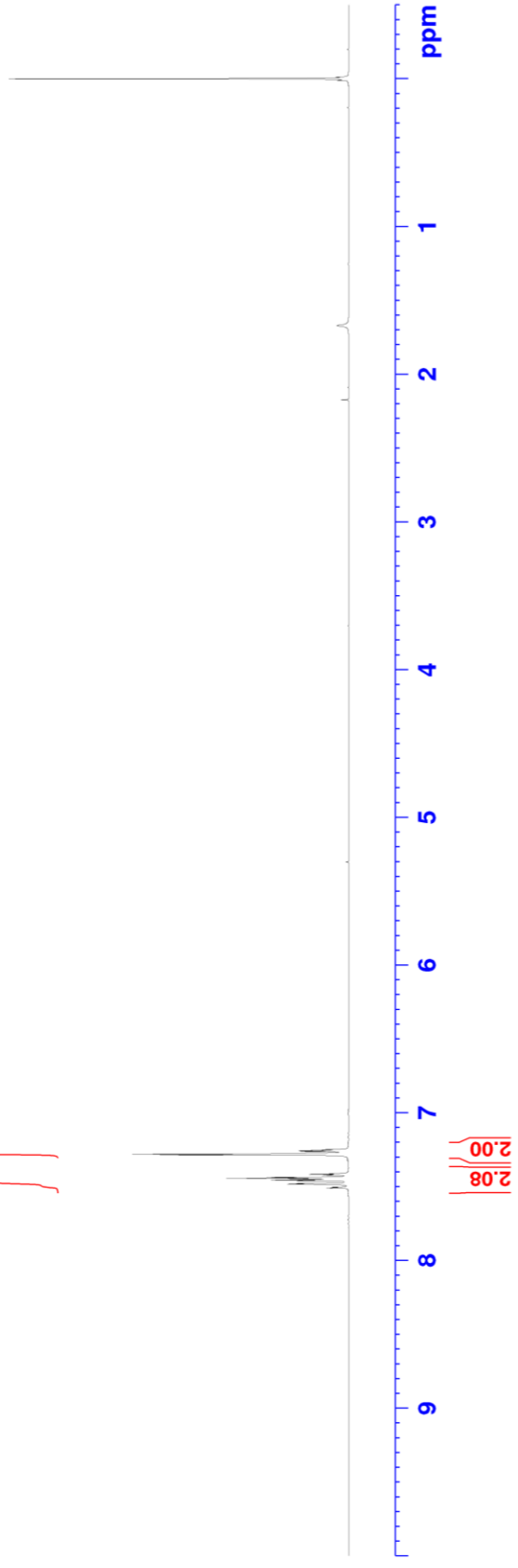
^1H NMR of compound **11a'** (300 MHz, CDCl_3)

0.011
-0.000
-0.011

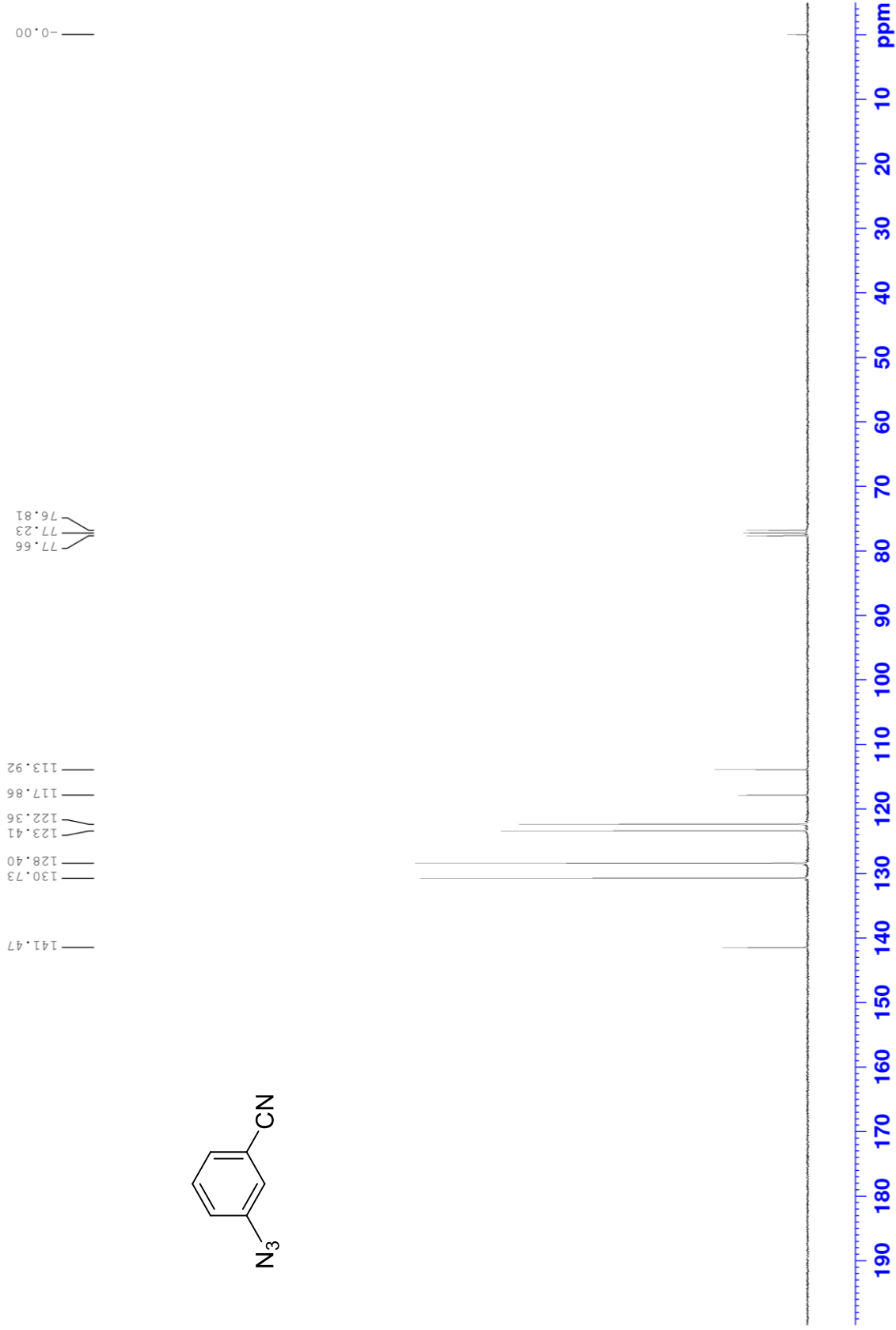
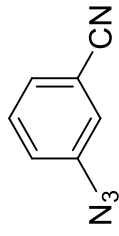
7.509
7.505
7.486
7.484
7.479
7.469
7.461
7.456
7.448
7.443
7.438
7.422
7.417
7.413
7.286
7.281
7.277
7.263
7.258
7.255
7.250



Integration values: 2.08 and 2.00



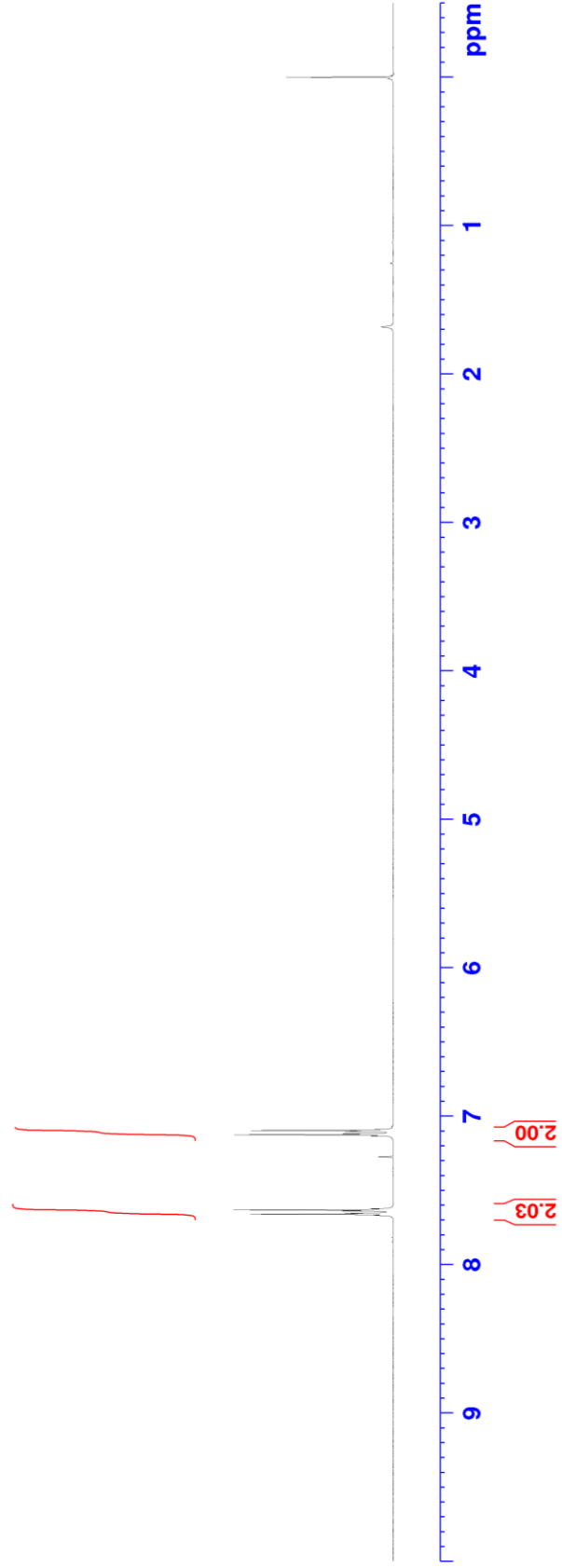
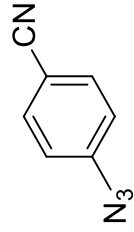
^{13}C NMR of compound **11a'** (75 MHz, CDCl_3)



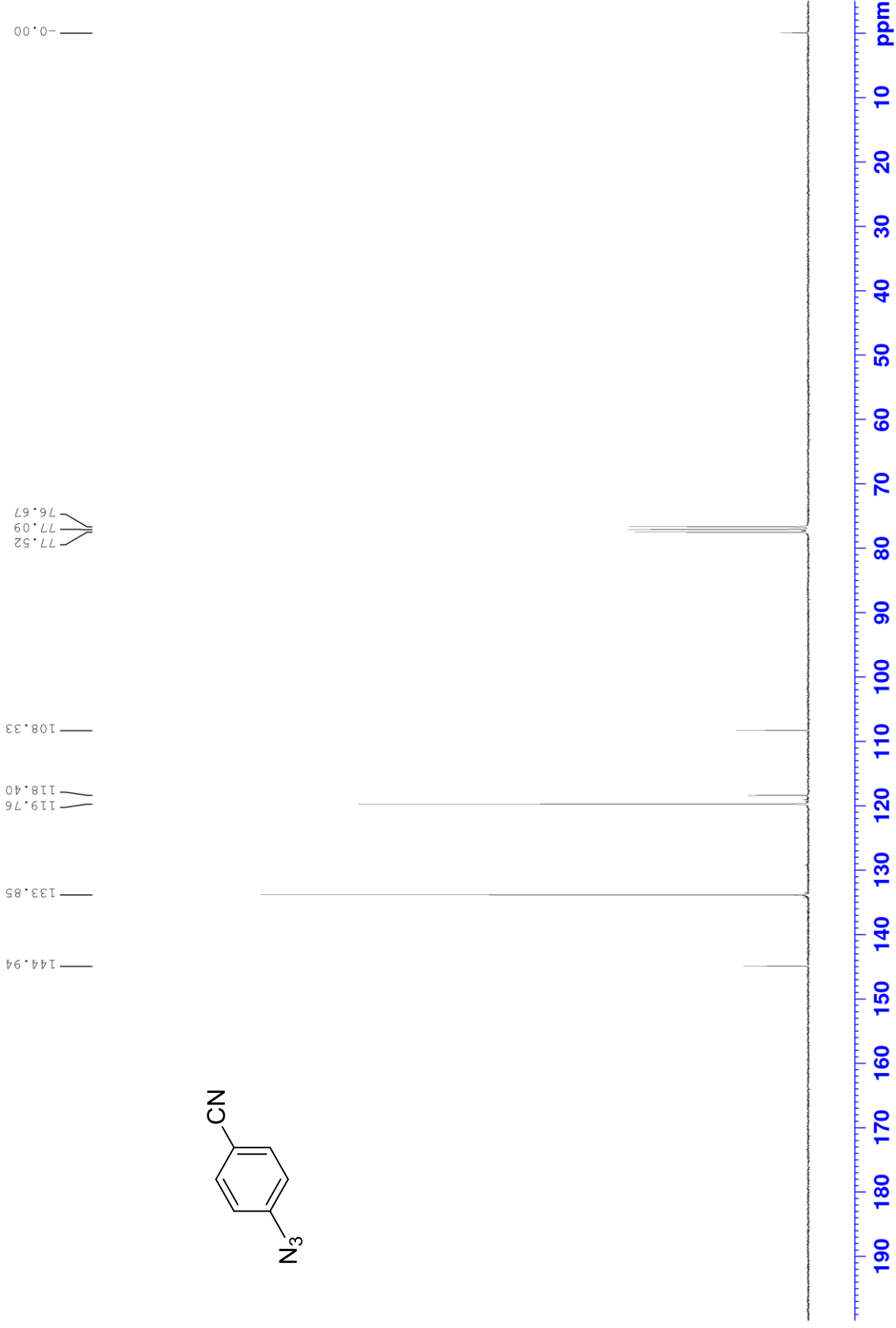
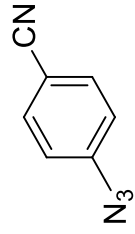
^1H NMR of compound **11b'** (300 MHz, CDCl_3)

0.111
-0.000
-0.111

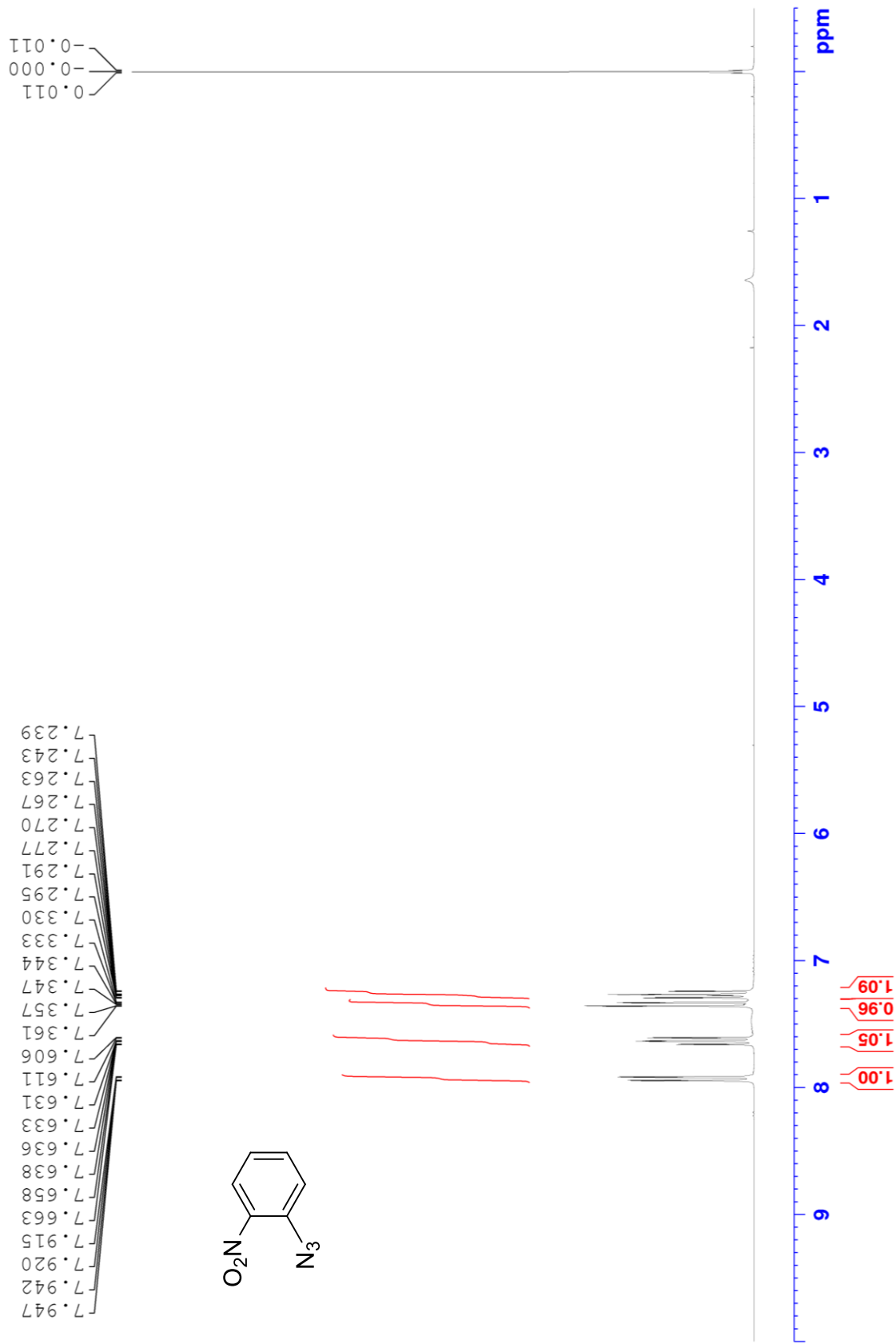
7.677
7.670
7.662
7.655
7.647
7.639
7.633
7.625
7.275
7.134
7.127
7.120
7.112
7.104
7.097
7.090



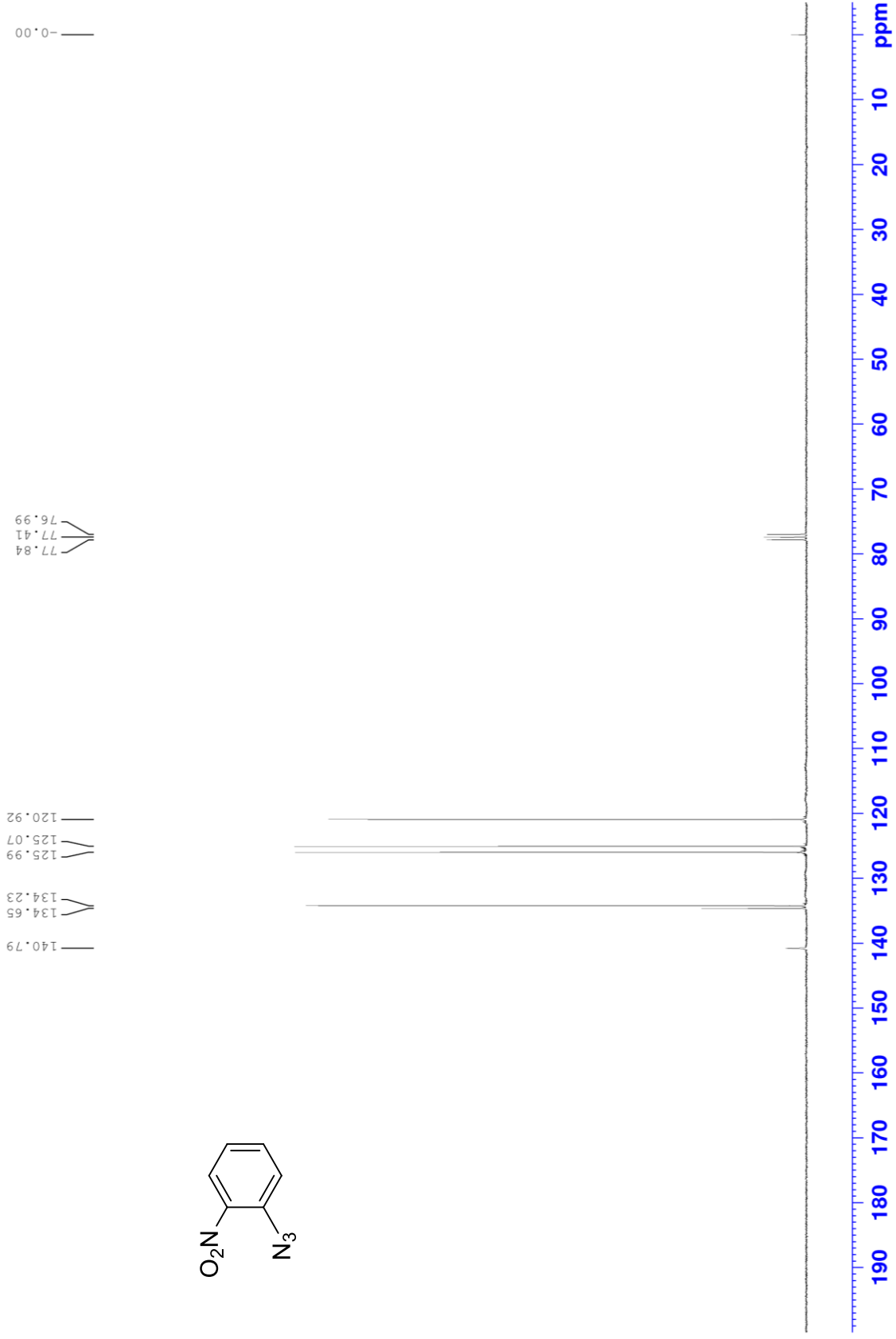
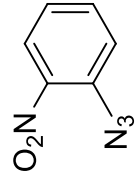
^{13}C NMR of compound **11b'** (75 MHz, CDCl_3)



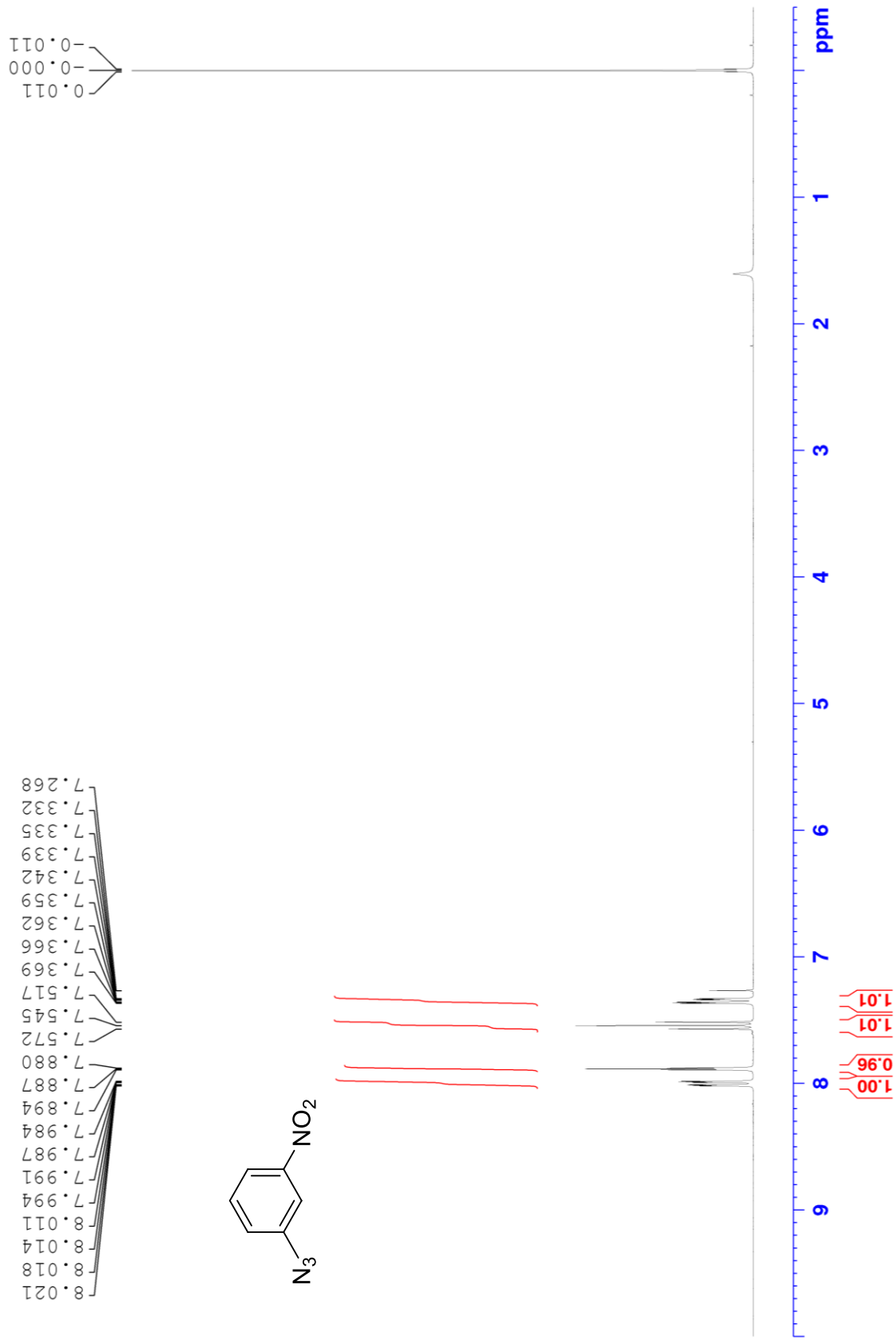
^1H NMR of compound **11c'** (300 MHz, CDCl_3)



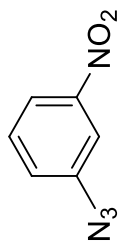
^{13}C NMR of compound **11c'** (75 MHz, CDCl_3)



^1H NMR of compound **11d'** (300 MHz, CDCl_3)



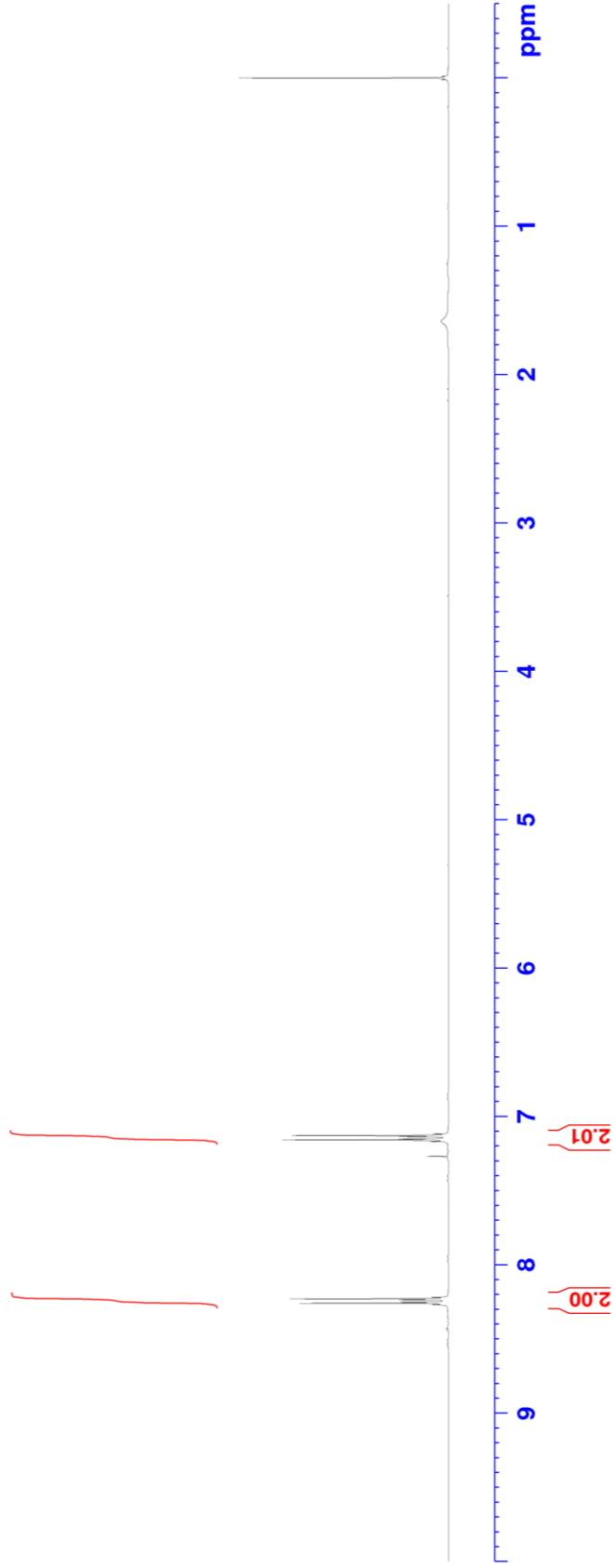
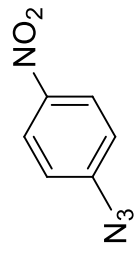
^{13}C NMR of compound **11d'** (75 MHz, CDCl_3)



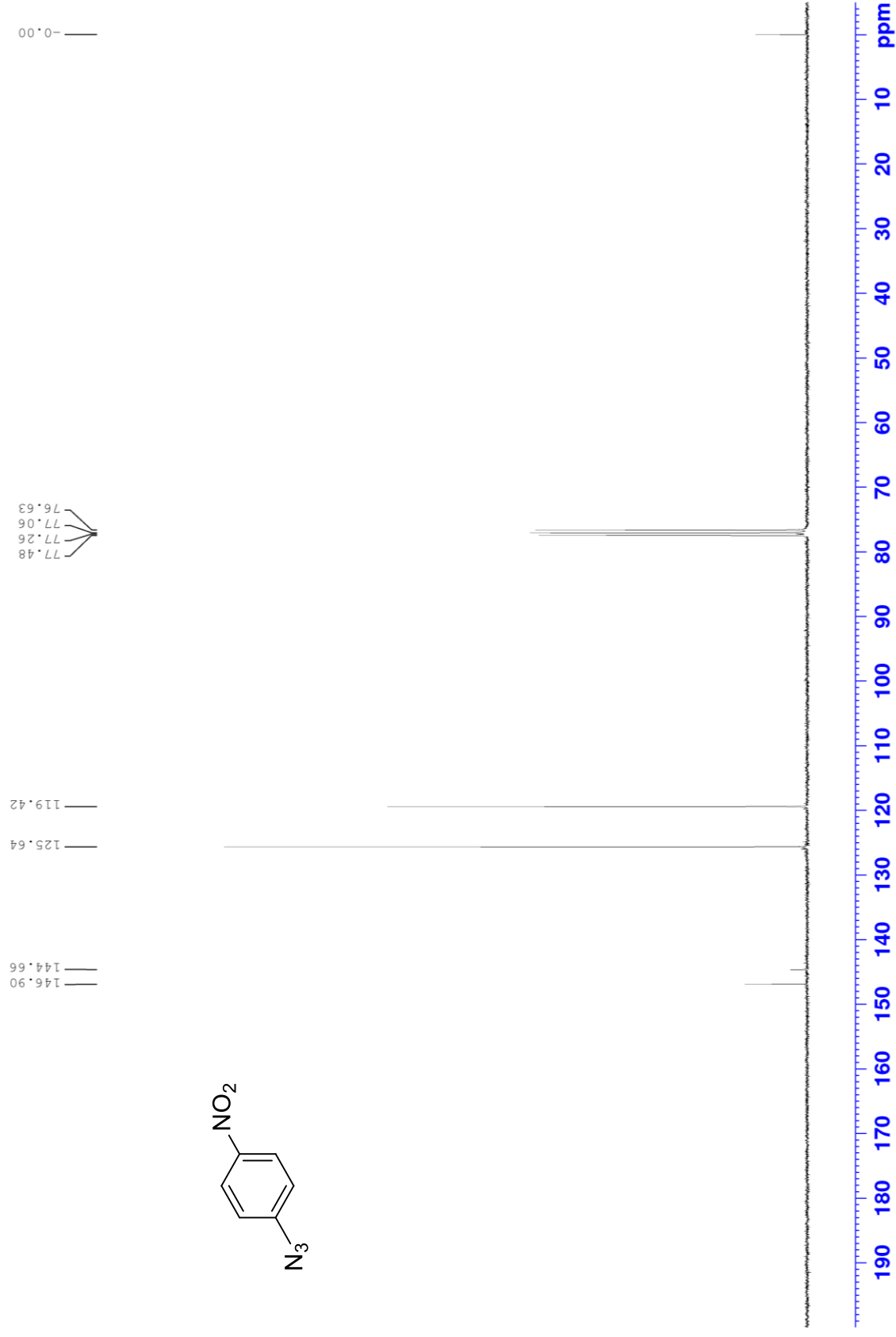
^1H NMR of compound **11e'** (300 MHz, CDCl_3)

8.276
8.271
8.261
8.253
8.247
8.237
8.230
8.220
7.270
7.170
7.160
7.153
7.145
7.137
7.129
7.119

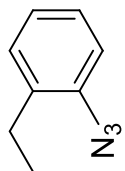
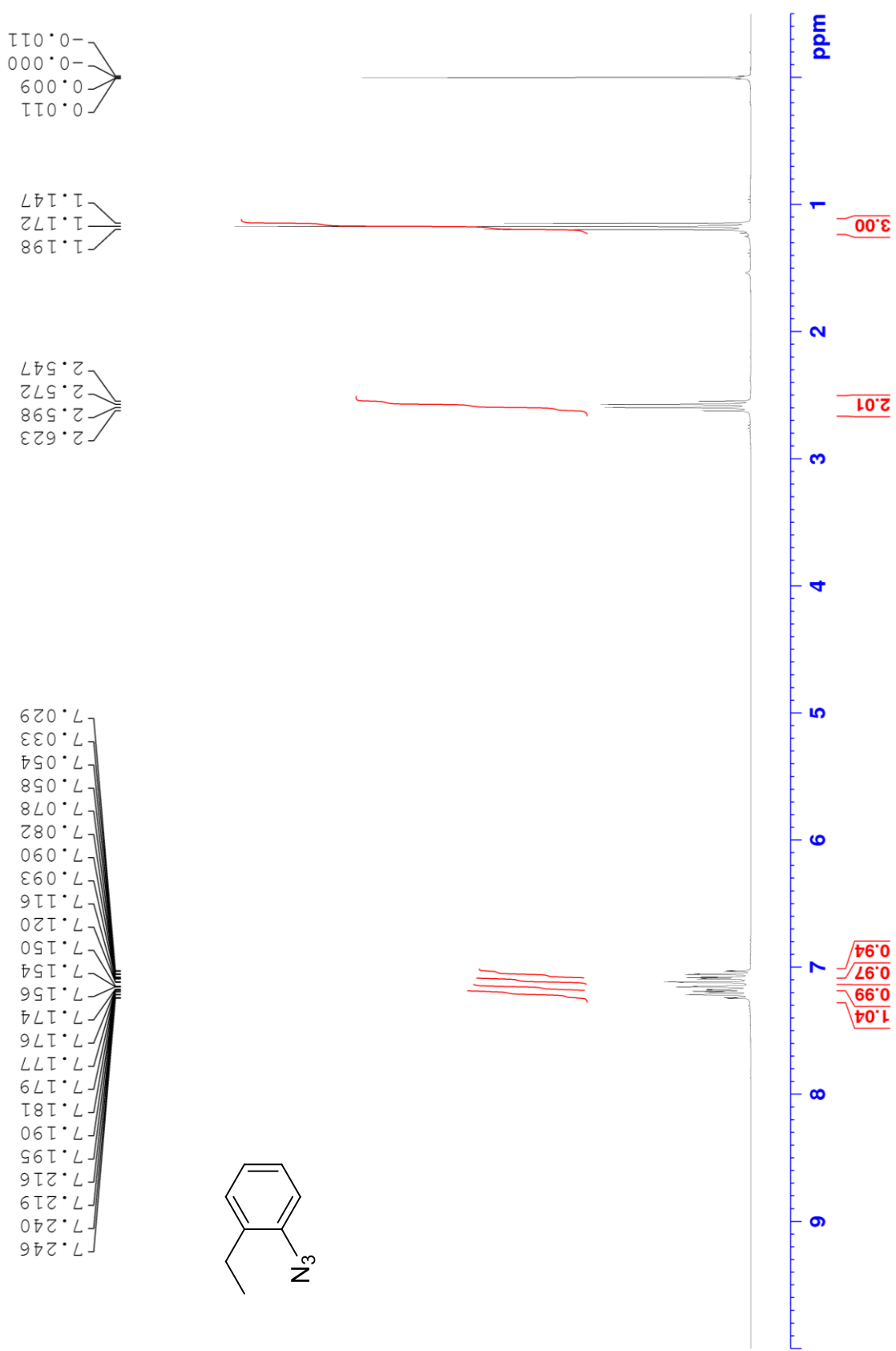
0.011
-0.000
-0.011



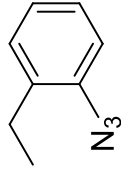
^{13}C NMR of compound **11e'** (75 MHz, CDCl_3)



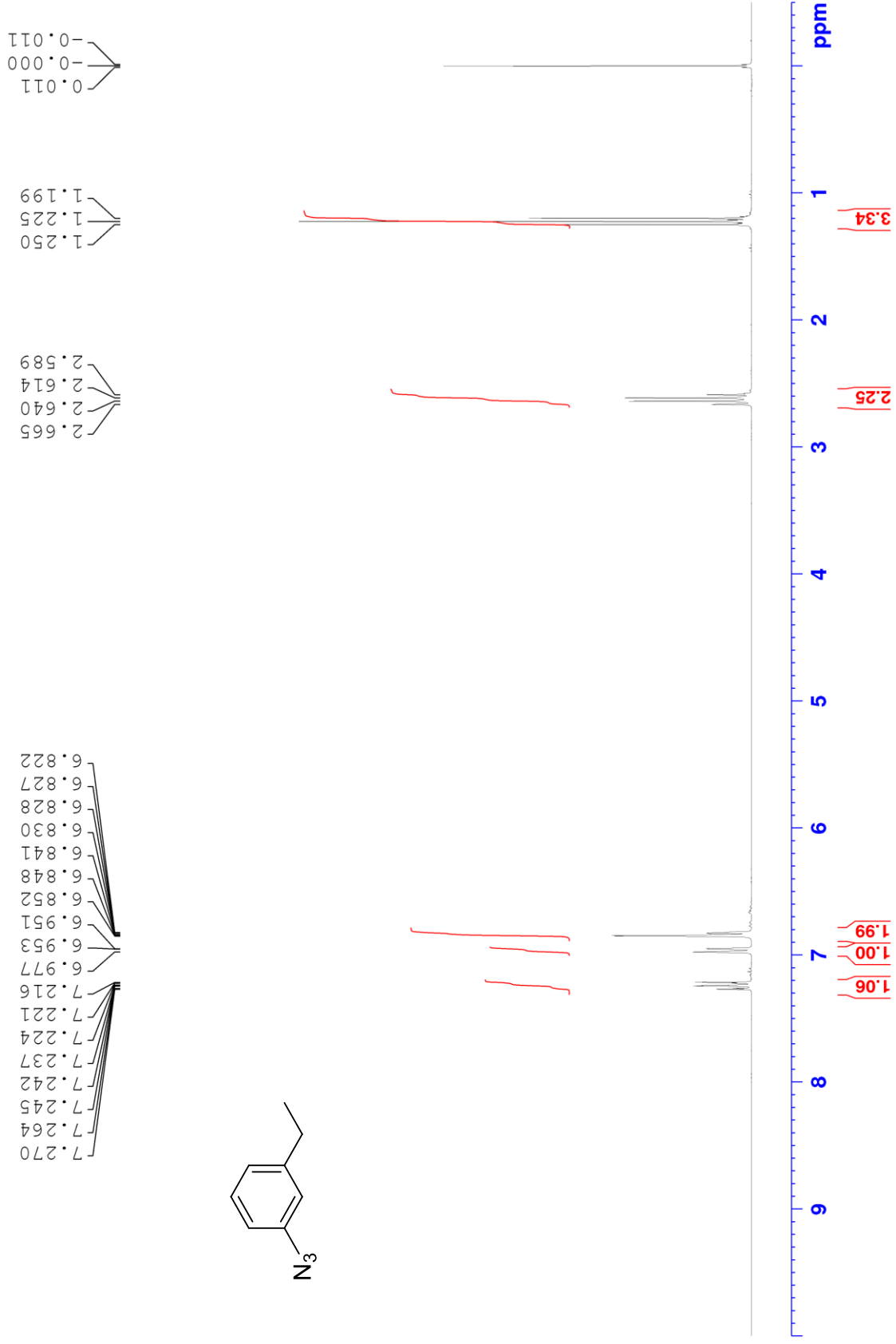
^1H NMR of compound **11f'** (300 MHz, CDCl_3)



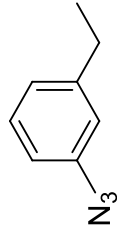
^{13}C NMR of compound **11f'** (75 MHz, CDCl_3)



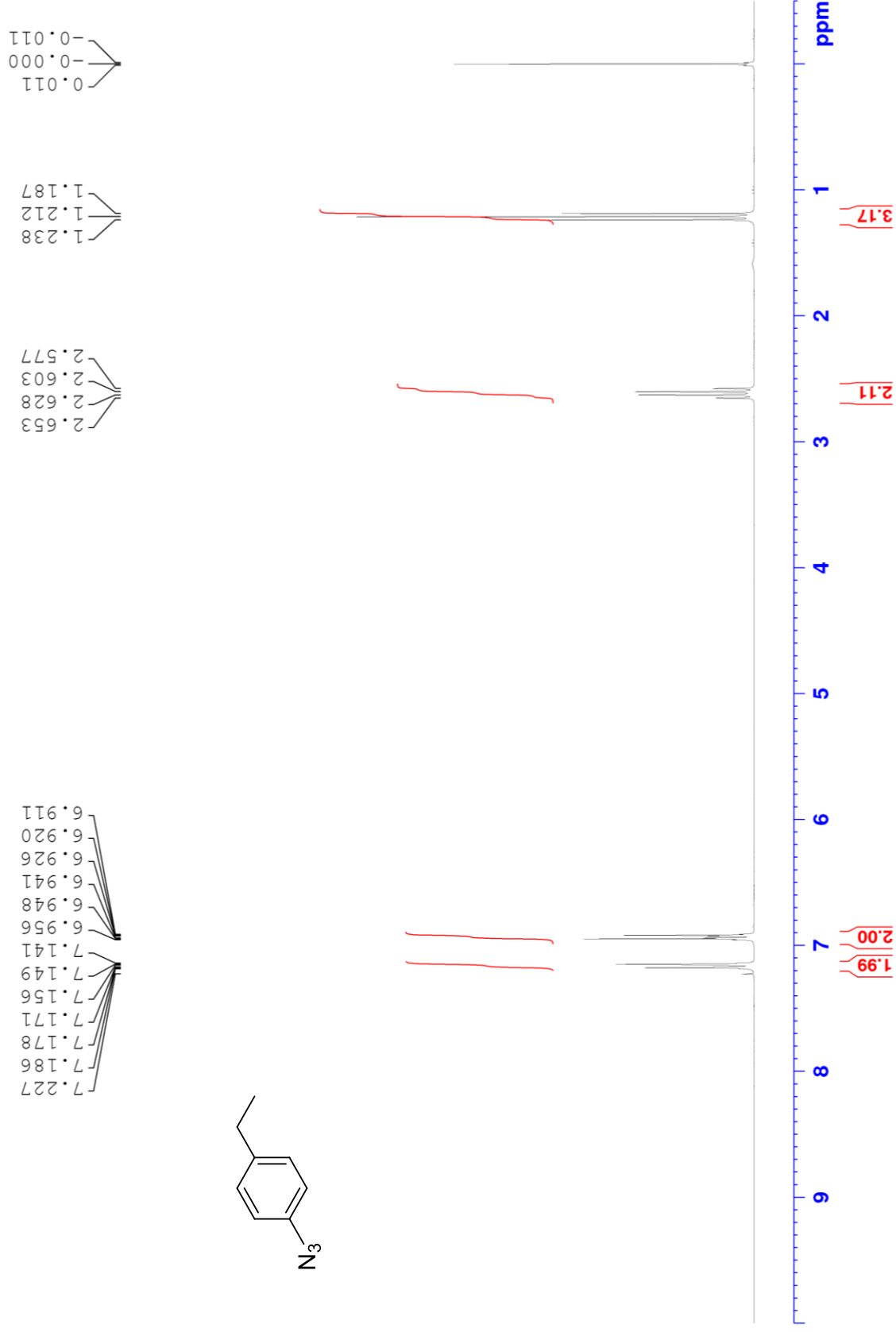
^1H NMR of compound **11g'** (300 MHz, CDCl_3)



^{13}C NMR of compound **11g** (75 MHz, CDCl_3)



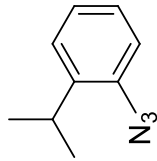
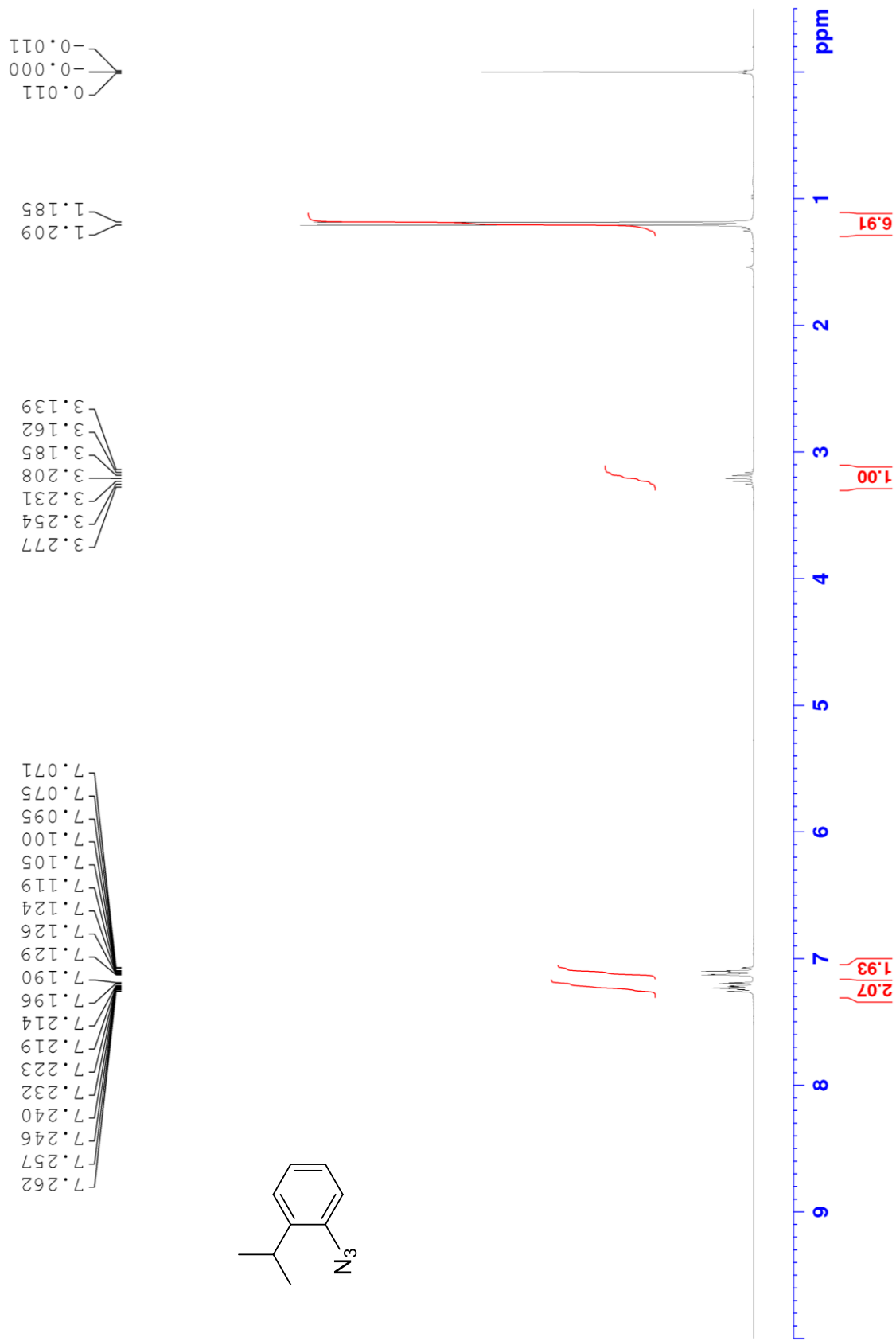
^1H NMR of compound **11h'** (300 MHz, CDCl_3)



^{13}C NMR of compound **11h'** (75 MHz, CDCl_3)



^1H NMR of compound **11i'** (300 MHz, CDCl_3)

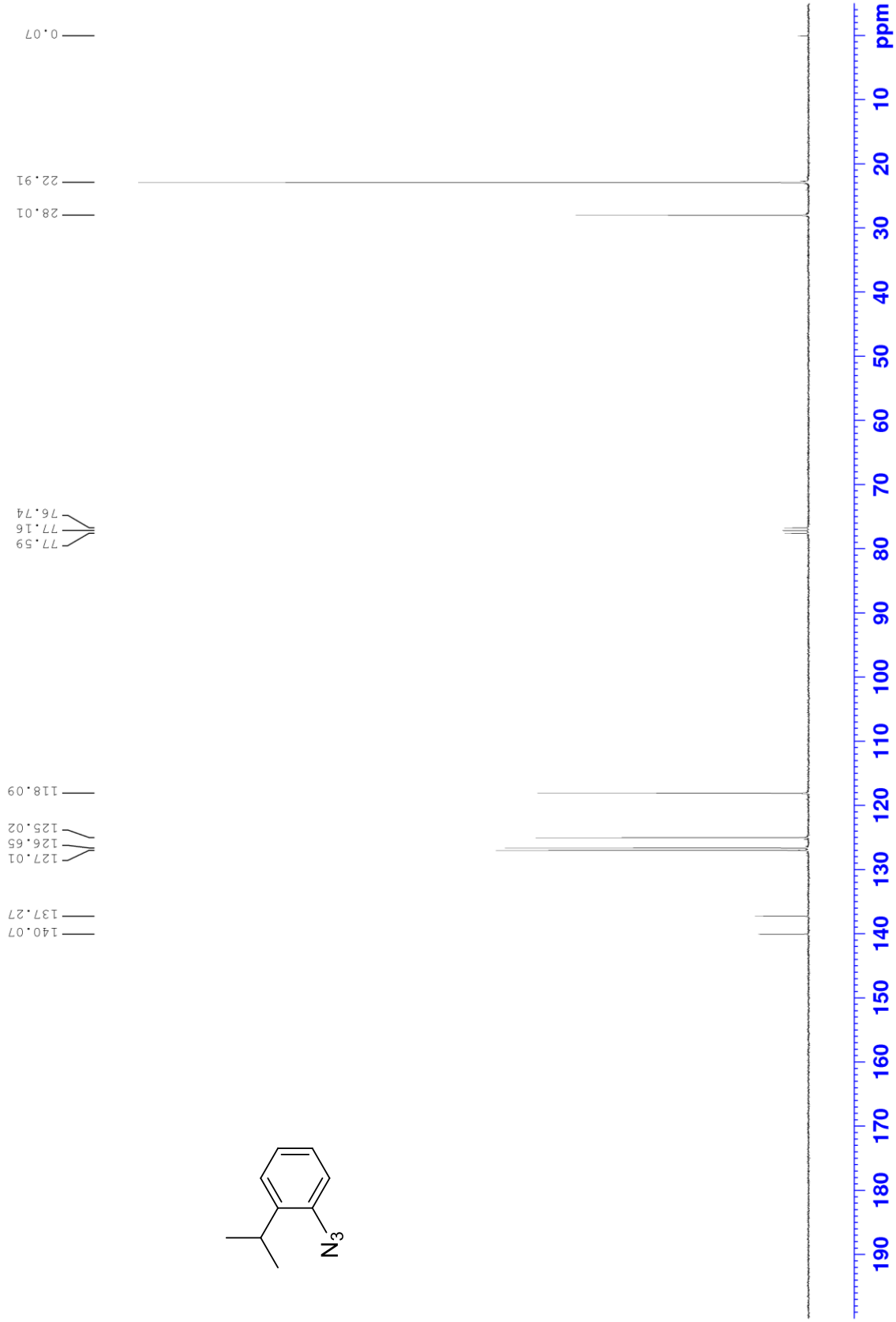


7.262
7.257
7.257
7.246
7.240
7.232
7.223
7.219
7.214
7.196
7.190
7.129
7.126
7.124
7.119
7.105
7.100
7.095
7.075
7.071

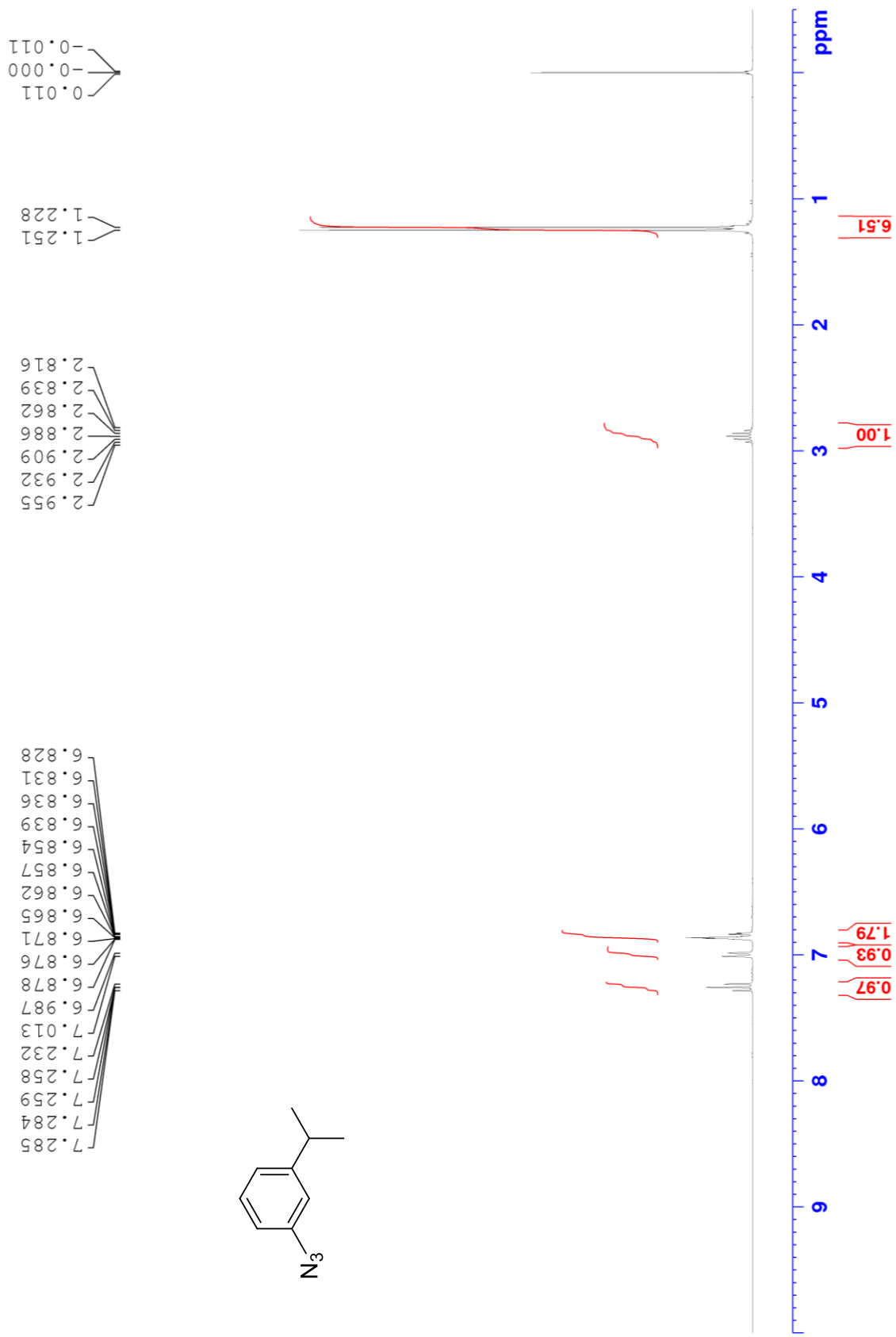
3.277
3.254
3.231
3.208
3.185
3.162
3.139

1.209
1.185
0.011
-0.000
-0.011

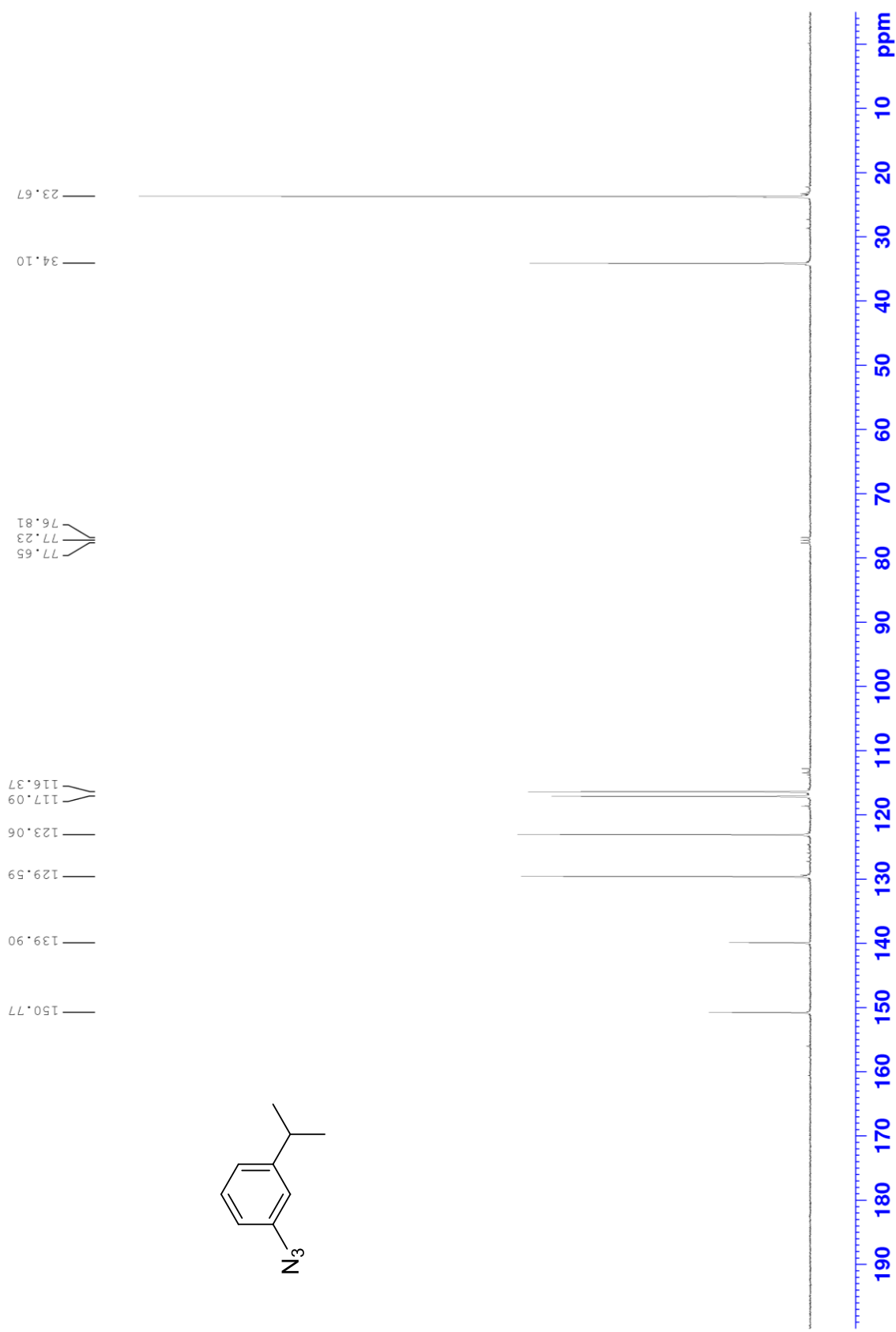
^{13}C NMR of compound **11i'** (75 MHz, CDCl_3)



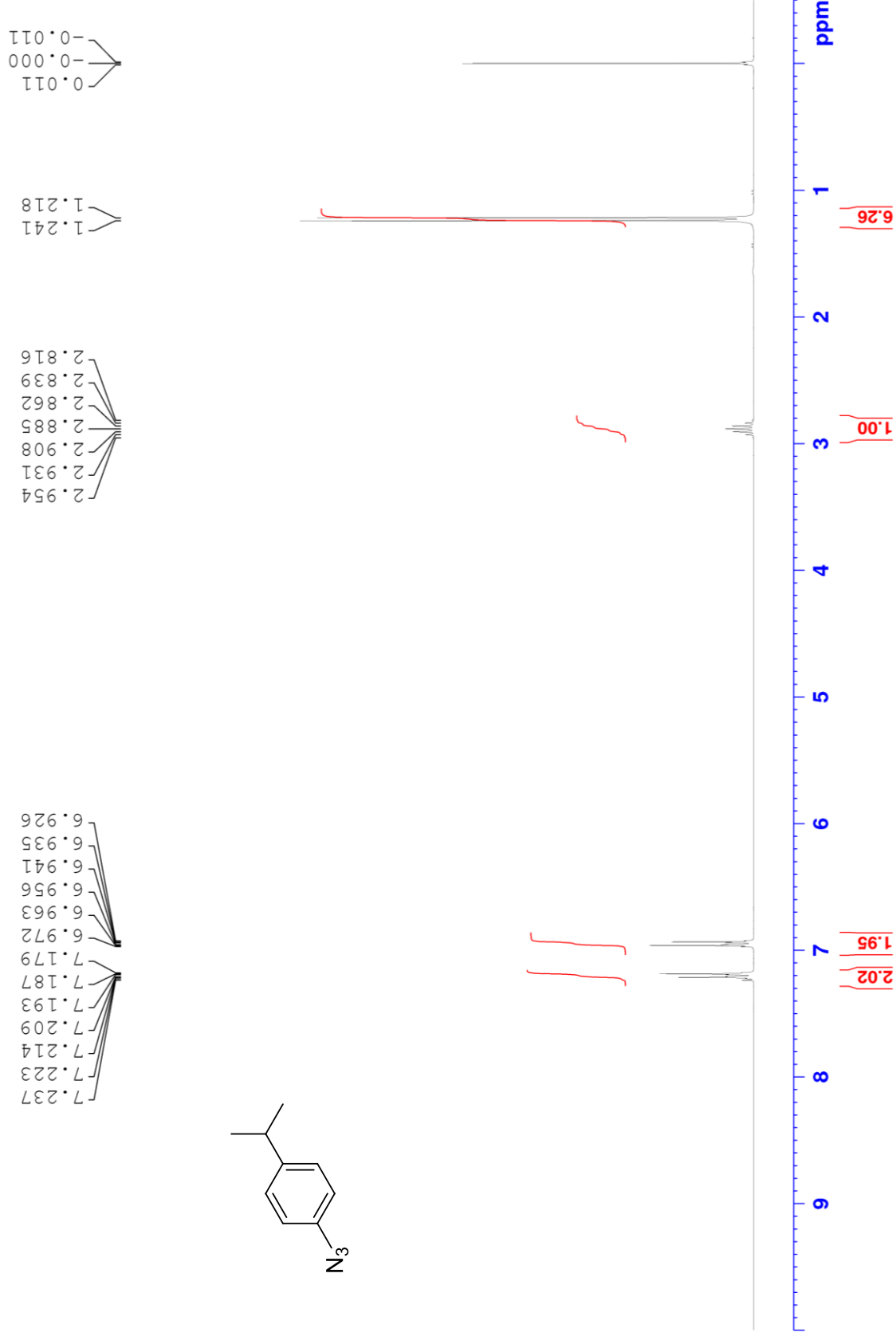
¹H NMR of compound **11j*** (300 MHz, CDCl₃)



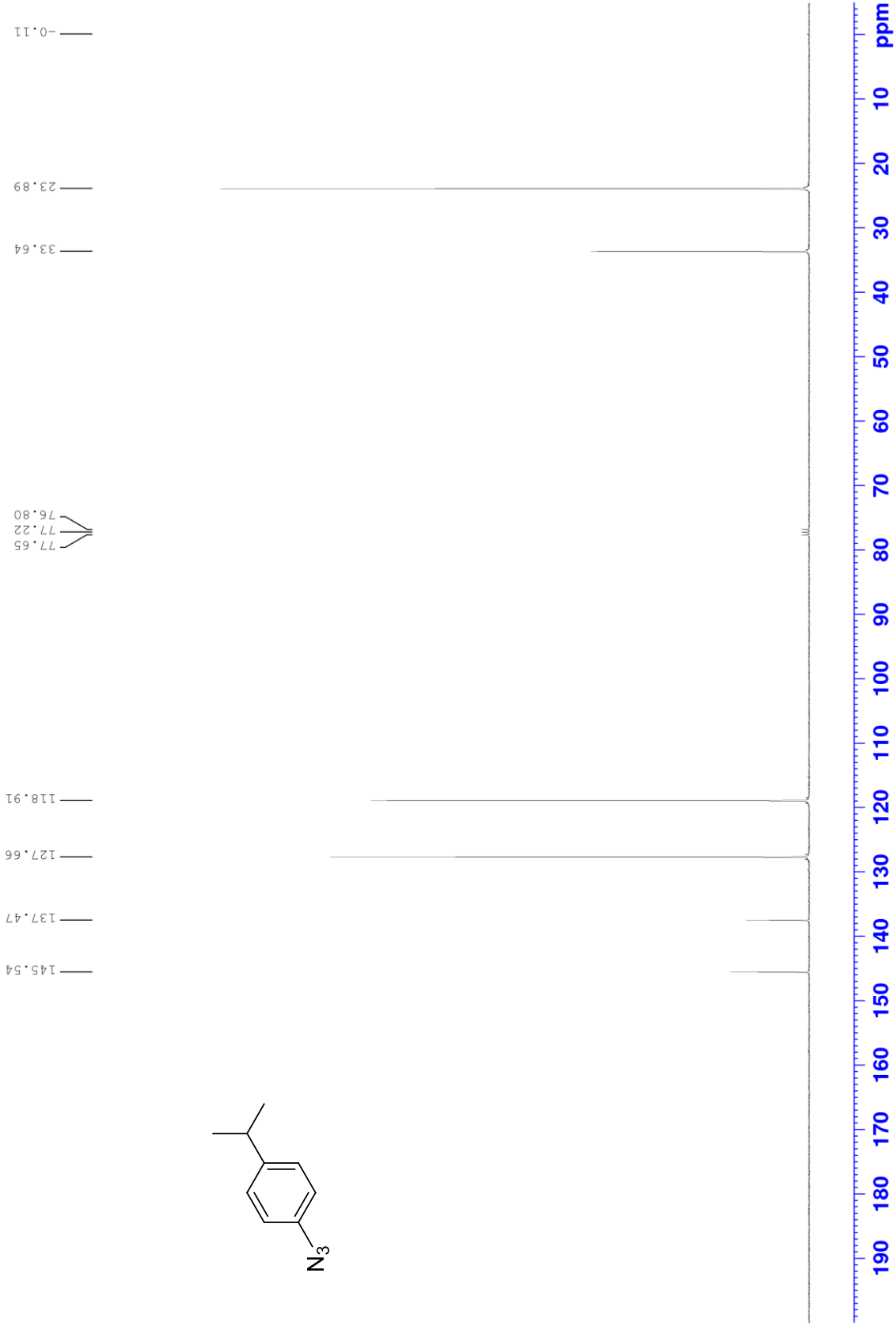
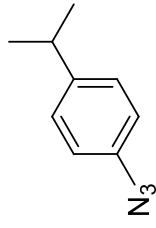
^{13}C NMR of compound **11j'** (75 MHz, CDCl_3)



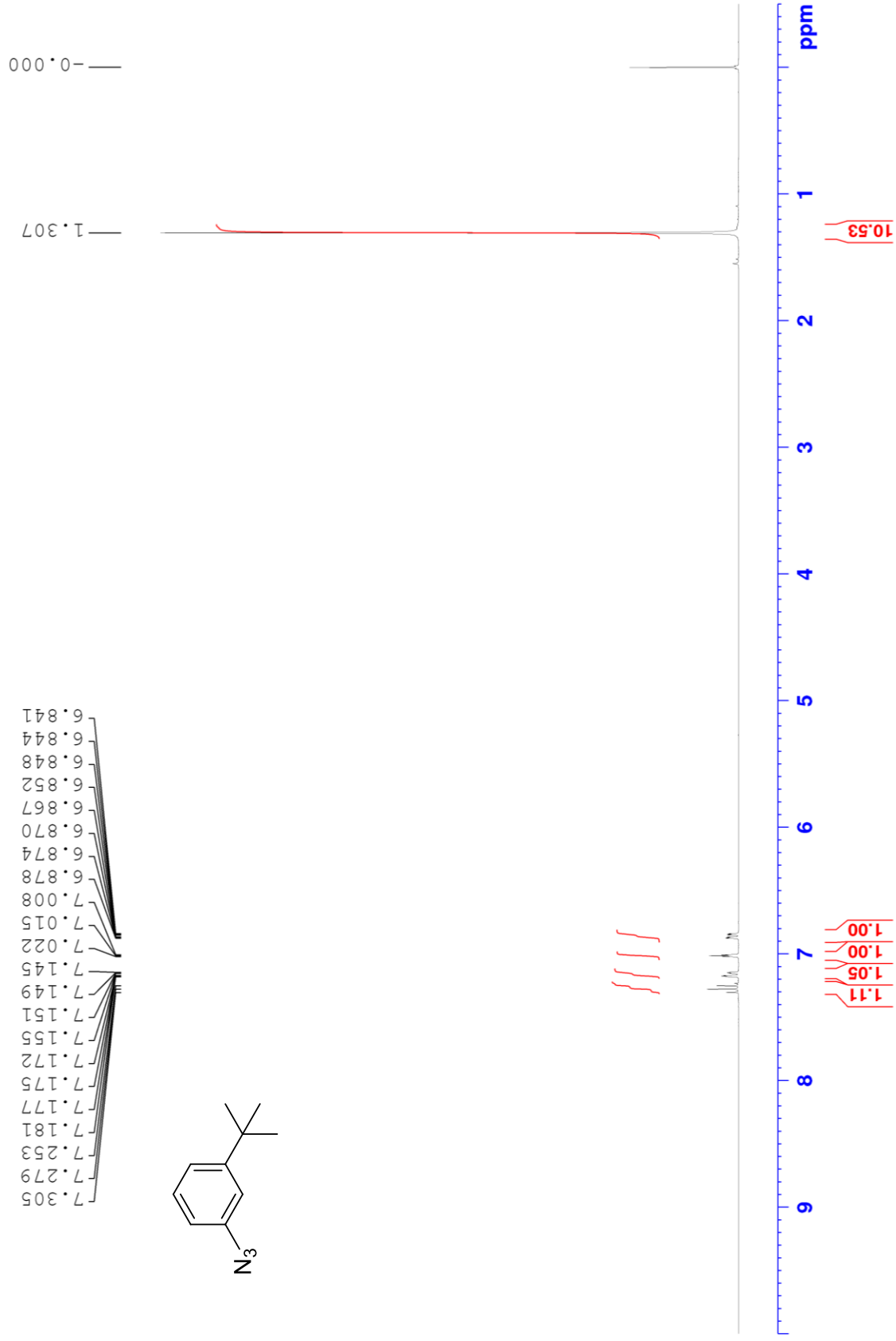
¹H NMR of compound **11k'** (300 MHz, CDCl₃)



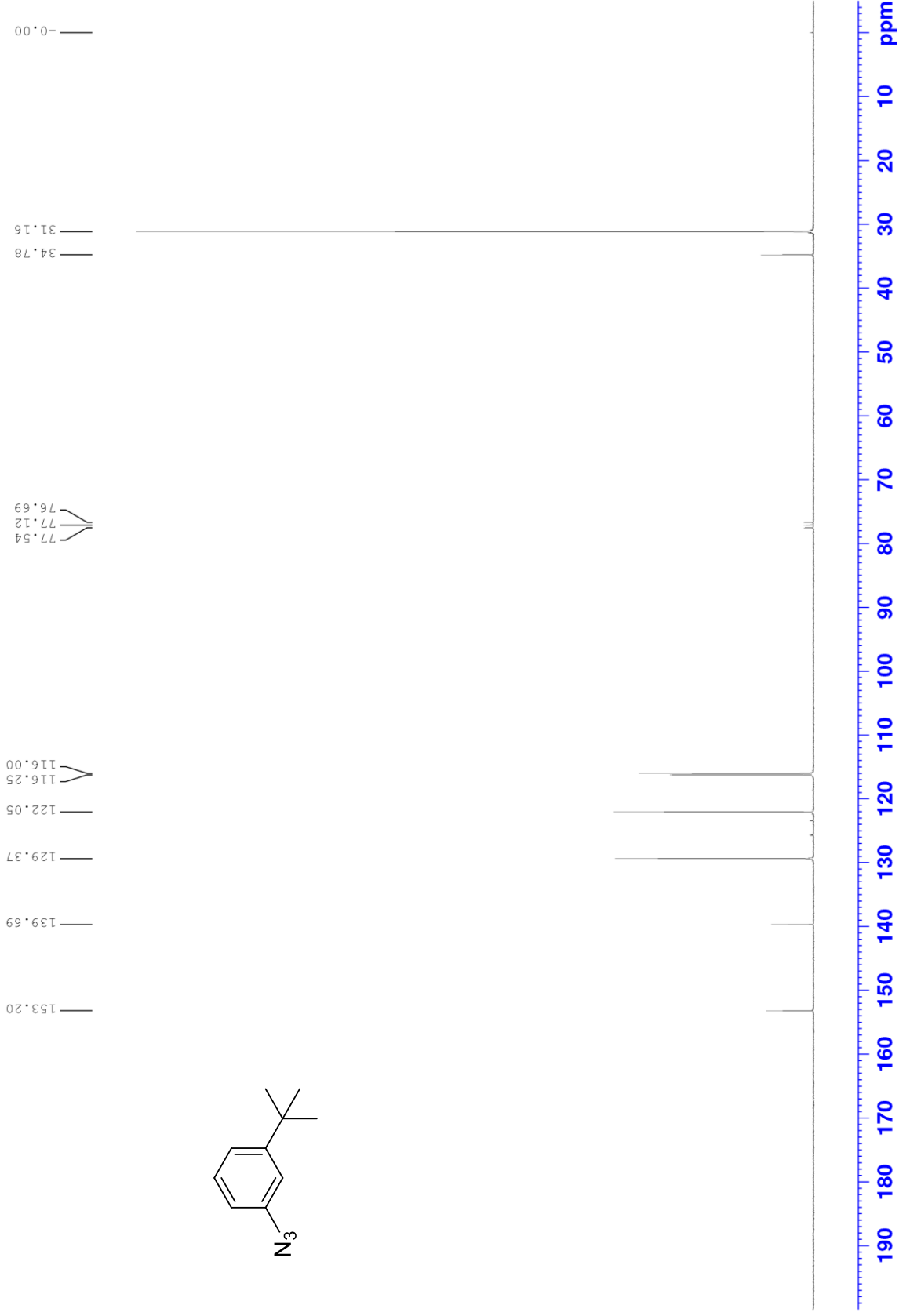
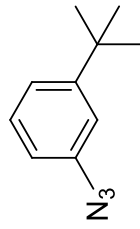
^{13}C NMR of compound **11k*** (75 MHz, CDCl_3)



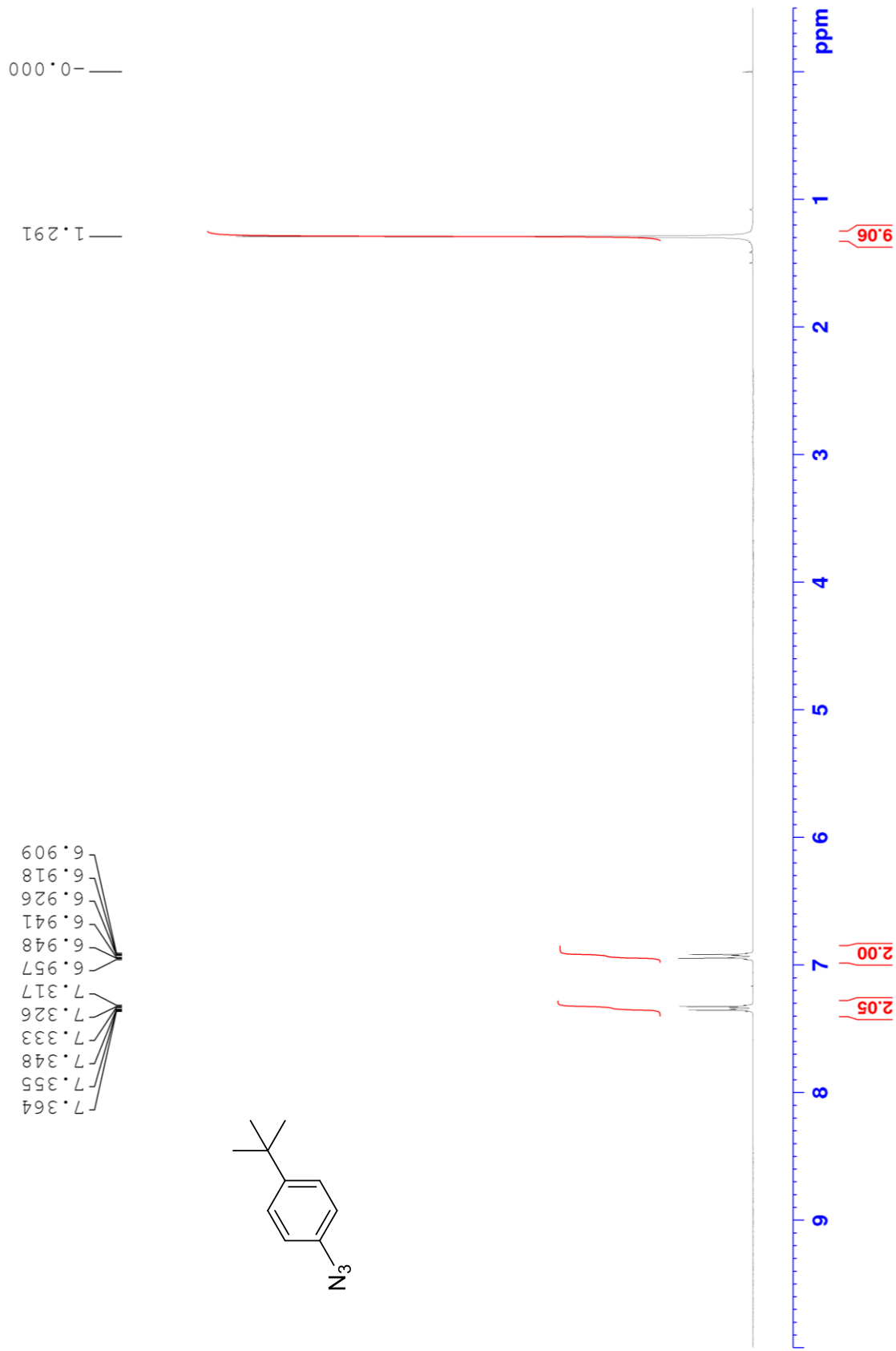
^1H NMR of compound **11l'** (300 MHz, CDCl_3)



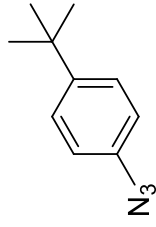
^{13}C NMR of compound **11l'** (75 MHz, CDCl_3)



^1H NMR of compound **11m'** (300 MHz, CDCl_3)



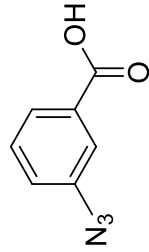
^{13}C NMR of compound **11m'** (75 MHz, CDCl_3)



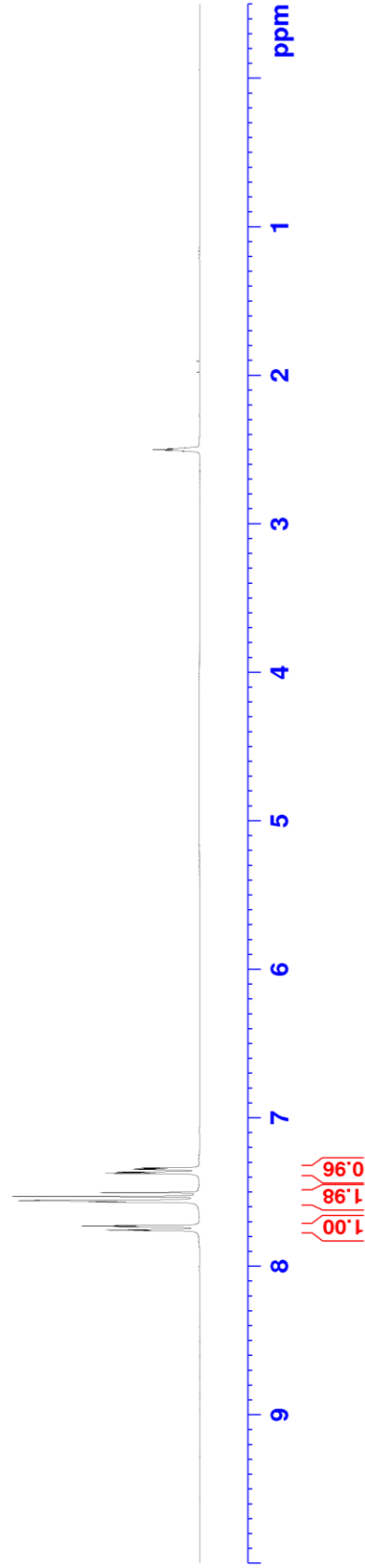
^1H NMR of compound **11n'** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

2.512
2.506
2.500
2.494
2.488

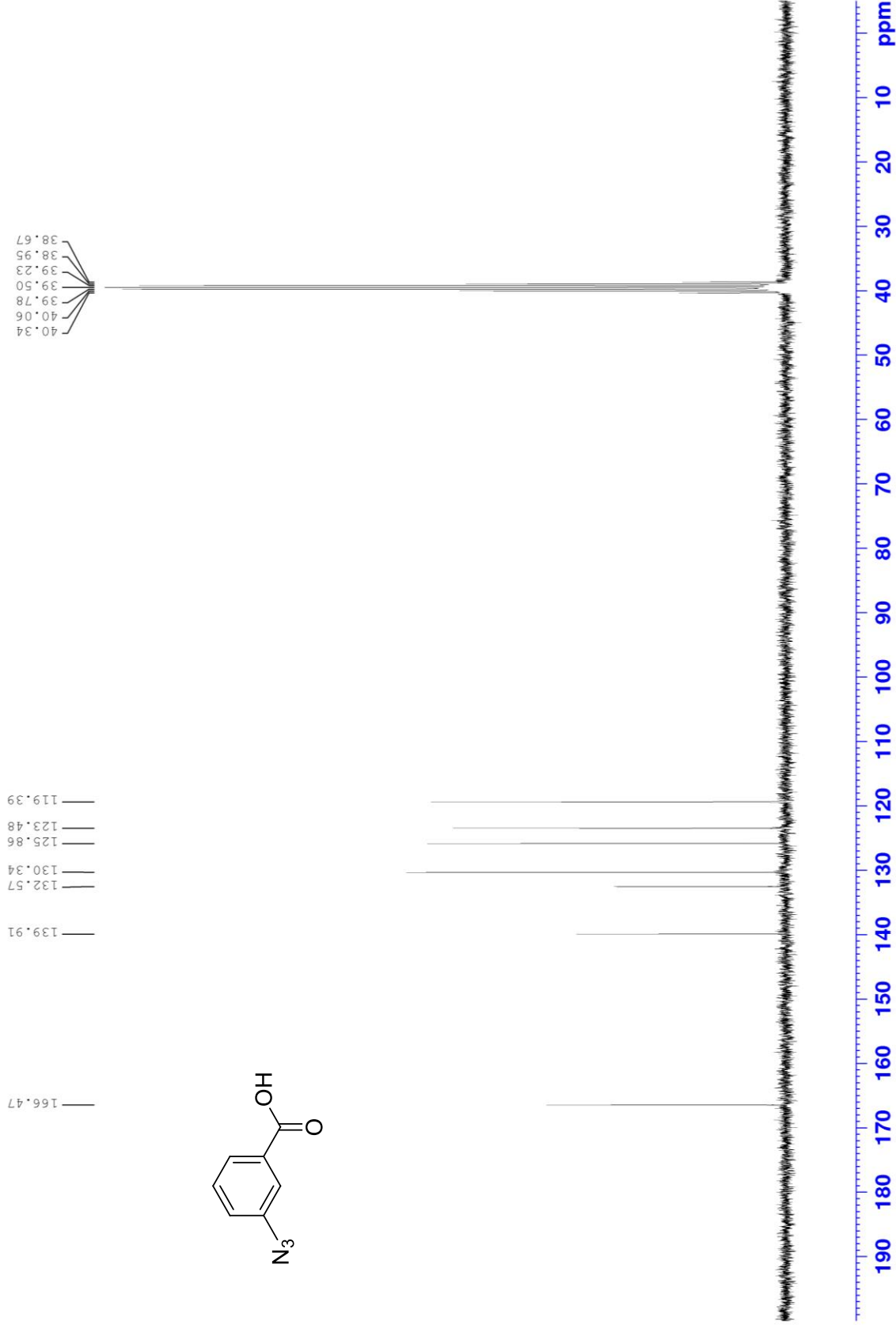
7.778
7.761
7.757
7.752
7.735
7.730
7.726
7.567
7.561
7.558
7.556
7.531
7.505
7.376
7.373
7.368
7.365
7.349
7.346
7.341
7.338



Integration values: 1.00, 1.98, 0.96



^{13}C NMR of compound **11n'** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

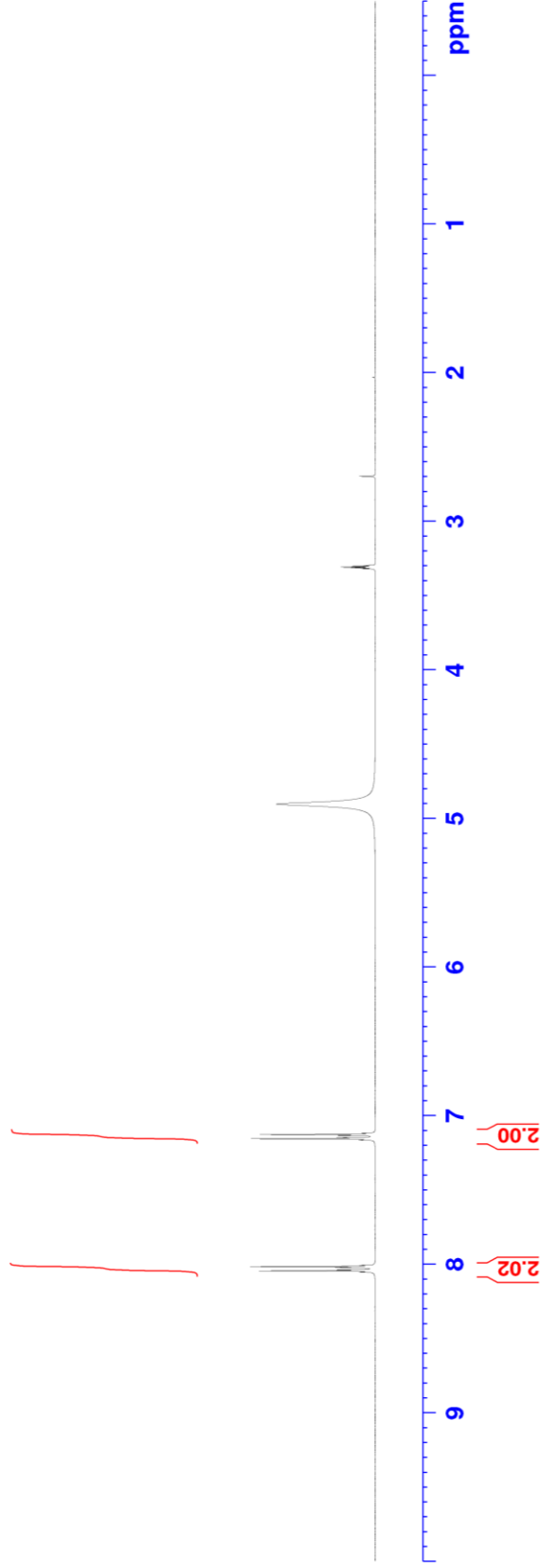
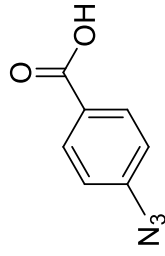


^1H NMR of compound **11o'** (300 MHz, MeOD- d_4)

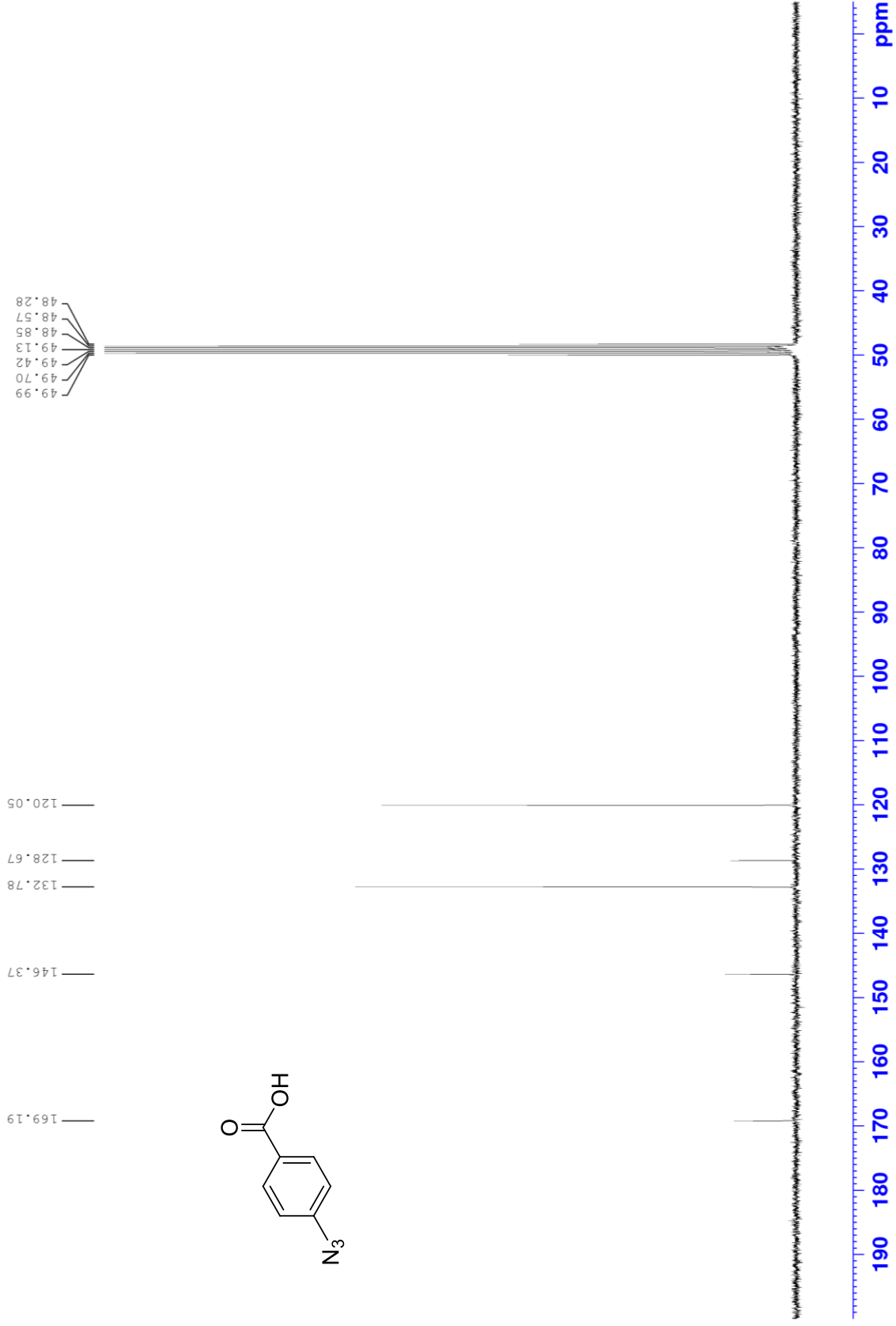
3.320
3.315
3.310
3.304
3.299

4.905

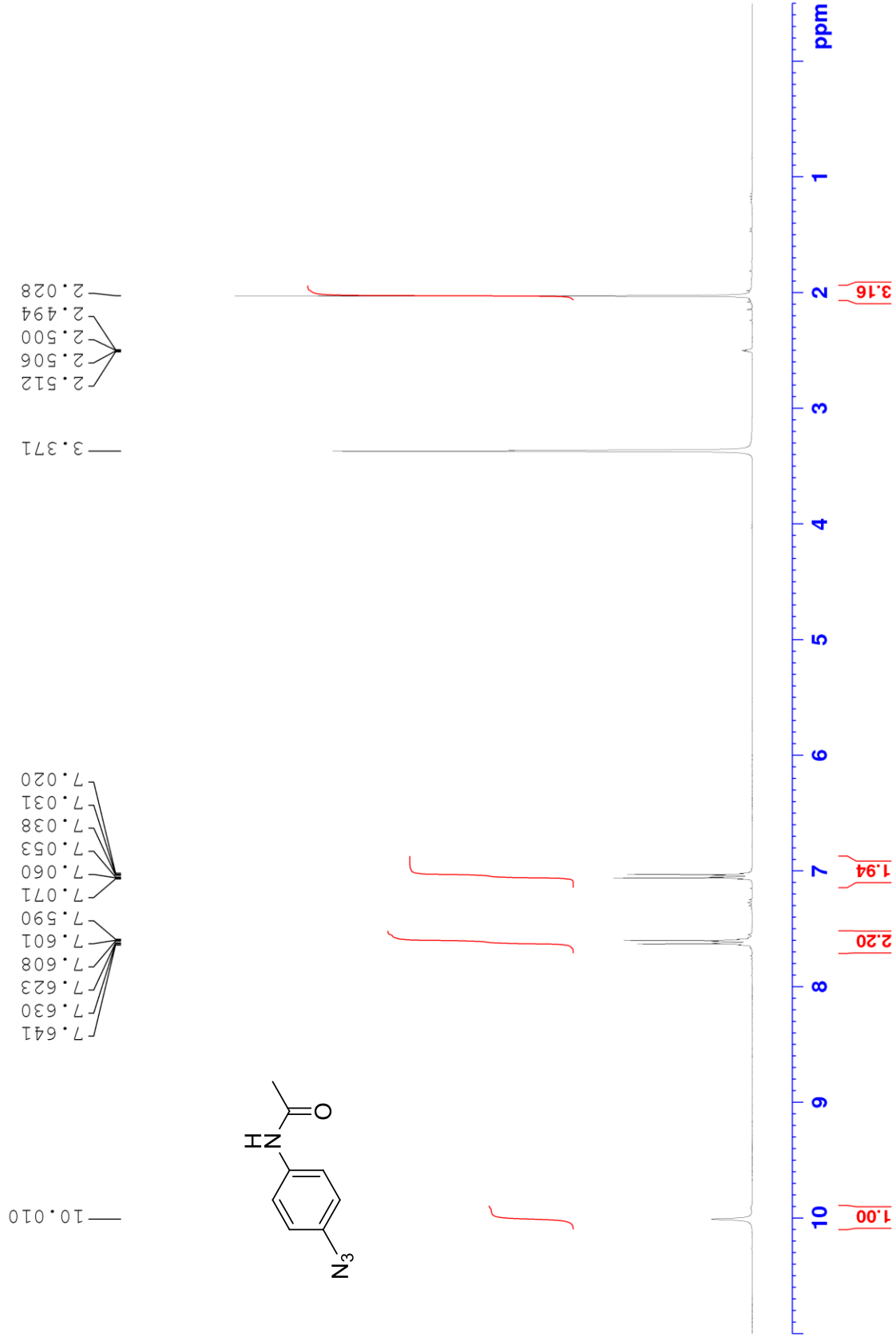
7.119
7.127
7.134
7.150
7.157
7.165
8.009
8.017
8.024
8.033
8.039
8.046
8.054



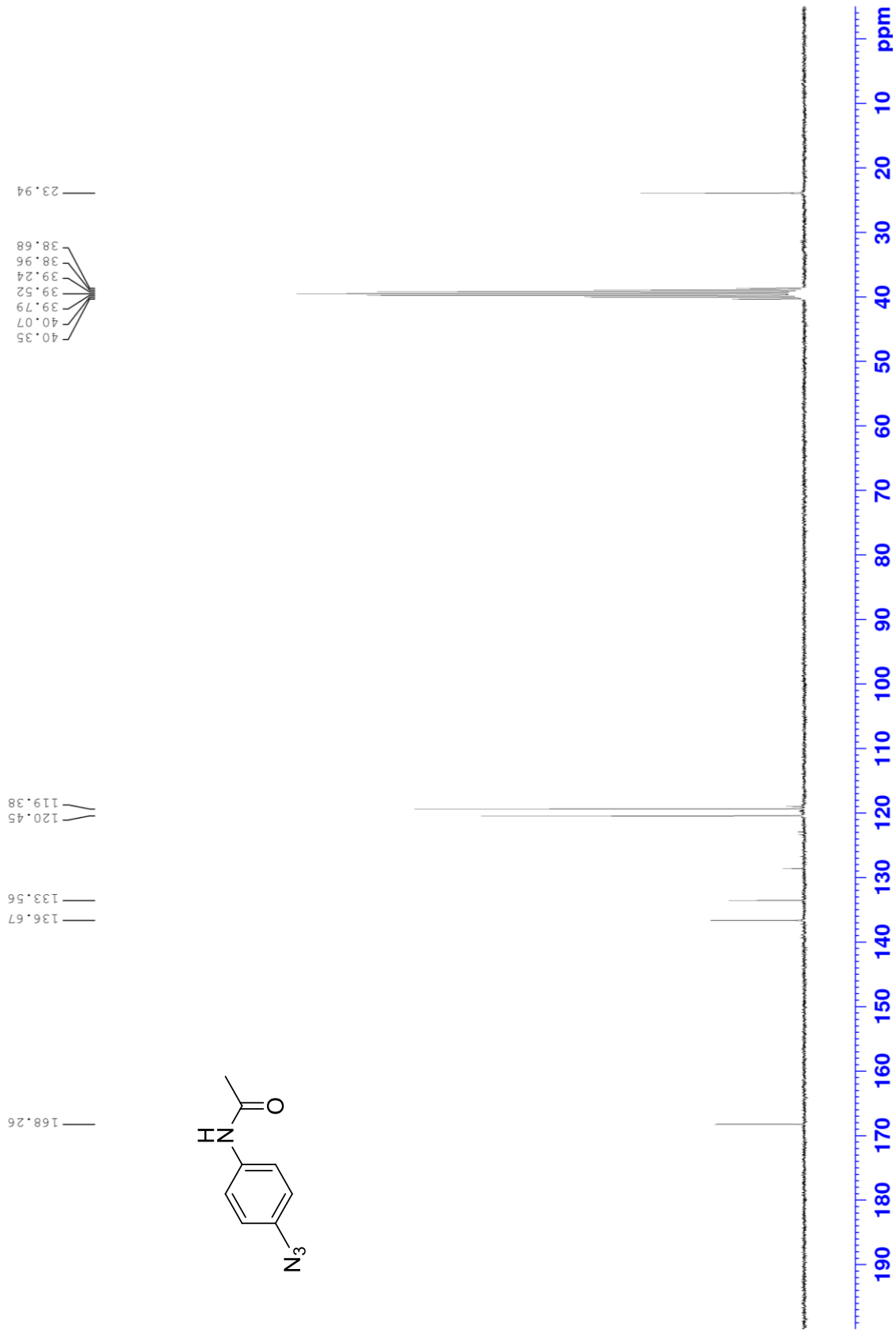
^{13}C NMR of compound **11o'** (75 MHz, MeOD- d_4)



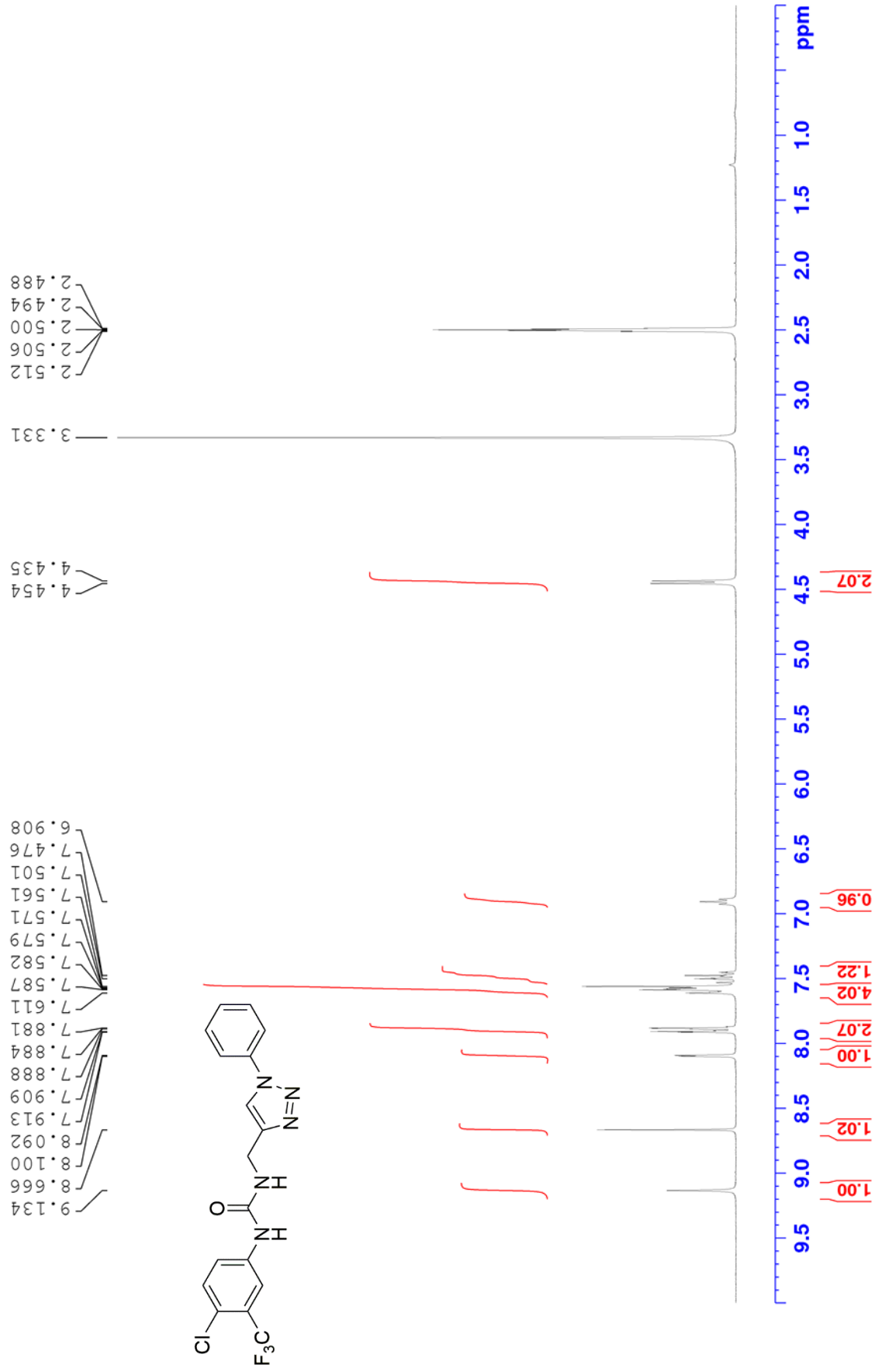
^1H NMR of compound **11p'** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



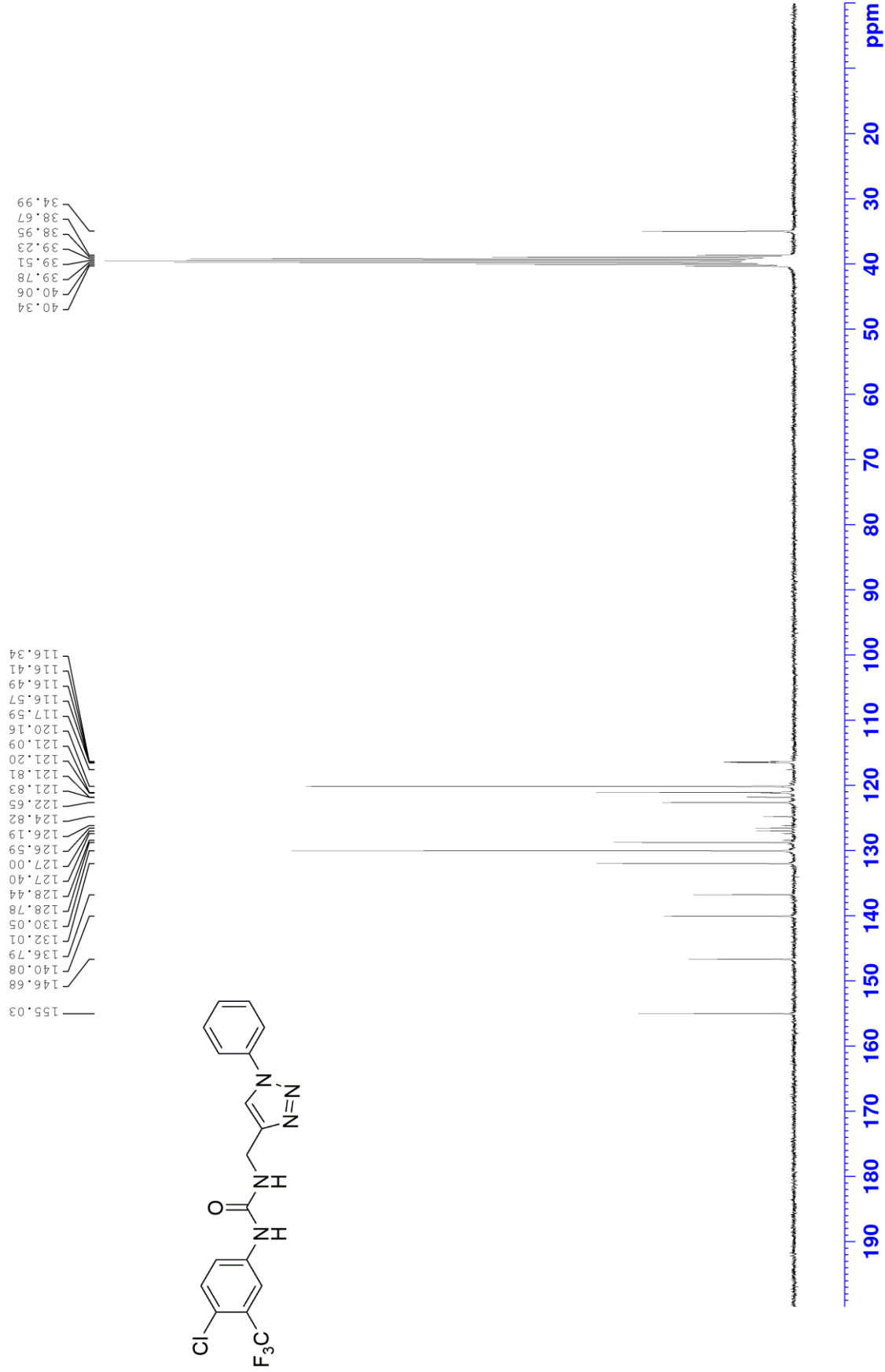
^{13}C NMR of compound **11p'** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



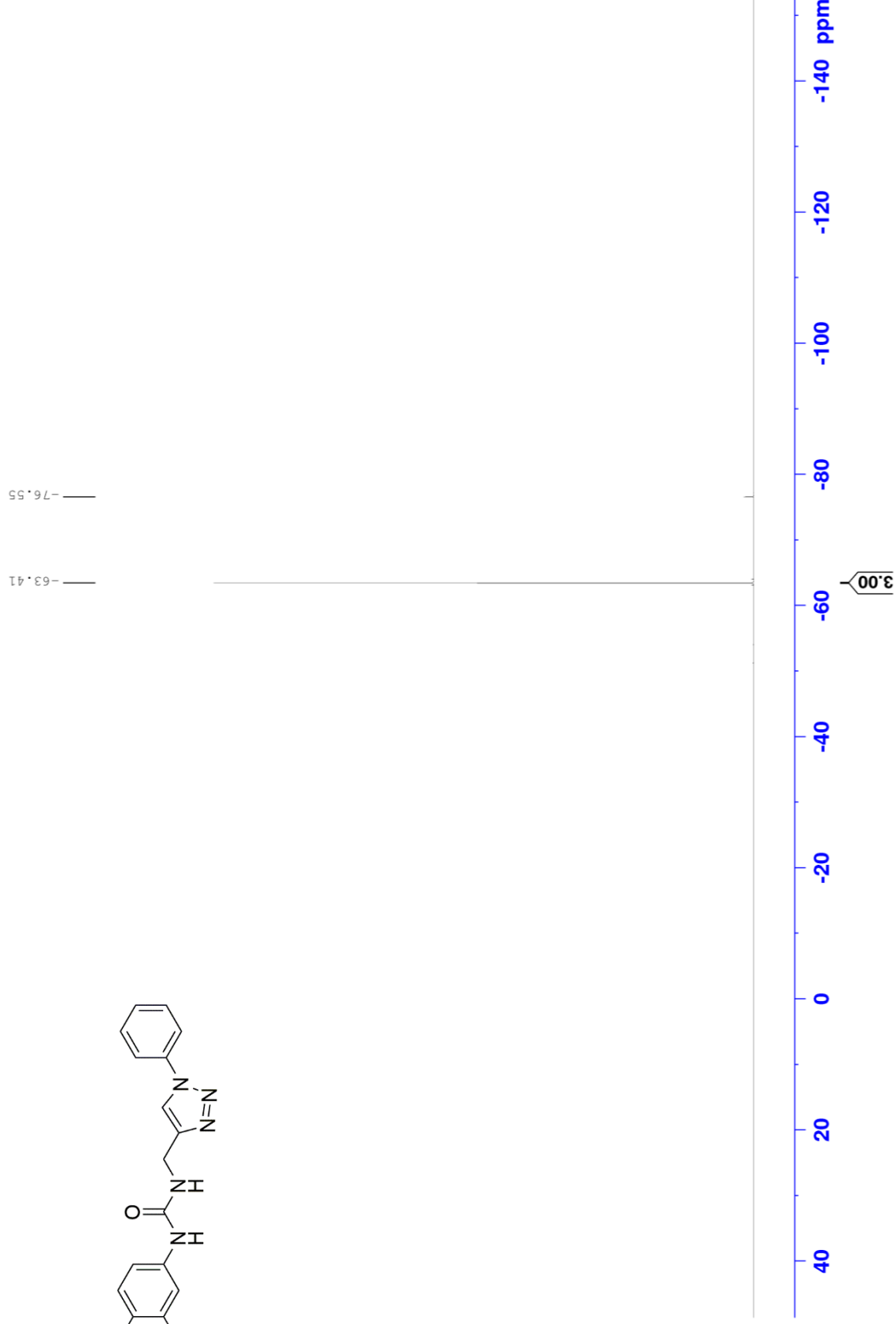
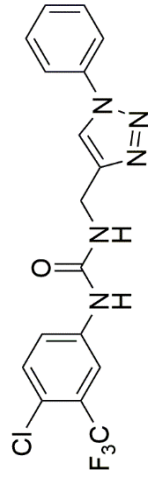
^1H NMR of compound **12a** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



^{13}C NMR of compound **12a** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

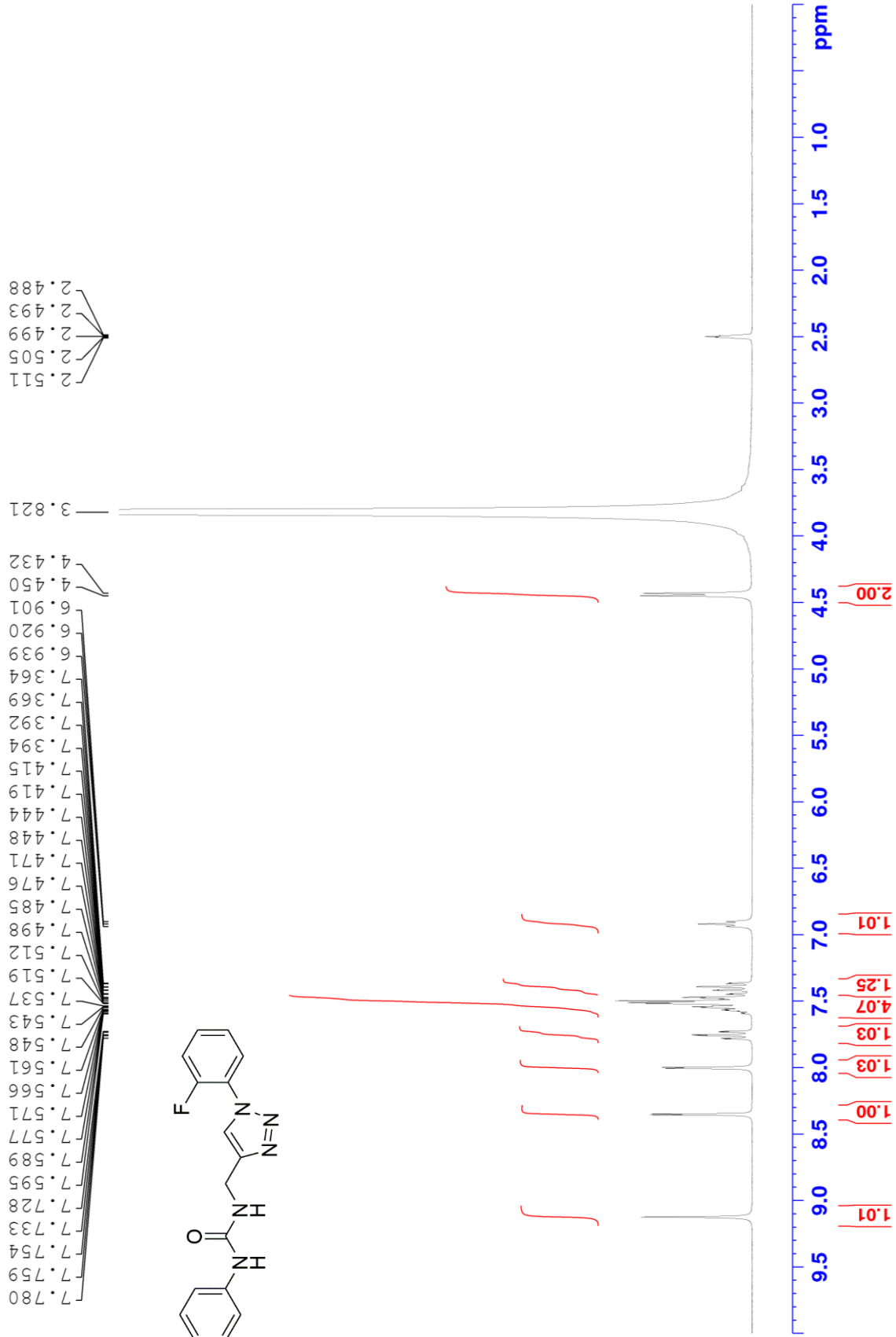
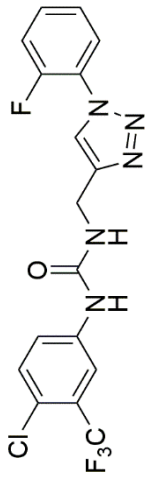


^{19}F NMR of compound **12a** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

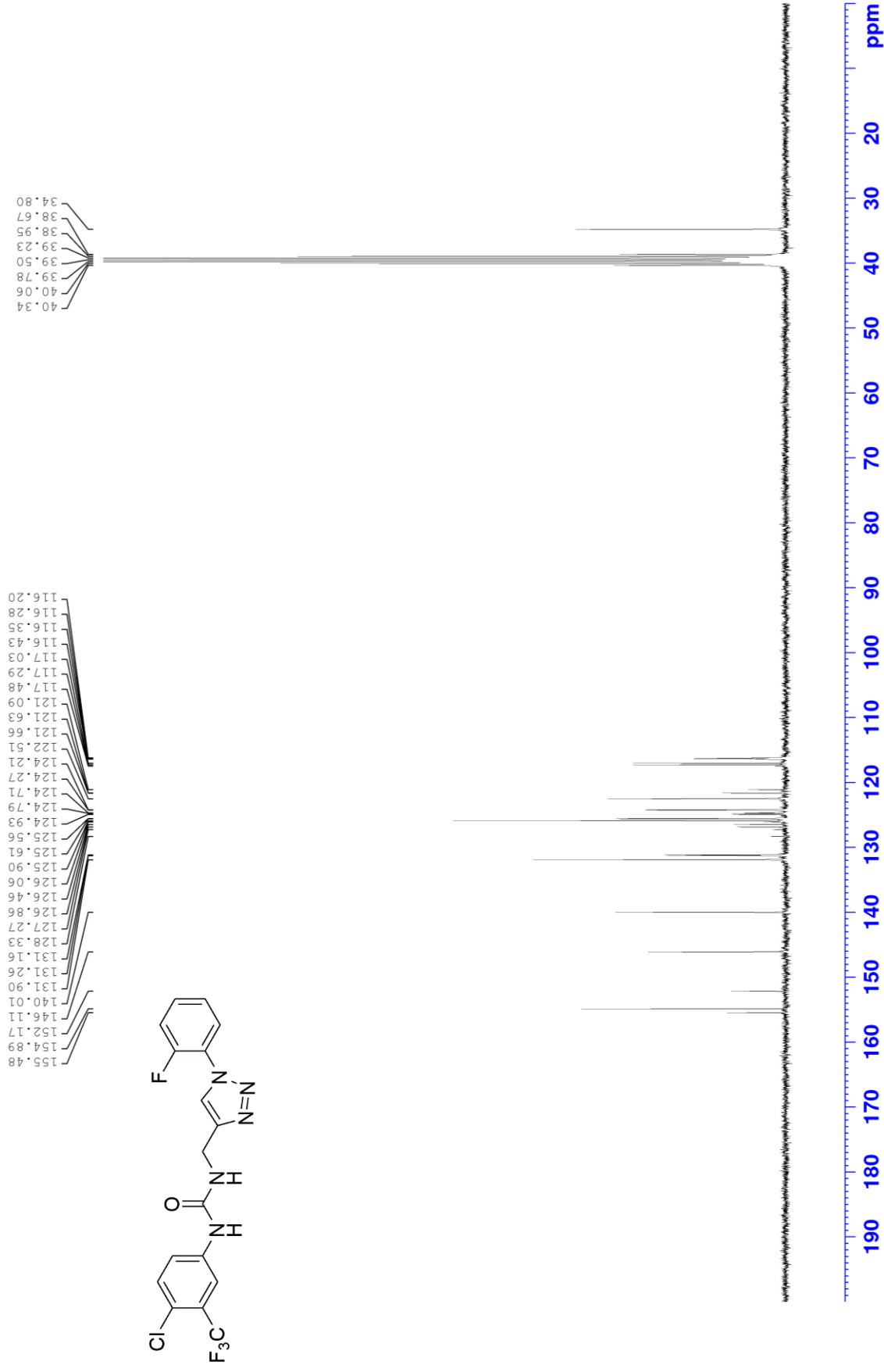


¹H NMR of compound **12b** (300 MHz, DMSO-d₆)

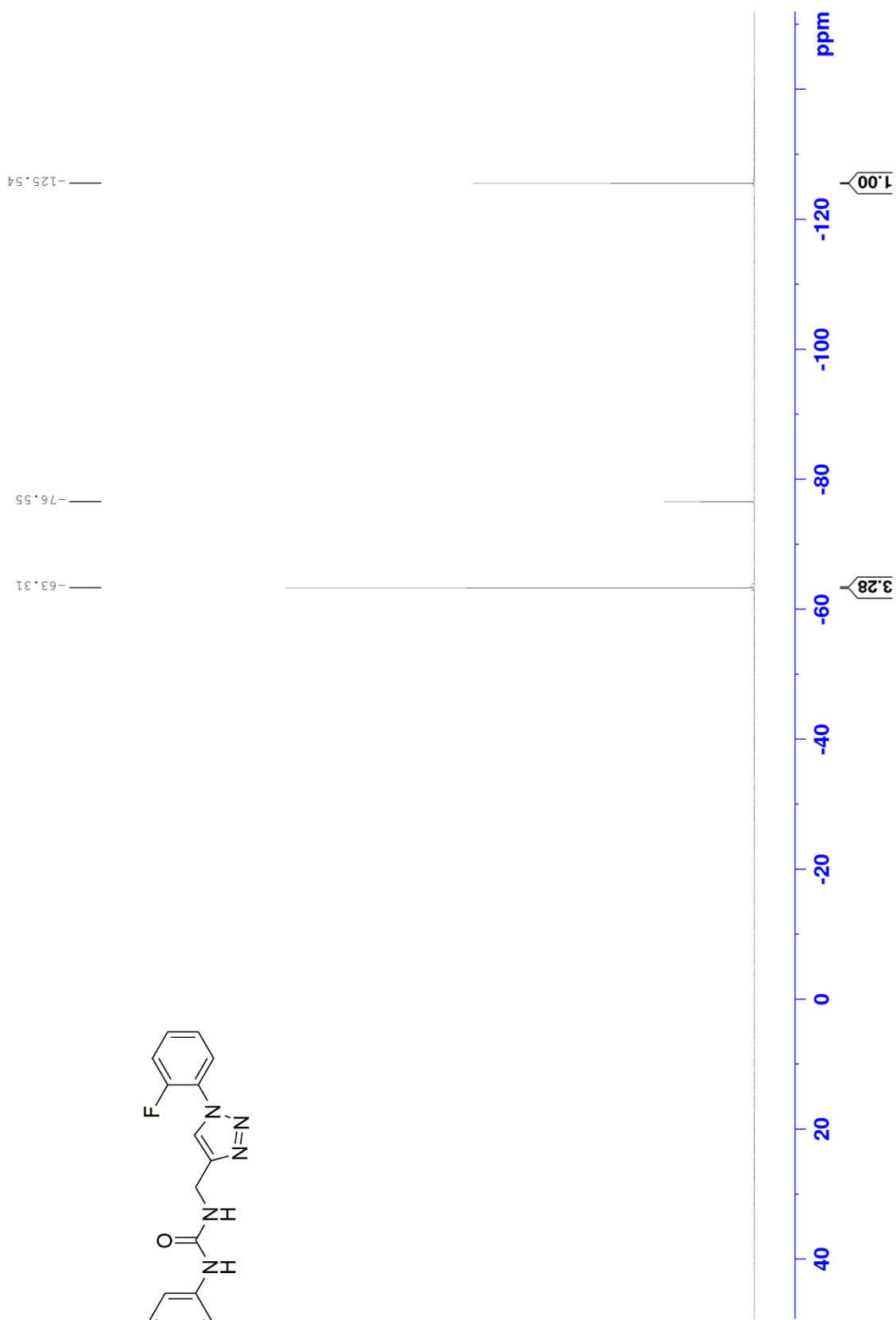
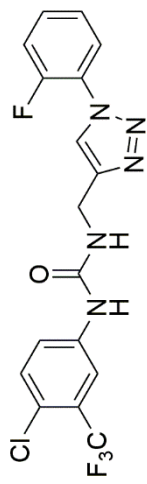
7.780
7.759
7.754
7.733
7.728
7.595
7.589
7.577
7.571
7.566
7.561
7.548
7.543
7.537
7.519
7.512
7.498
7.485
7.476
7.471
7.448
7.444
7.419
7.415
7.392
7.394
7.364
7.369
6.920
6.939
6.901
4.450
4.432



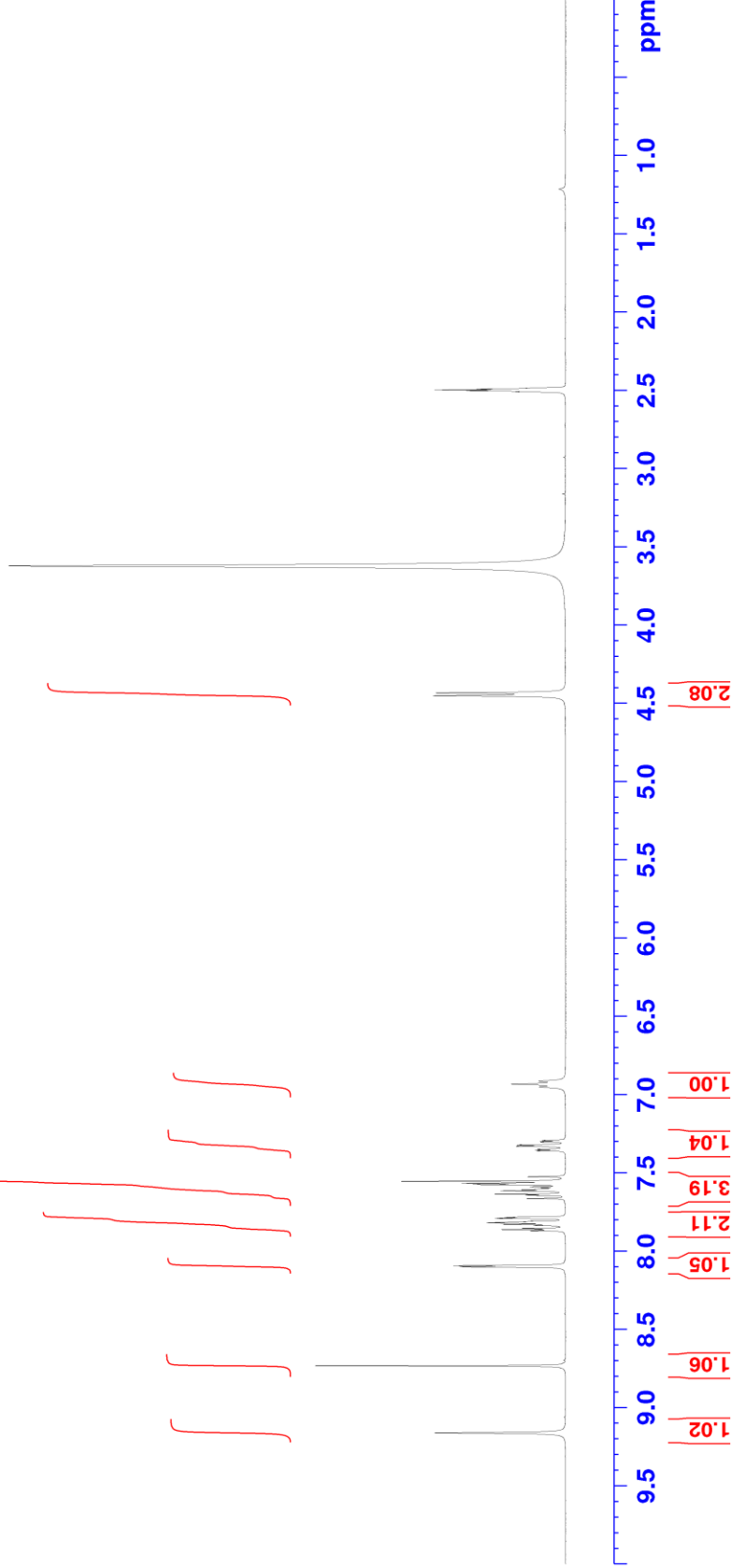
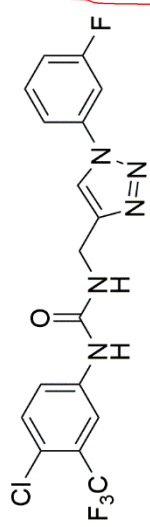
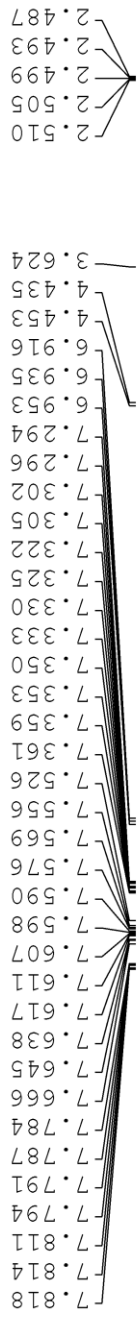
^{13}C NMR of compound **12b** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



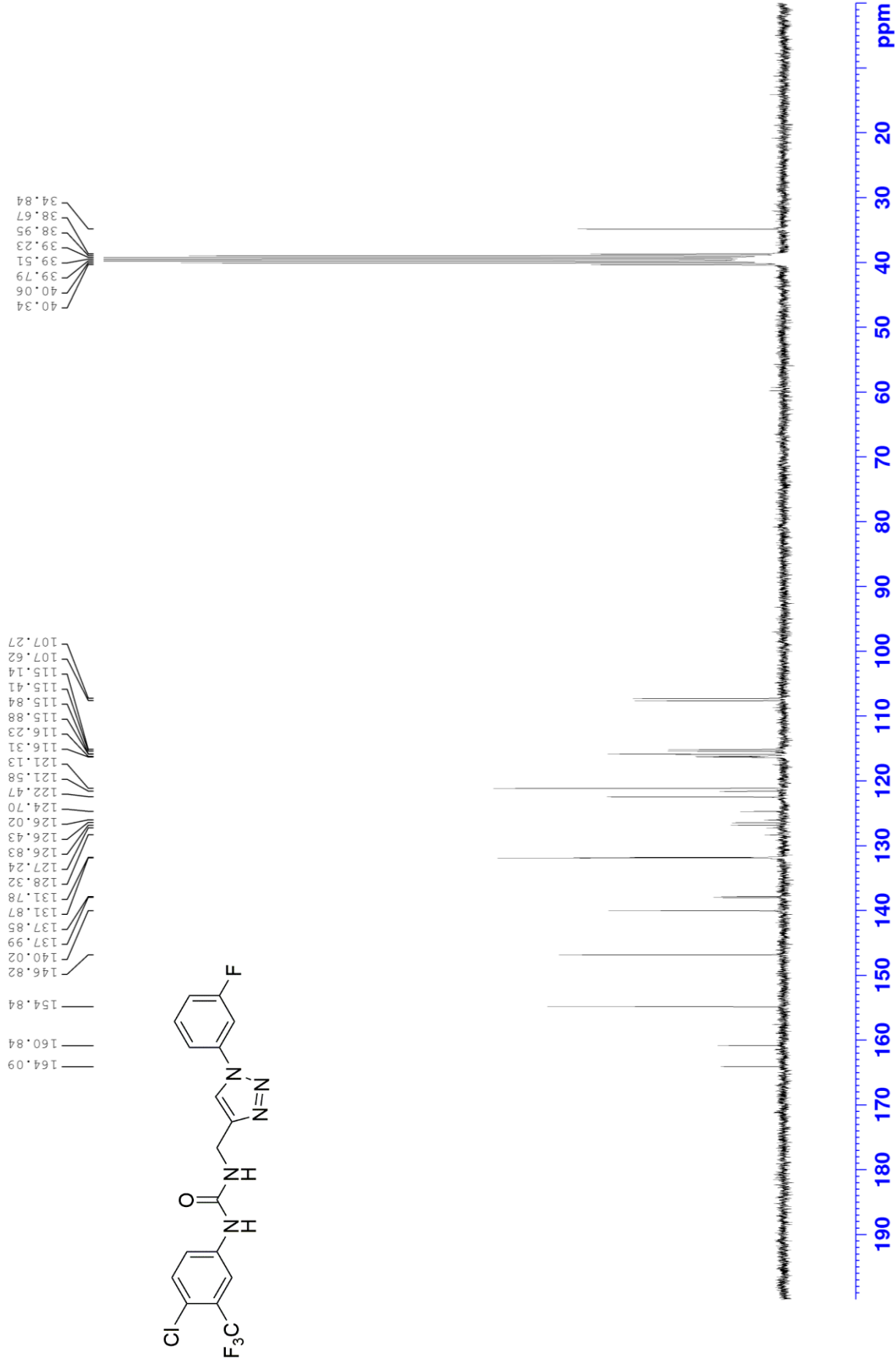
^{19}F NMR of compound **12b** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



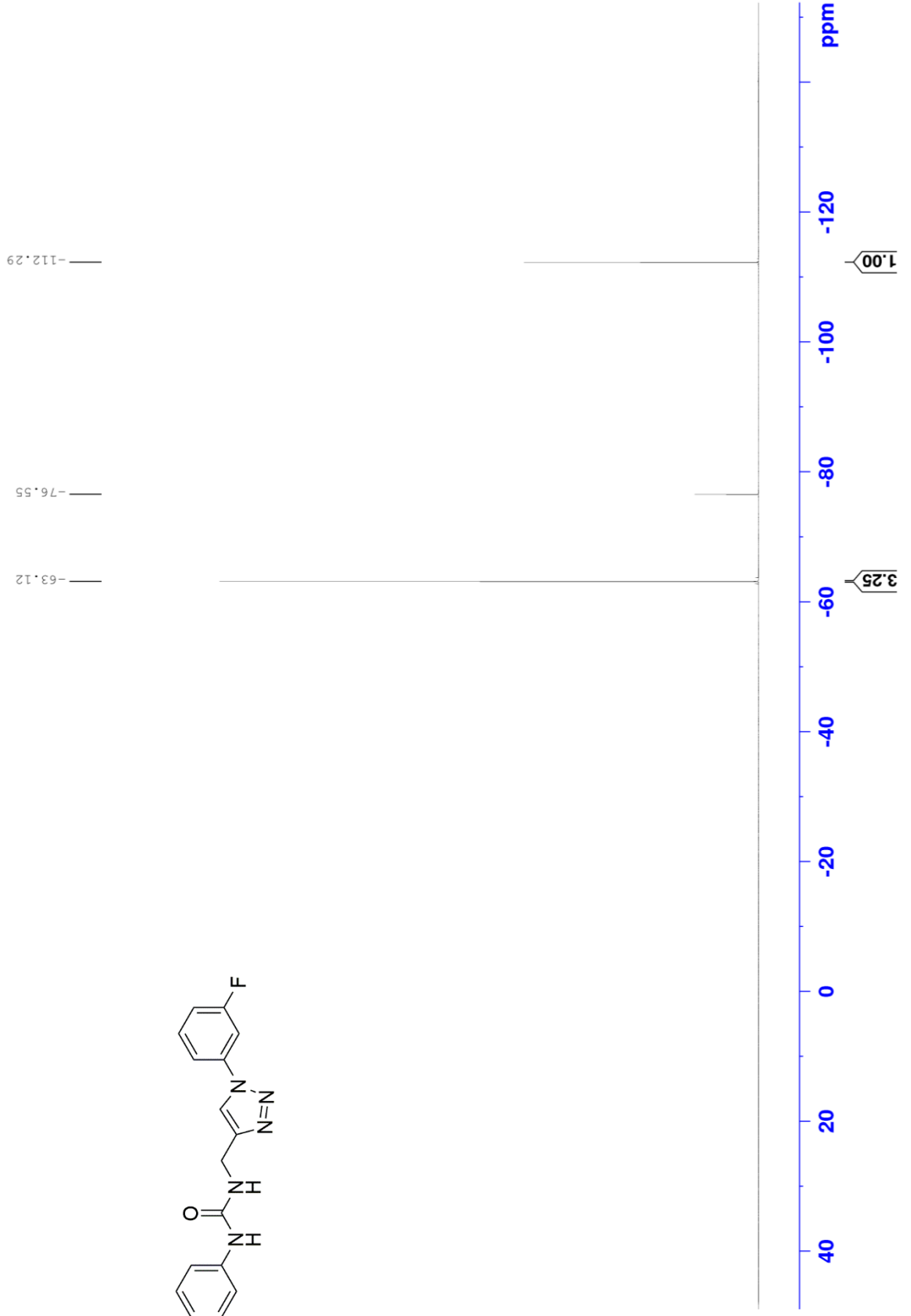
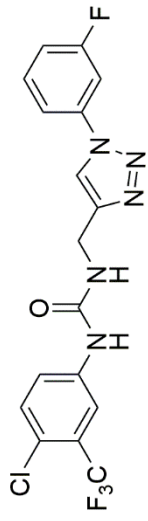
¹H NMR of compound **12c** (300 MHz, DMSO-d₆)



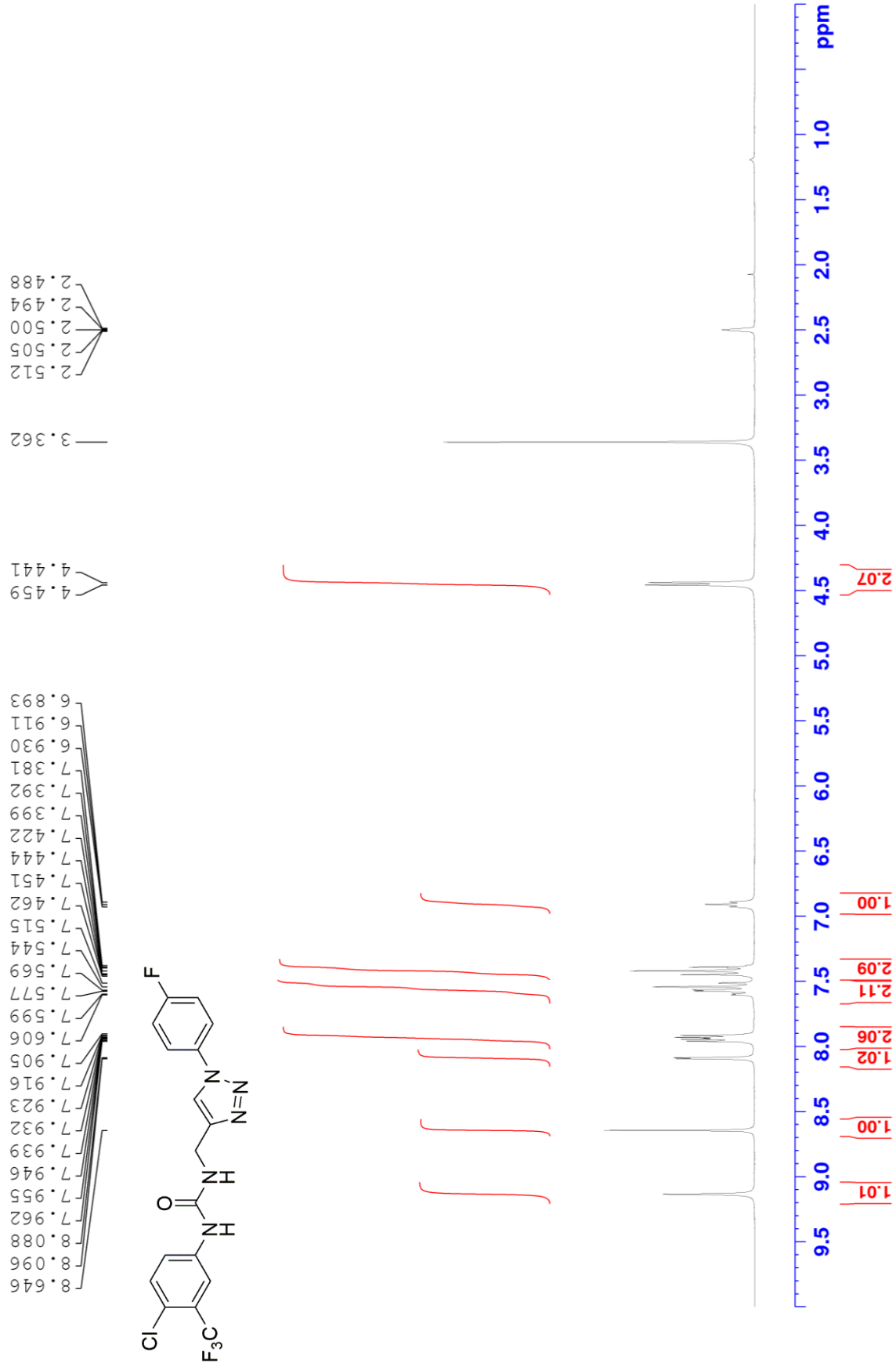
^{13}C NMR of compound **12c** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



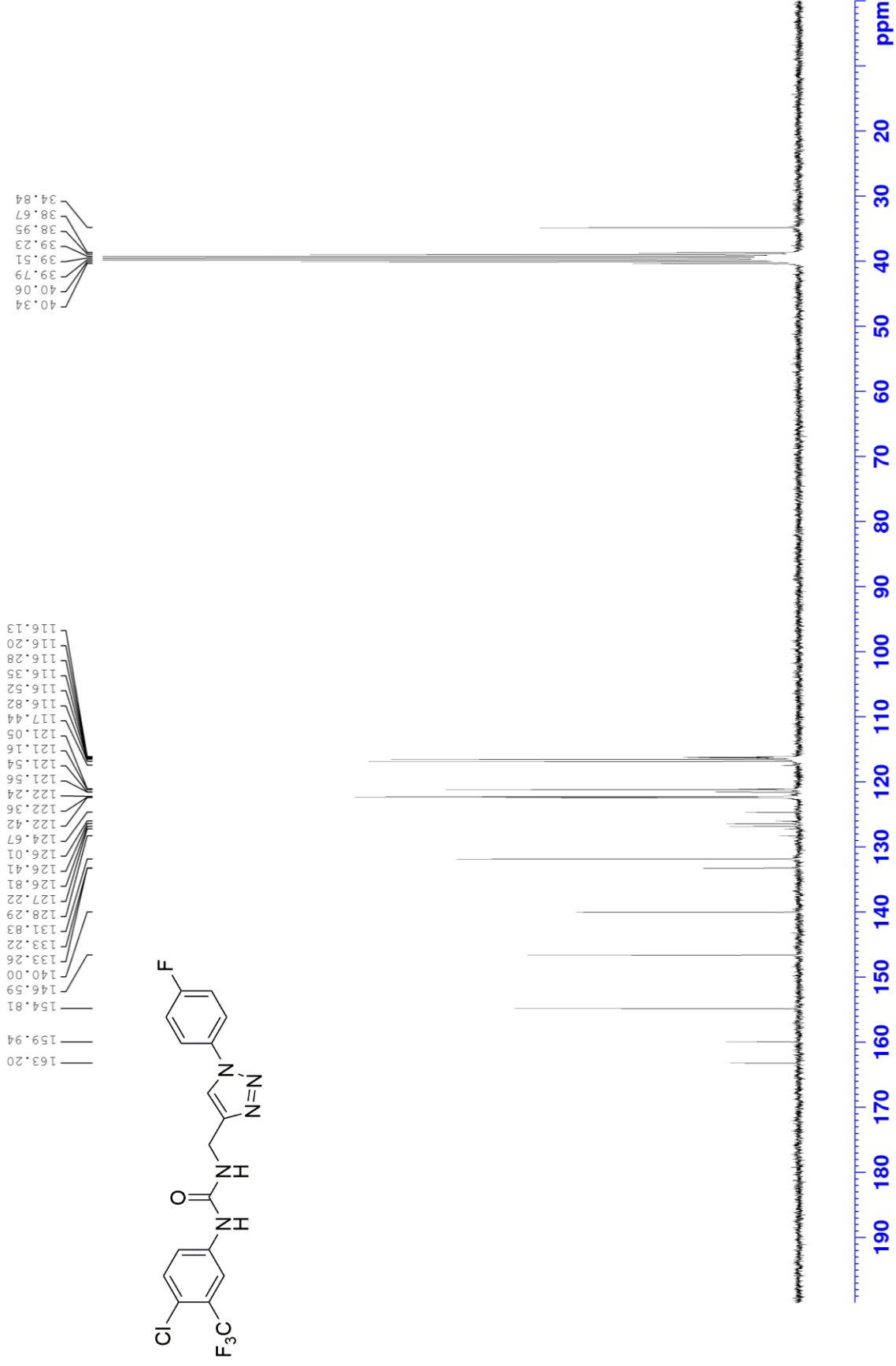
^{19}F NMR of compound **12c** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



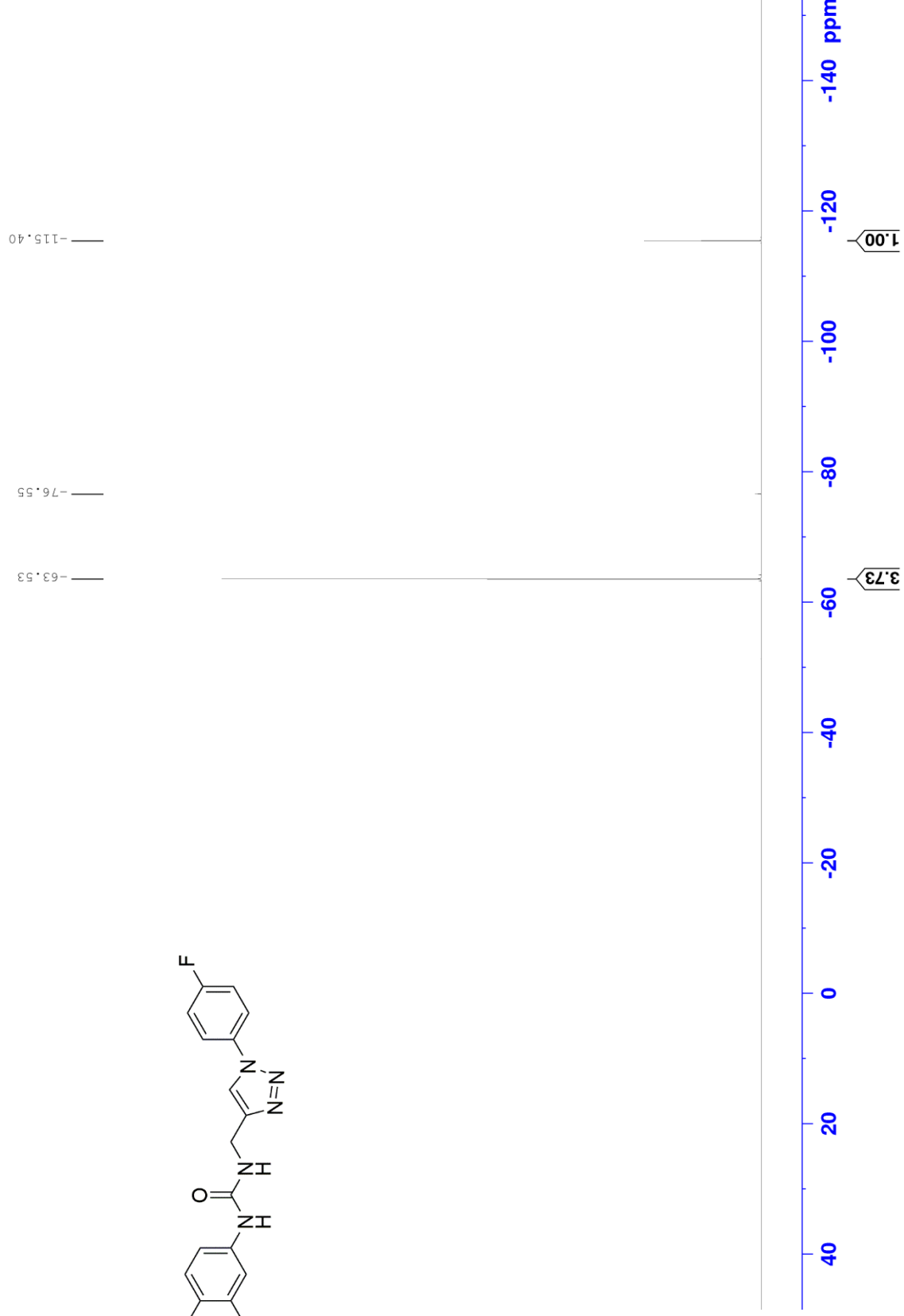
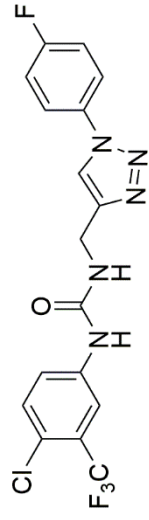
^1H NMR of compound **12d** (300 MHz, DMSO- d_6)



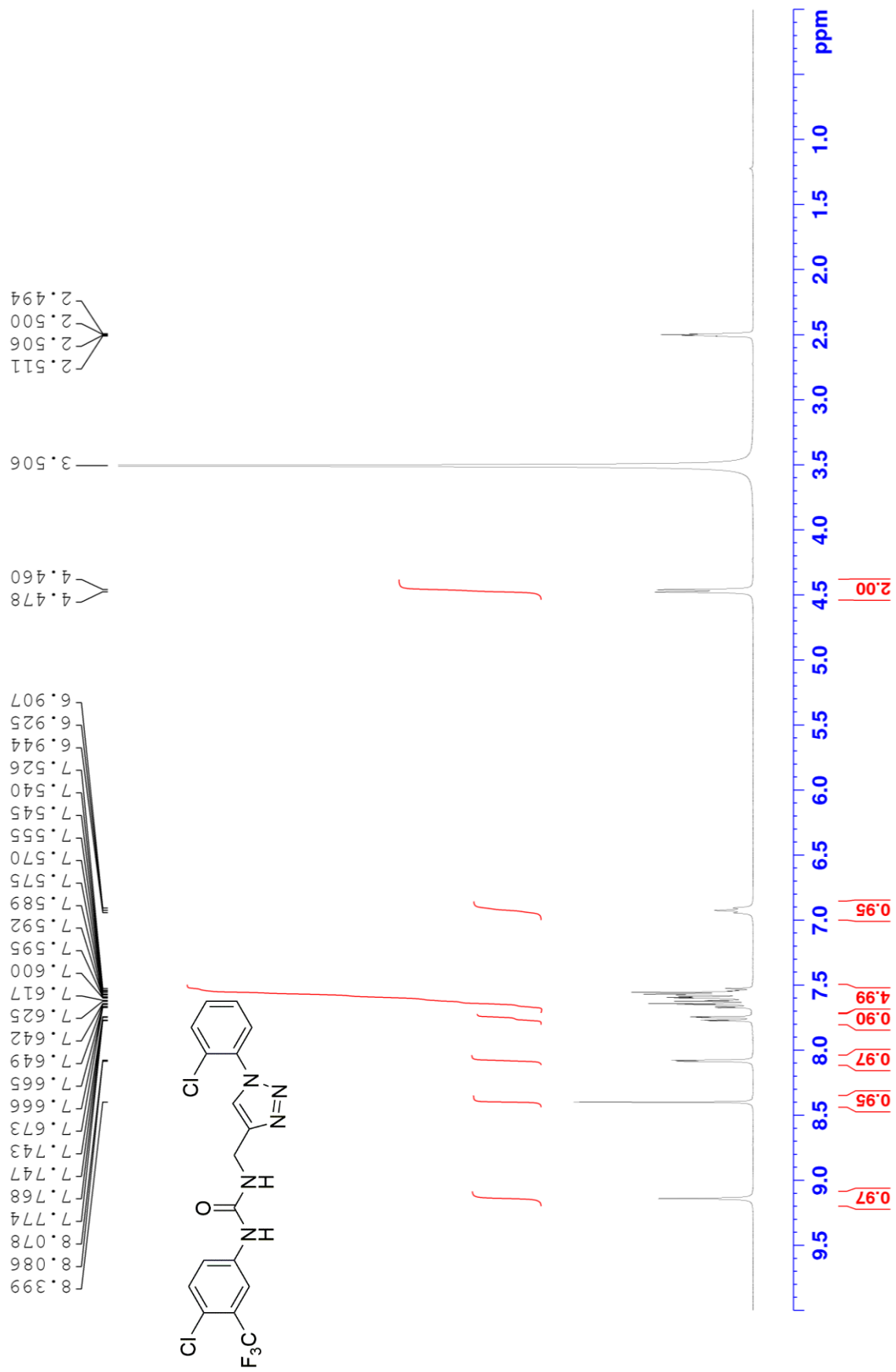
¹³C NMR of compound **12d** (75 MHz, DMSO-d₆)



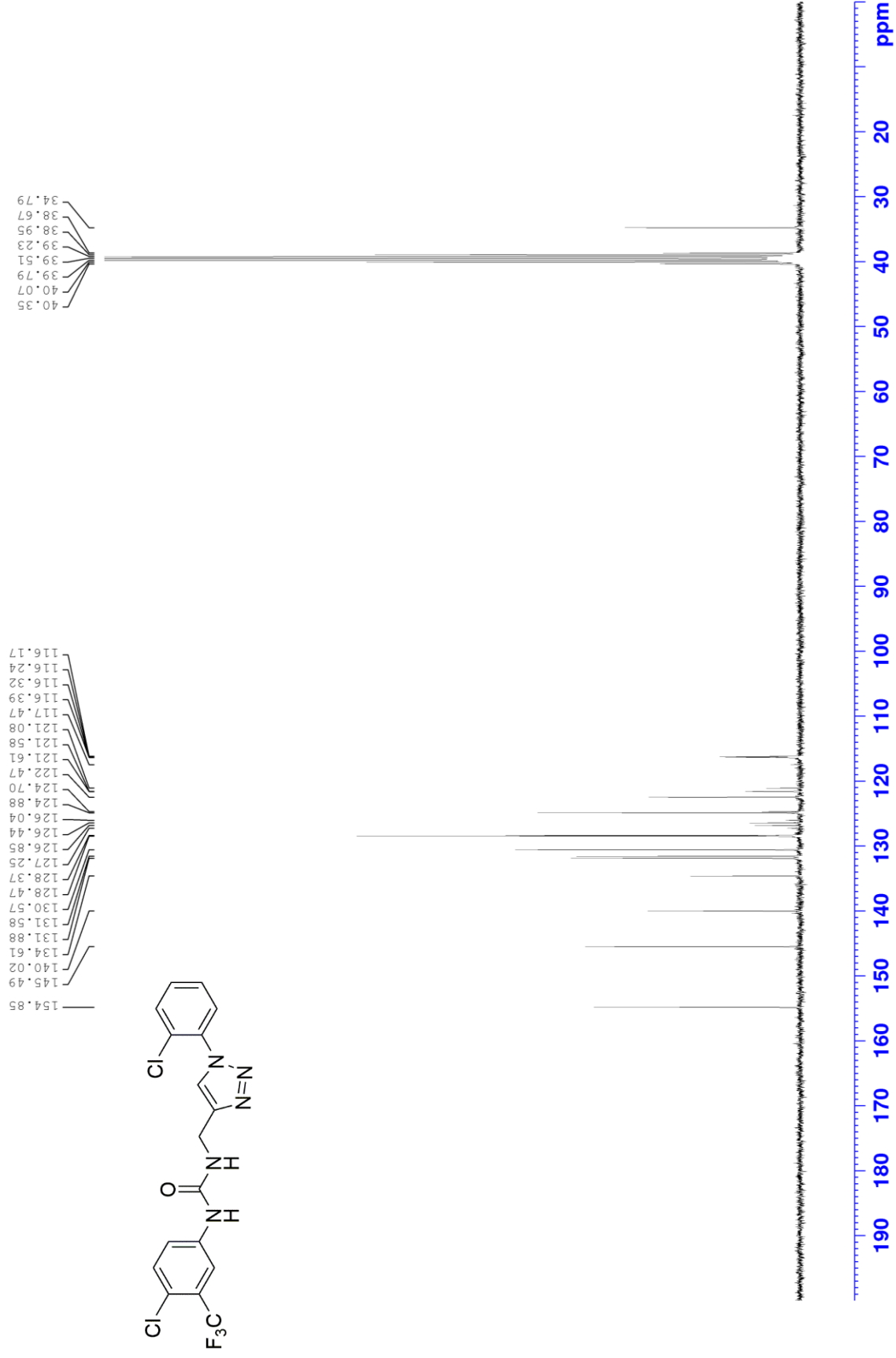
^{19}F NMR of compound **12d** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



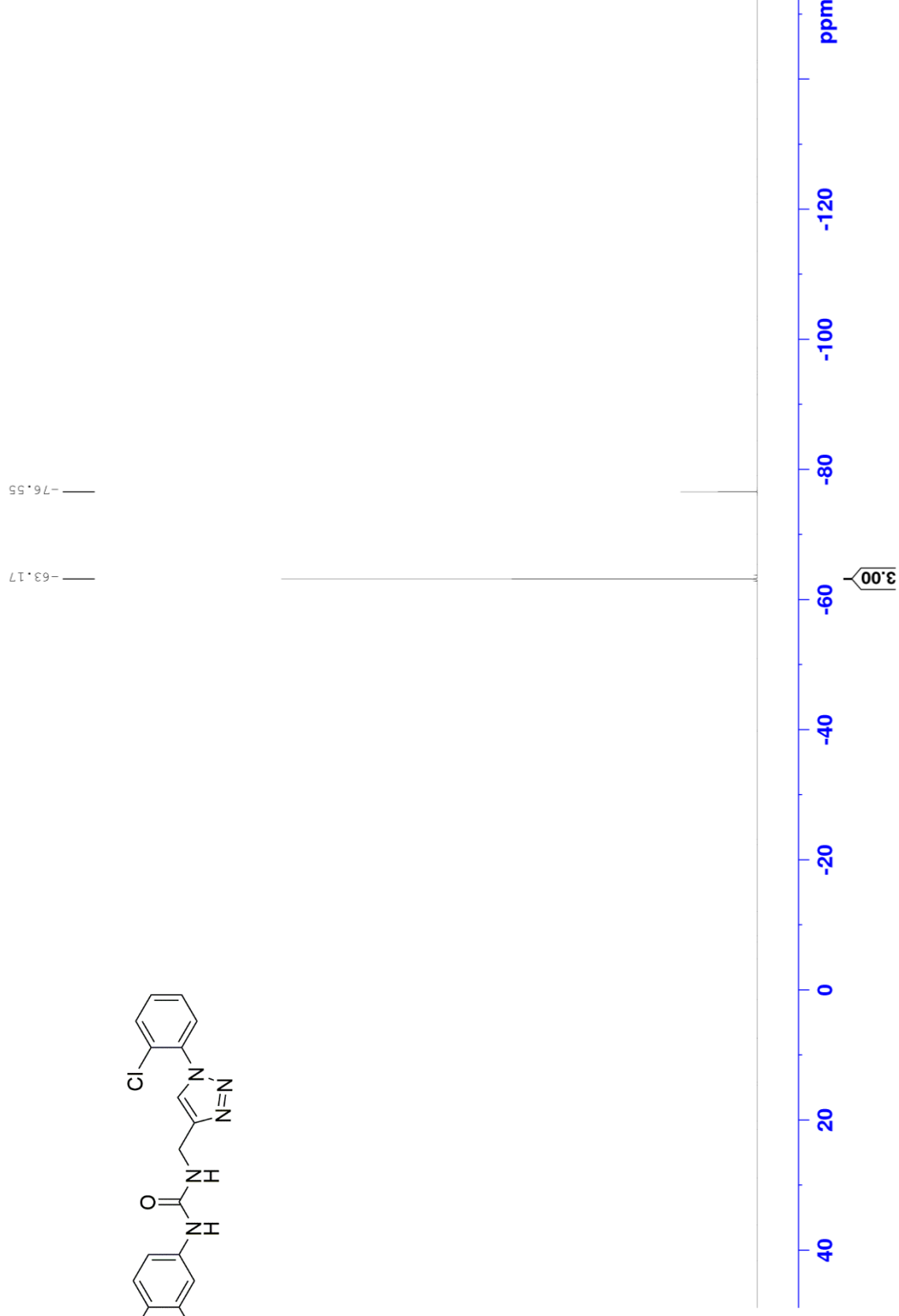
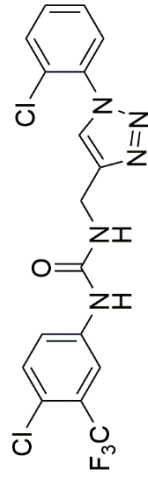
¹H NMR of compound **12e** (300 MHz, DMSO-d₆)



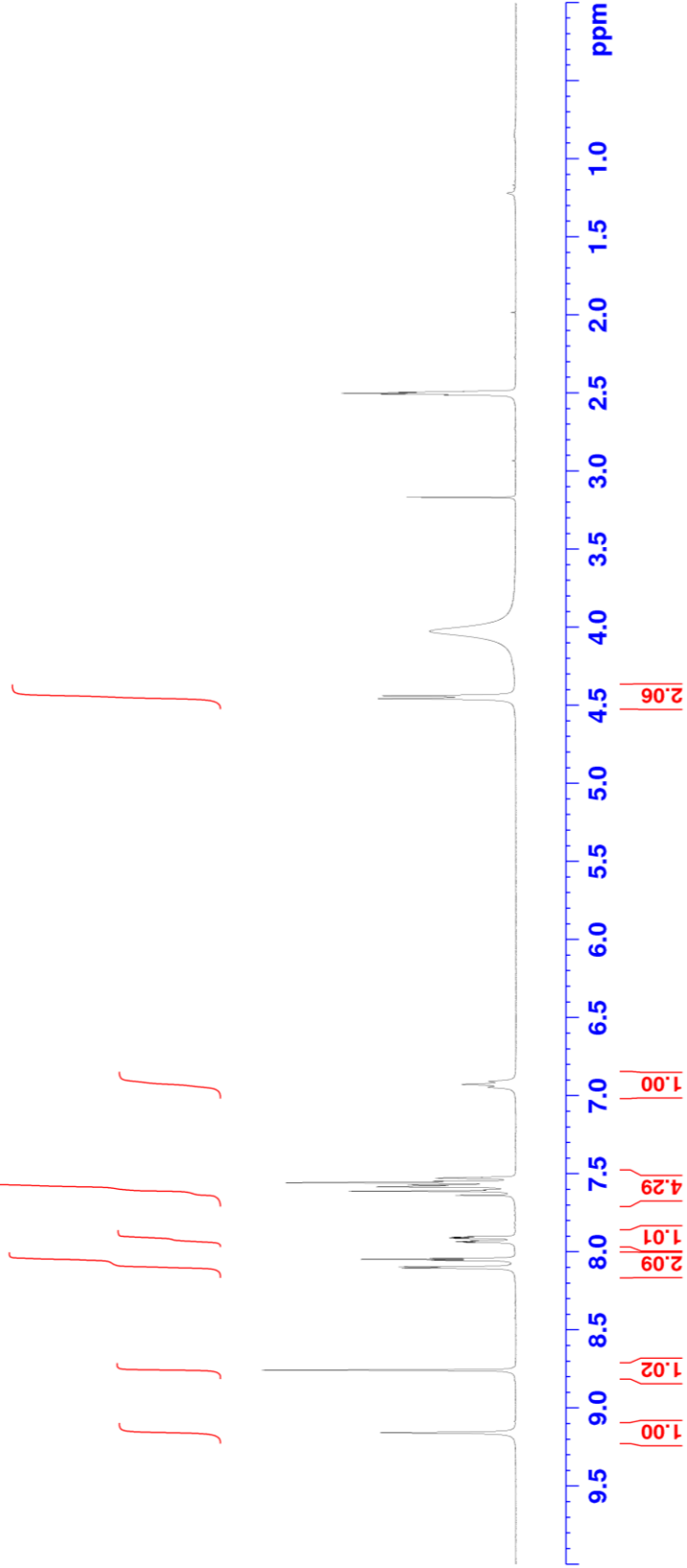
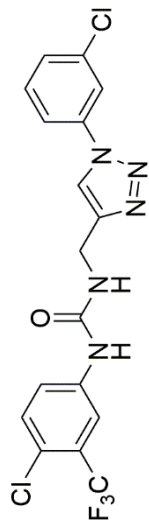
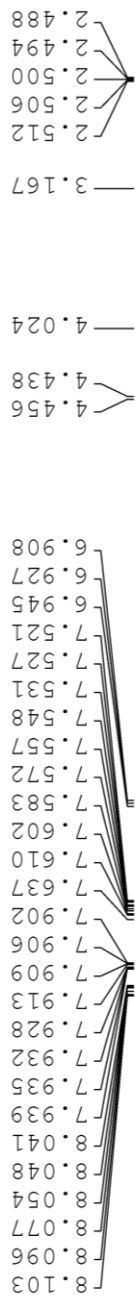
^{13}C NMR of compound **12e** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



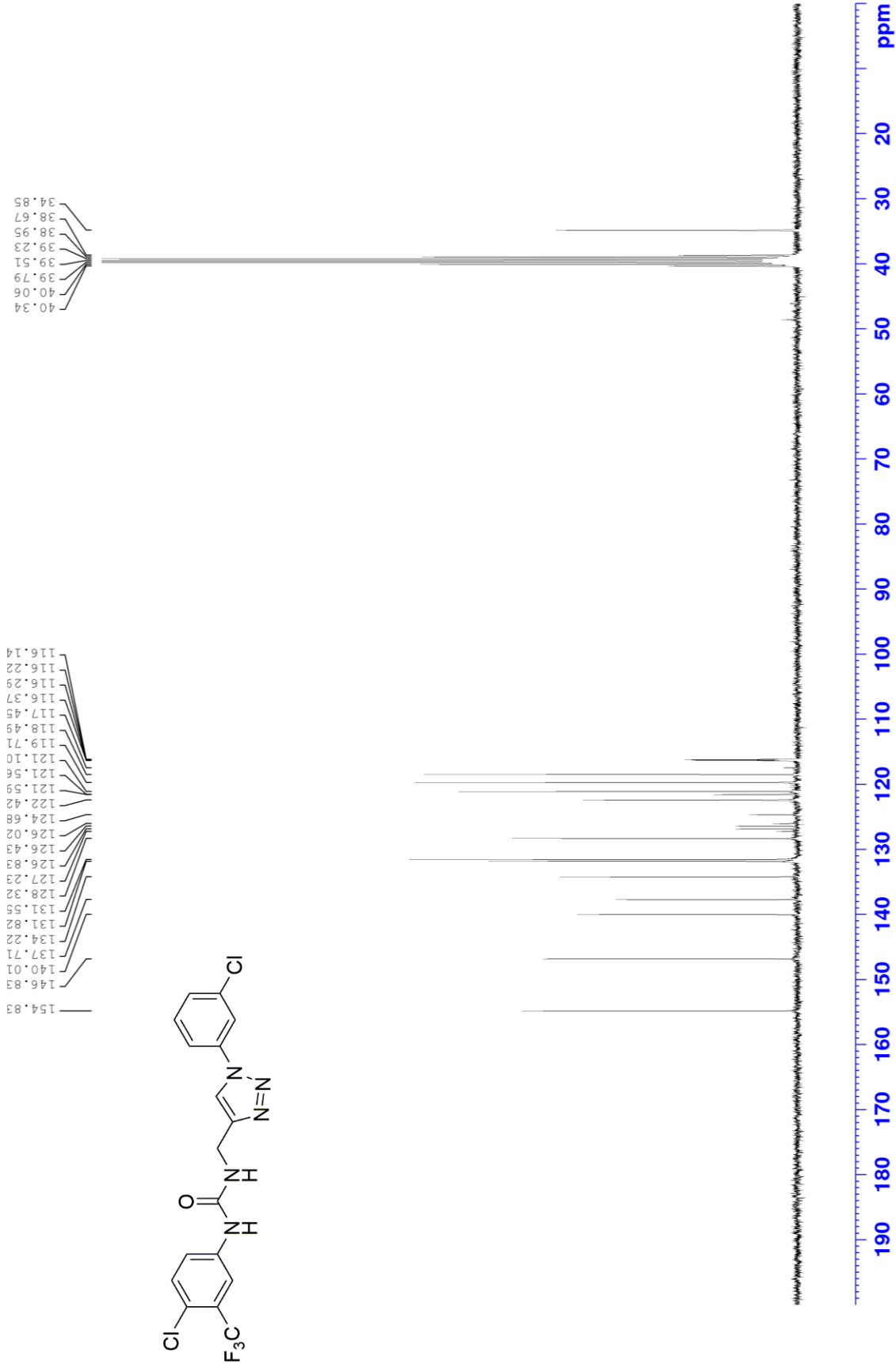
^{19}F NMR of compound **12e** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



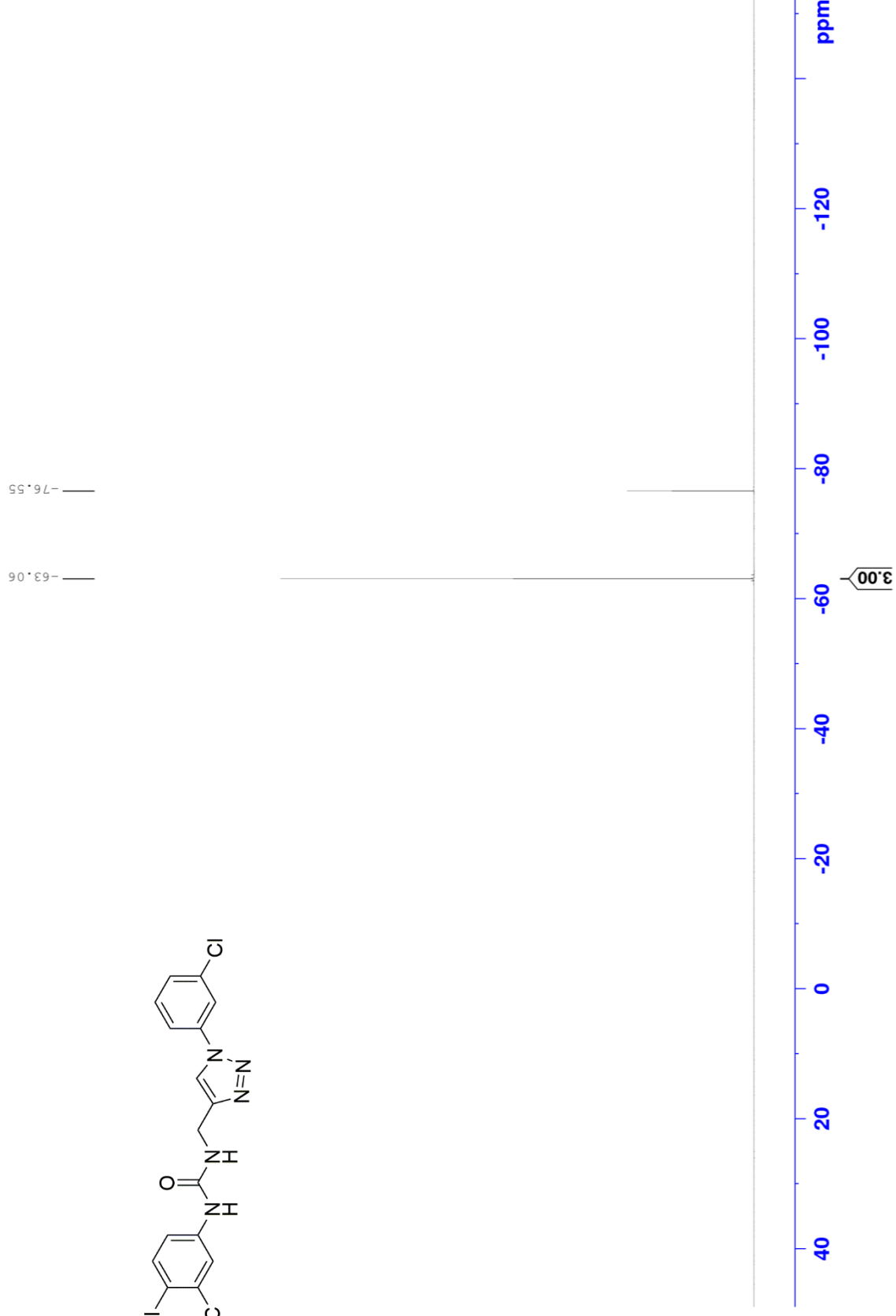
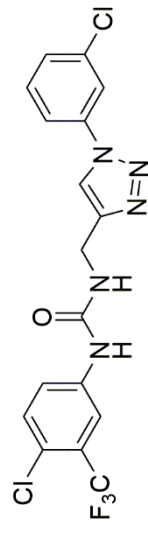
¹H NMR of compound **12f** (300 MHz, DMSO-d₆)



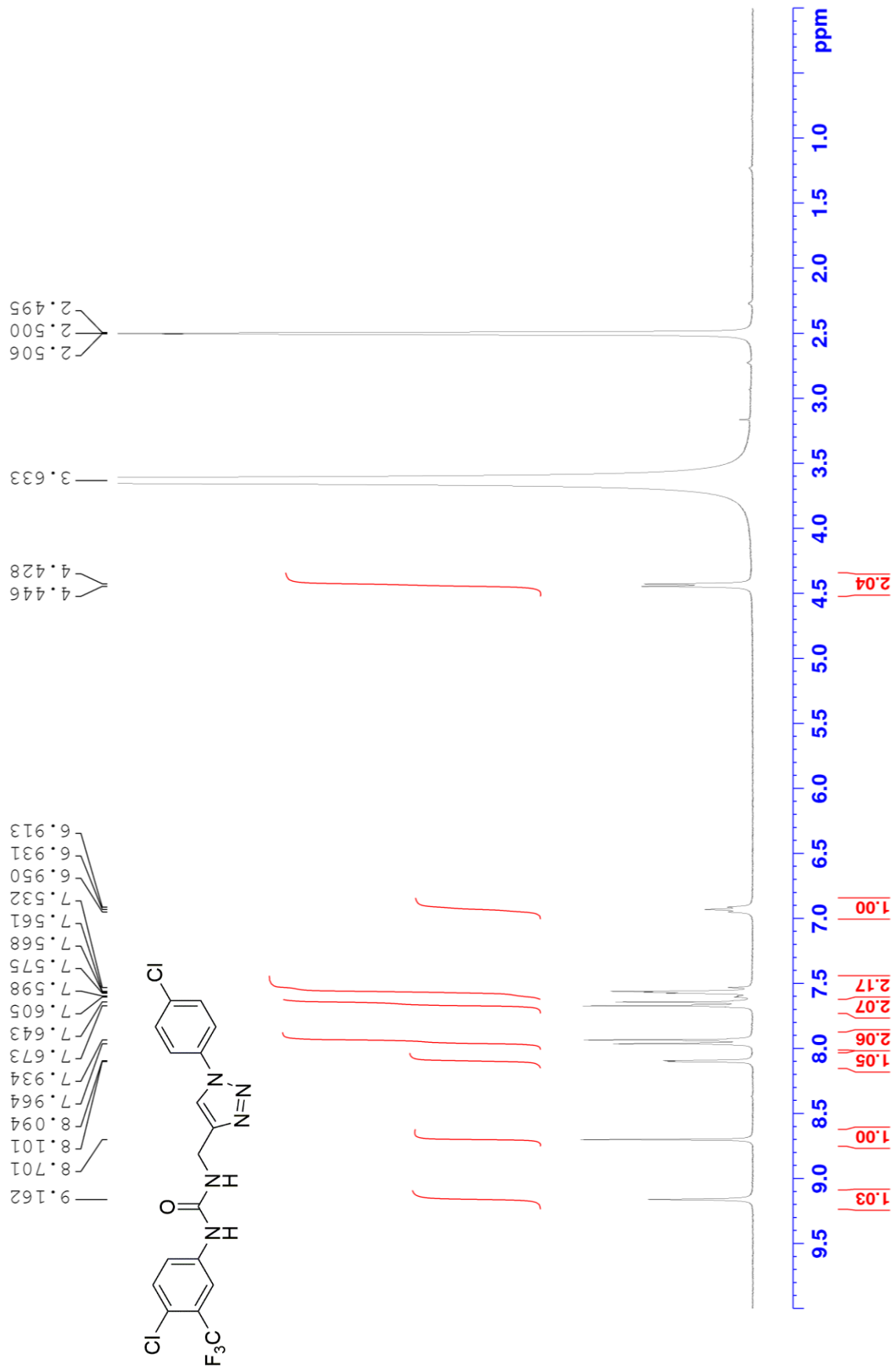
^{13}C NMR of compound **12f** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



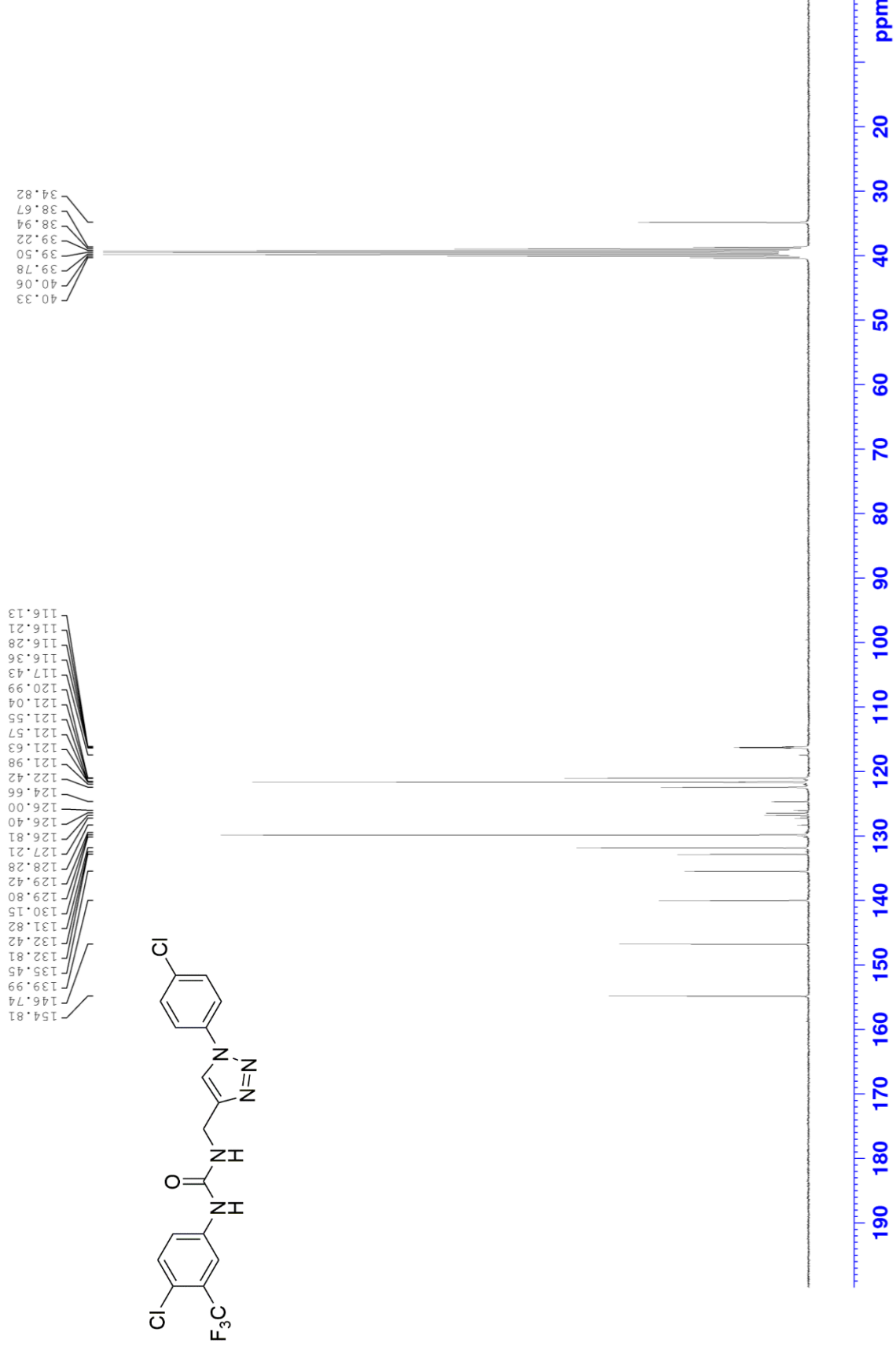
^{19}F NMR of compound **12f** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



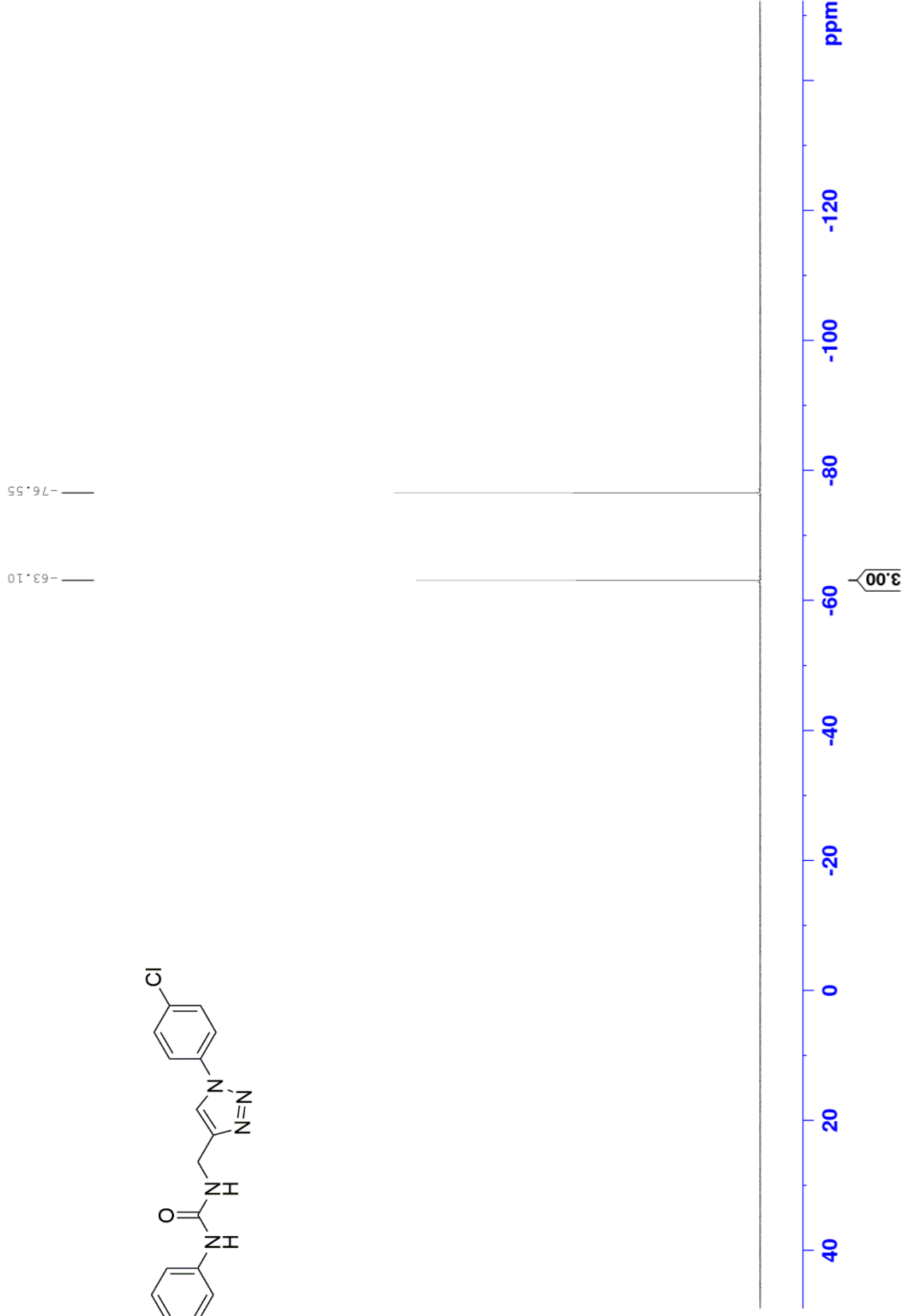
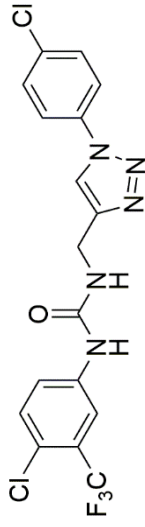
^1H NMR of compound **12g** (300 MHz, DMSO-d_6)



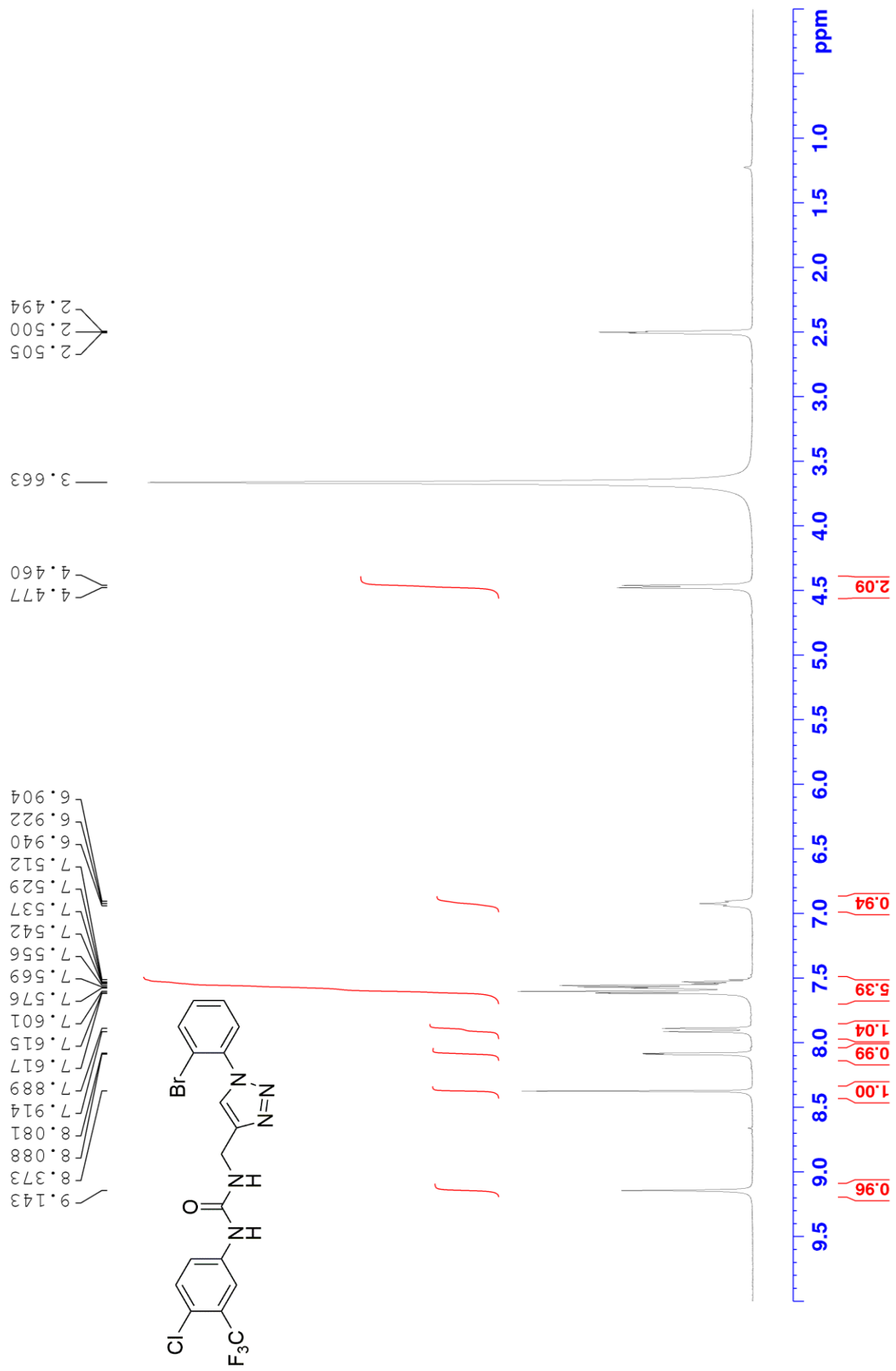
^{13}C NMR of compound **12g** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



^{19}F NMR of compound **12g** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



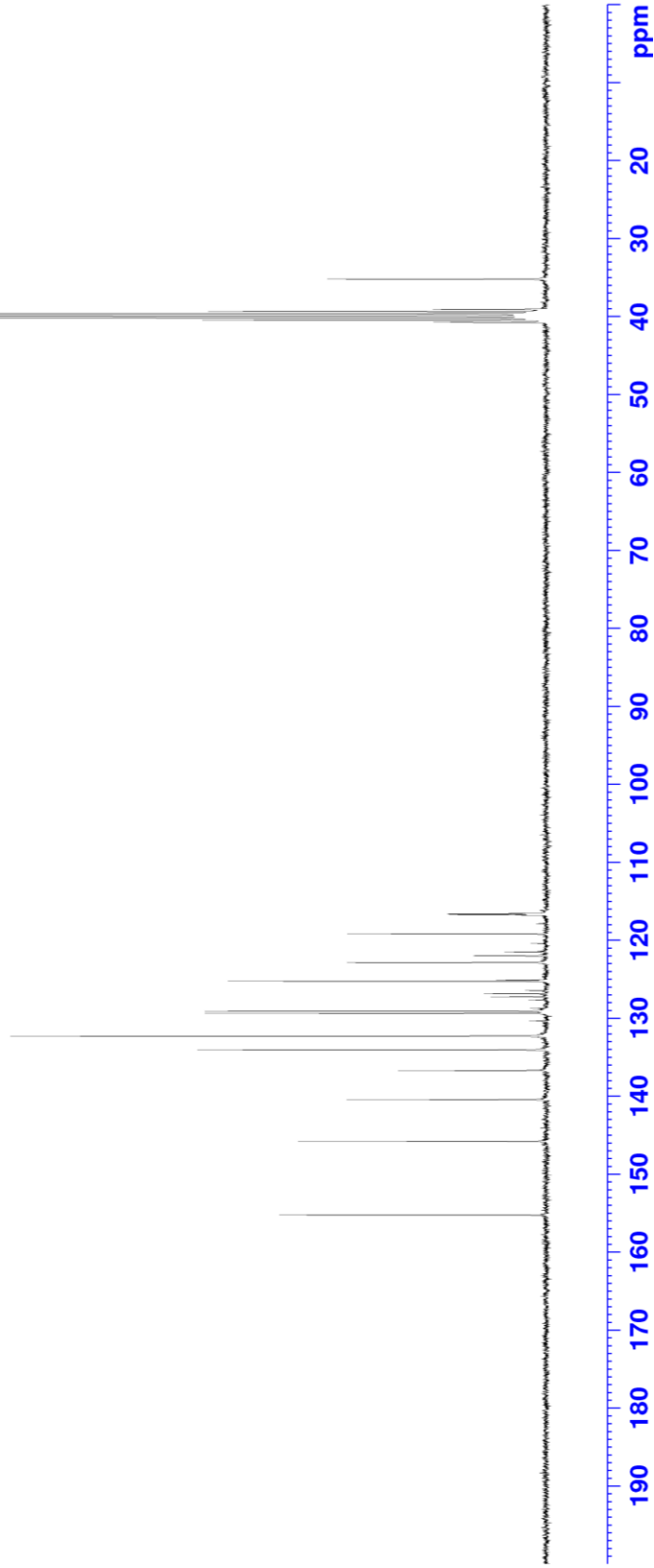
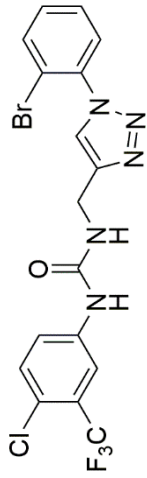
^1H NMR of compound **12h** (300 MHz, DMSO-d_6)



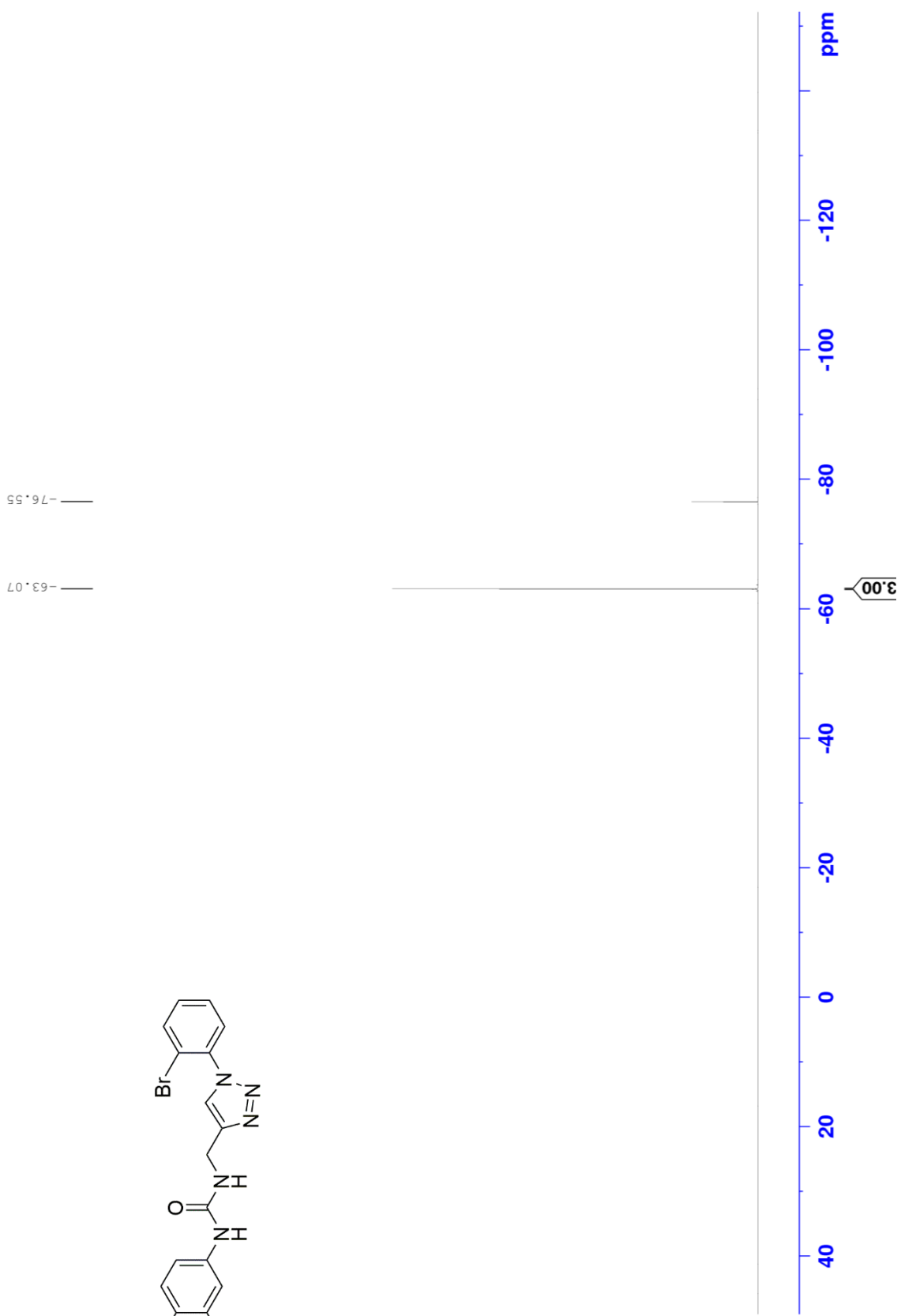
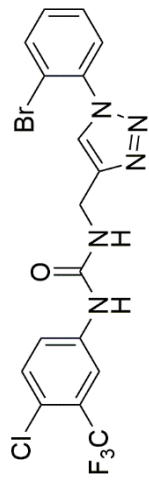
¹³C NMR of compound **12h** (75 MHz, DMSO-d₆)

40.77
40.49
40.21
39.93
39.65
39.38
39.10
35.22

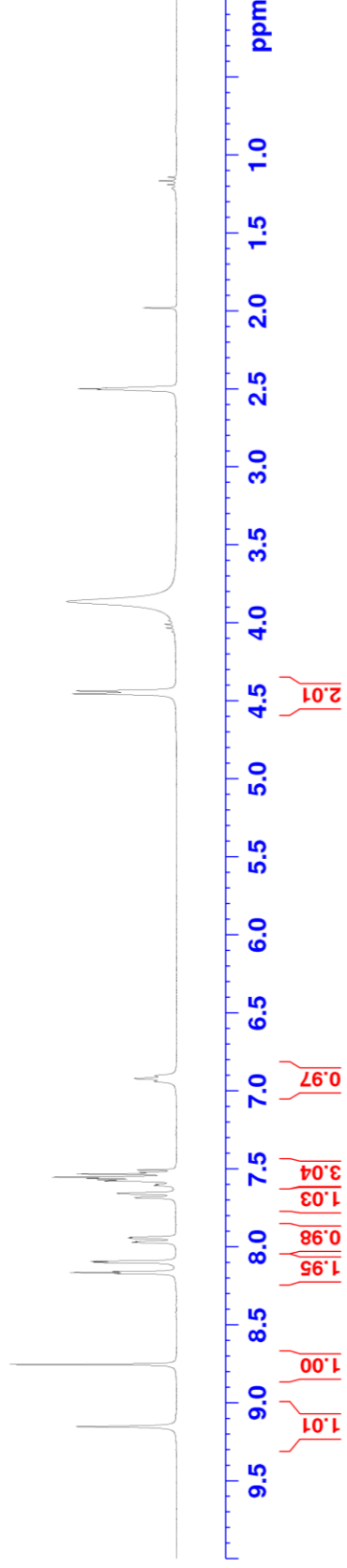
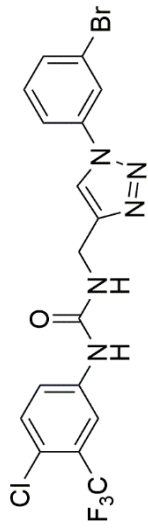
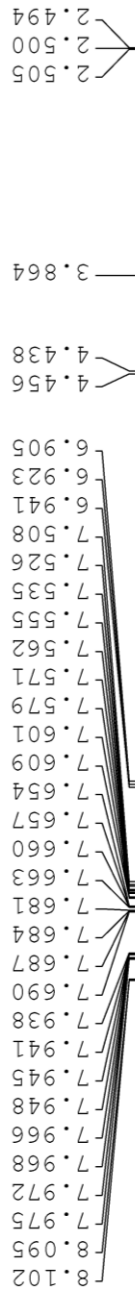
155.27
145.82
140.46
136.72
134.08
132.31
129.37
129.11
128.74
127.68
127.27
126.87
126.47
125.28
125.12
122.87
122.02
122.00
121.51
119.21
117.89
116.79
116.72
116.64
116.57



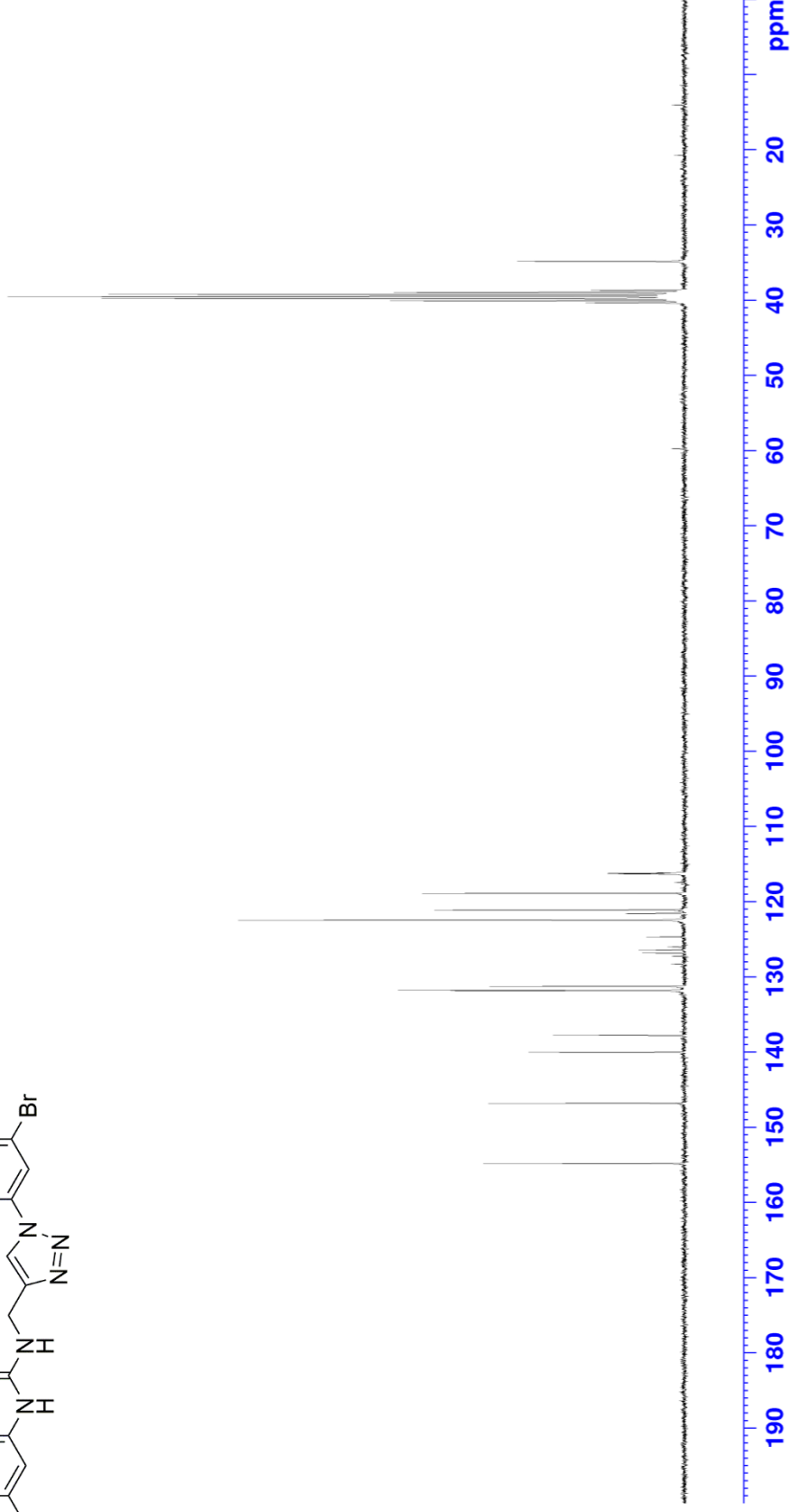
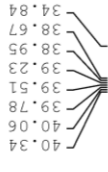
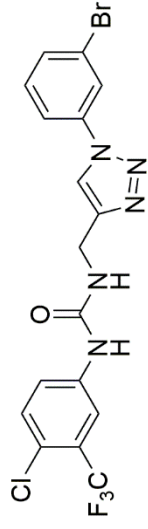
^{19}F NMR of compound **12h** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



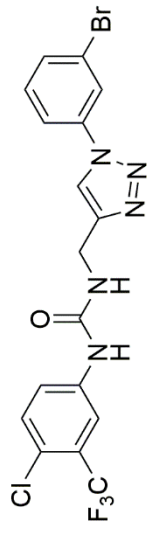
^1H NMR of compound **12i** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



¹³C NMR of compound **12i** (75 MHz, DMSO-*d*₆)



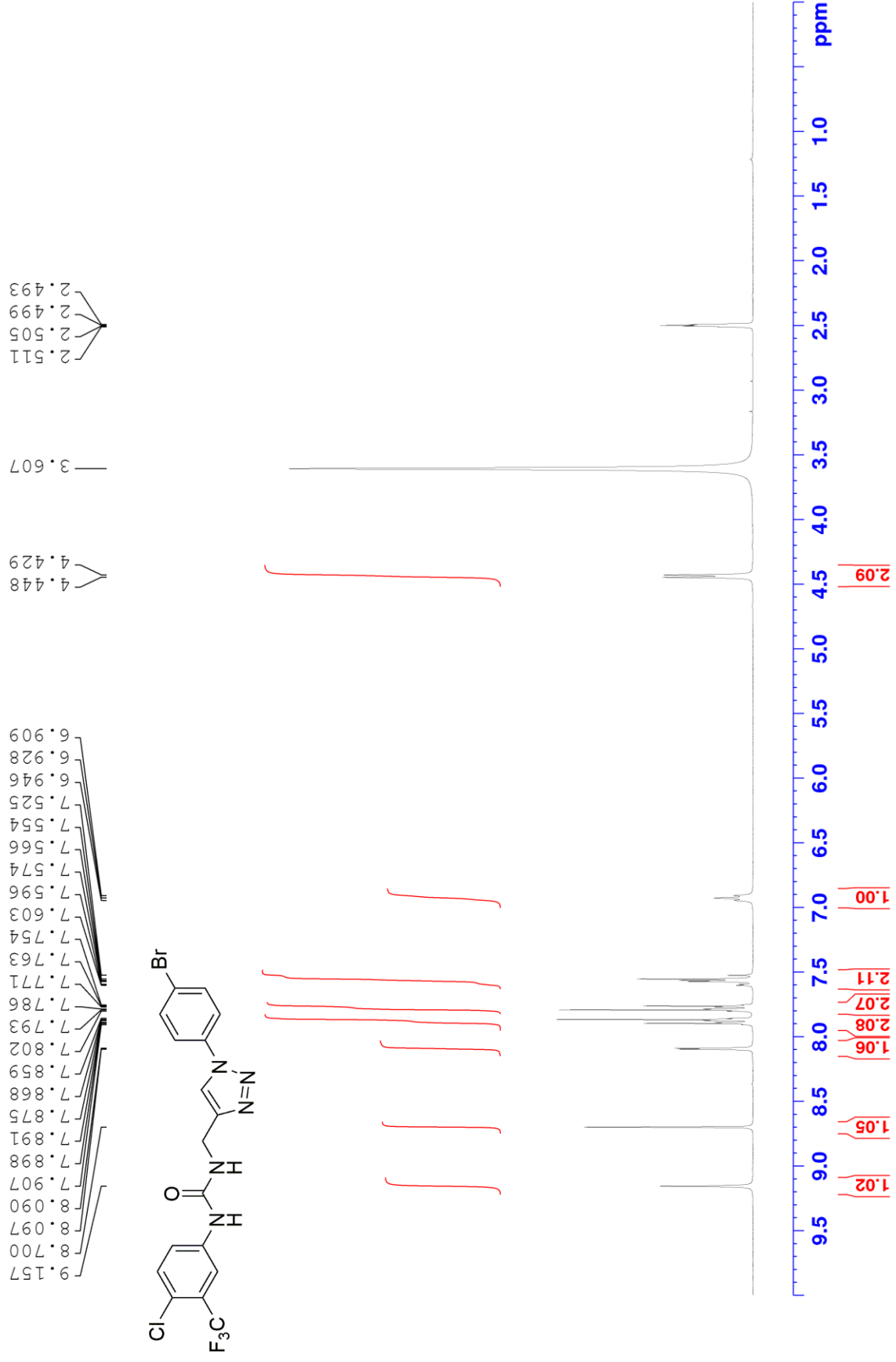
^{19}F NMR of compound **12i** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



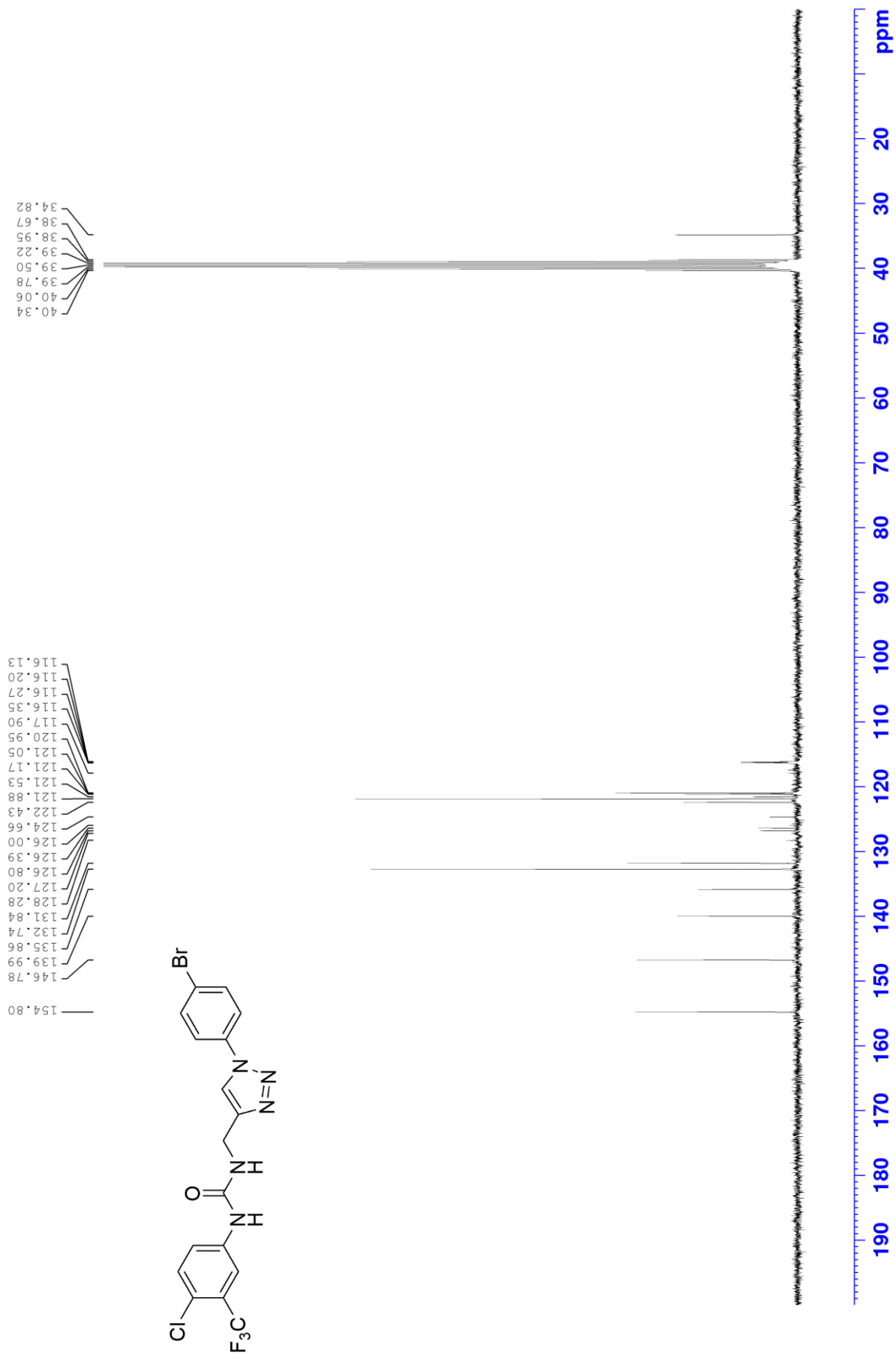
— -76.55
— -63.07



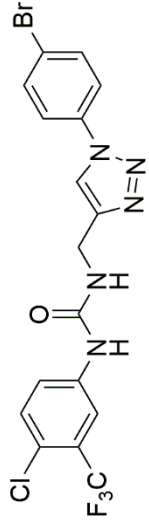
¹H NMR of compound **12j** (300 MHz, DMSO-d₆)



¹³C NMR of compound **12j** (75 MHz, DMSO-d₆)

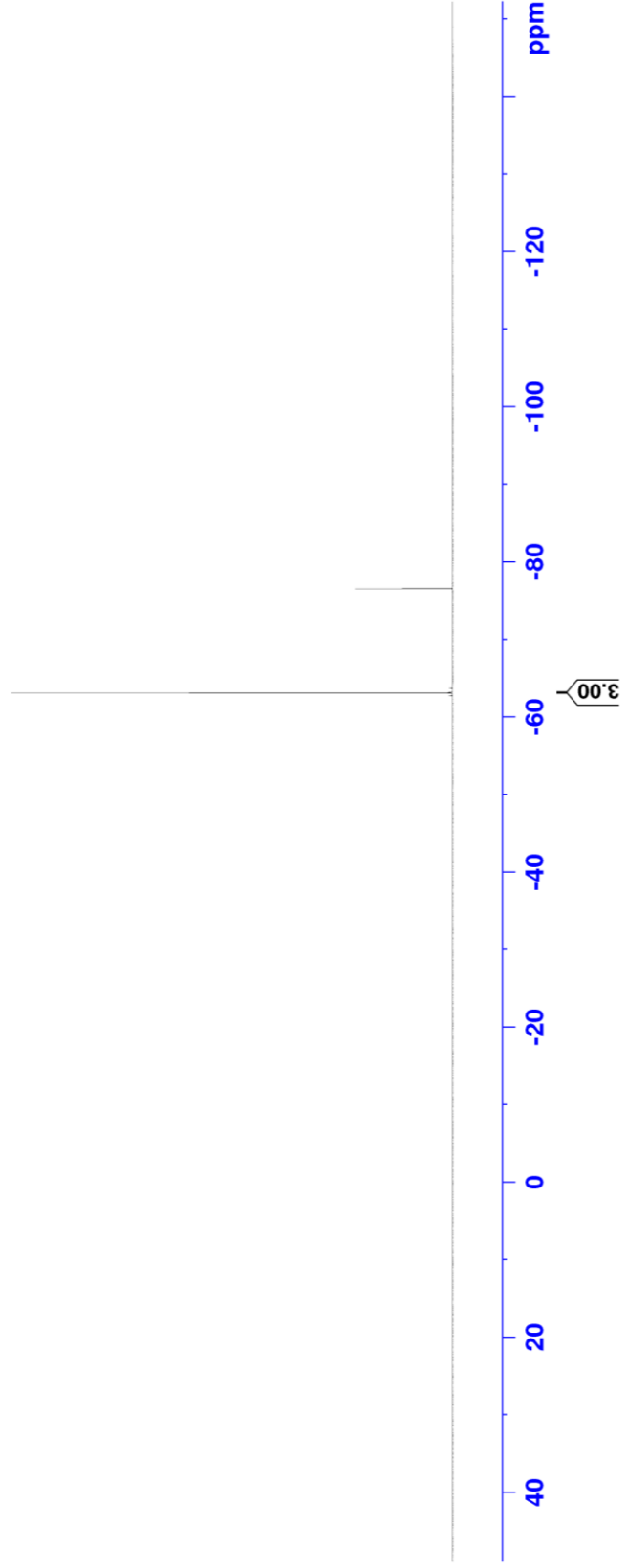


^{19}F NMR of compound **12j** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

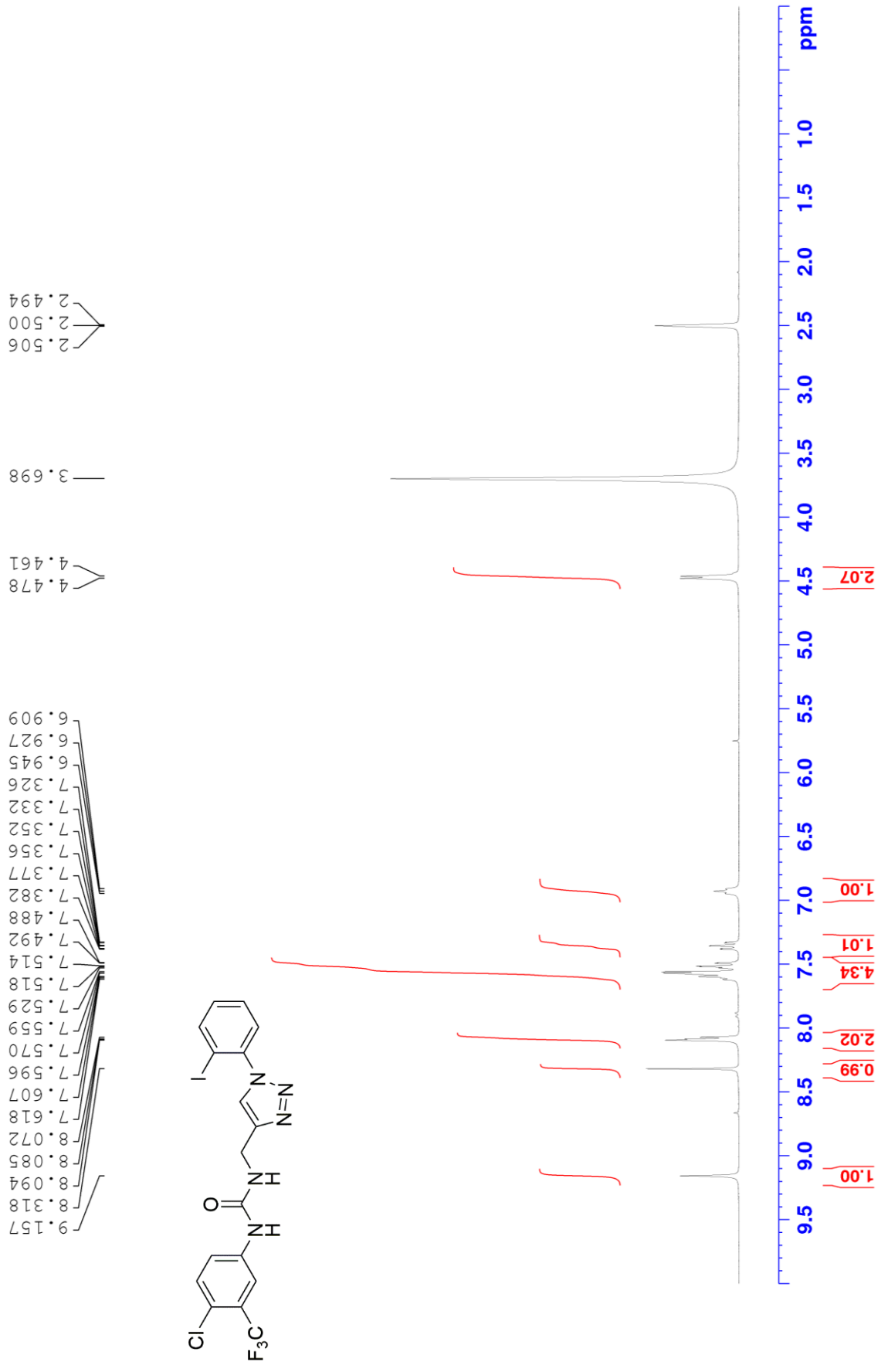


— -63.13

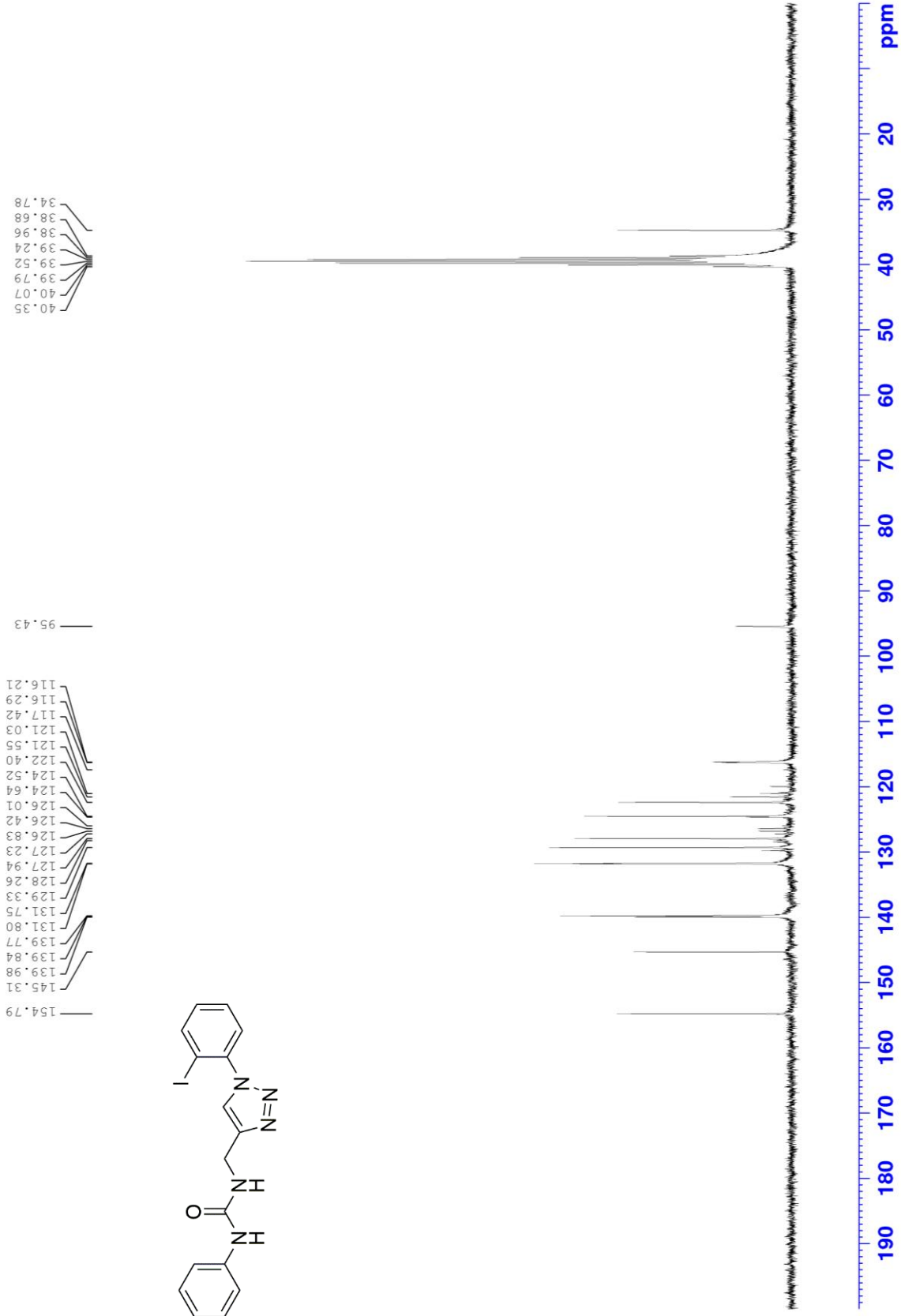
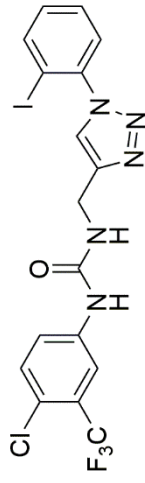
— -76.55



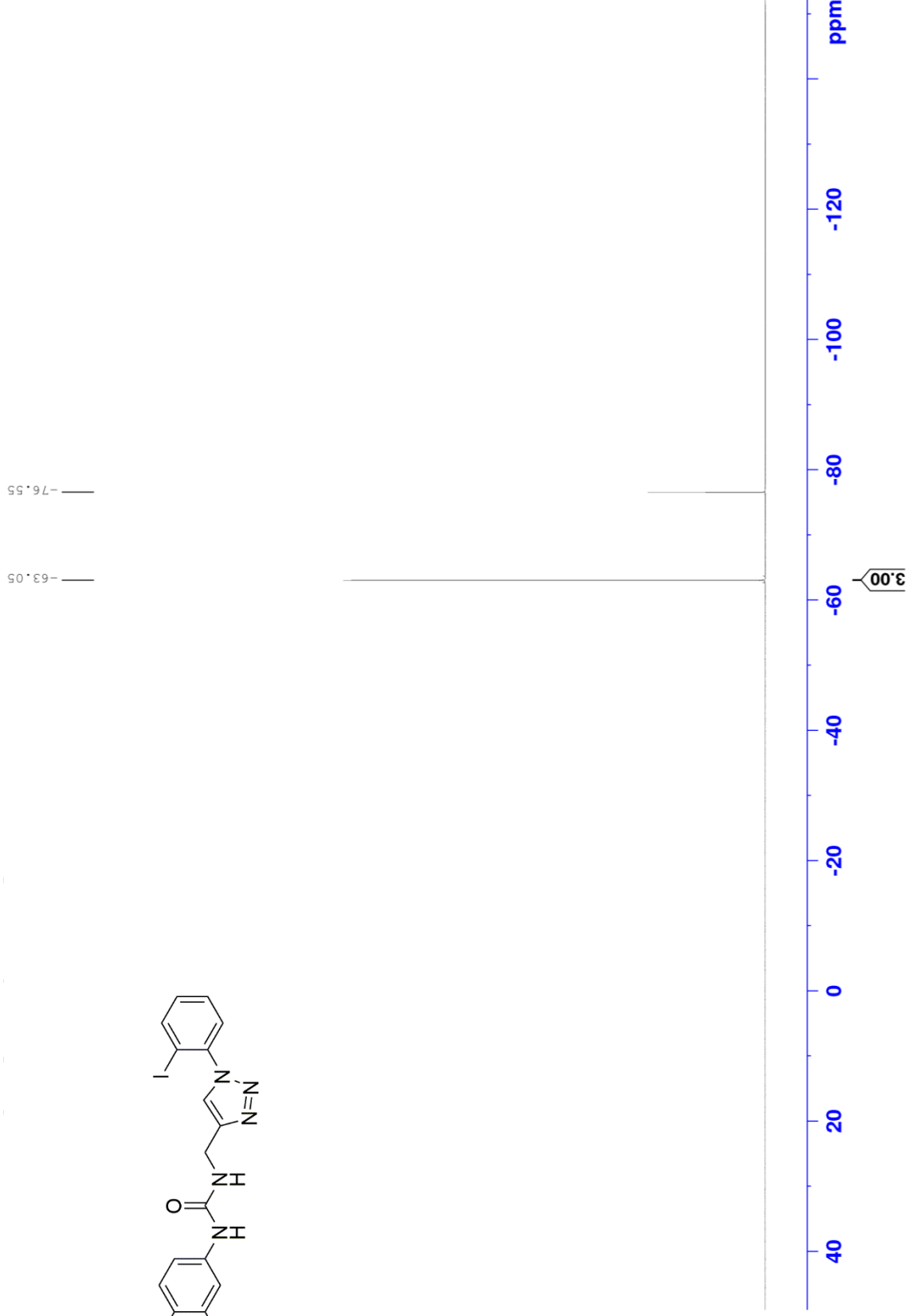
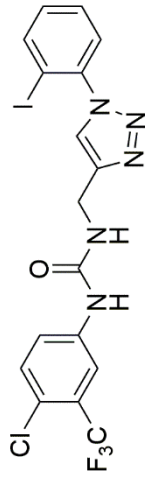
¹H NMR of compound **12k** (300 MHz, DMSO-d₆)



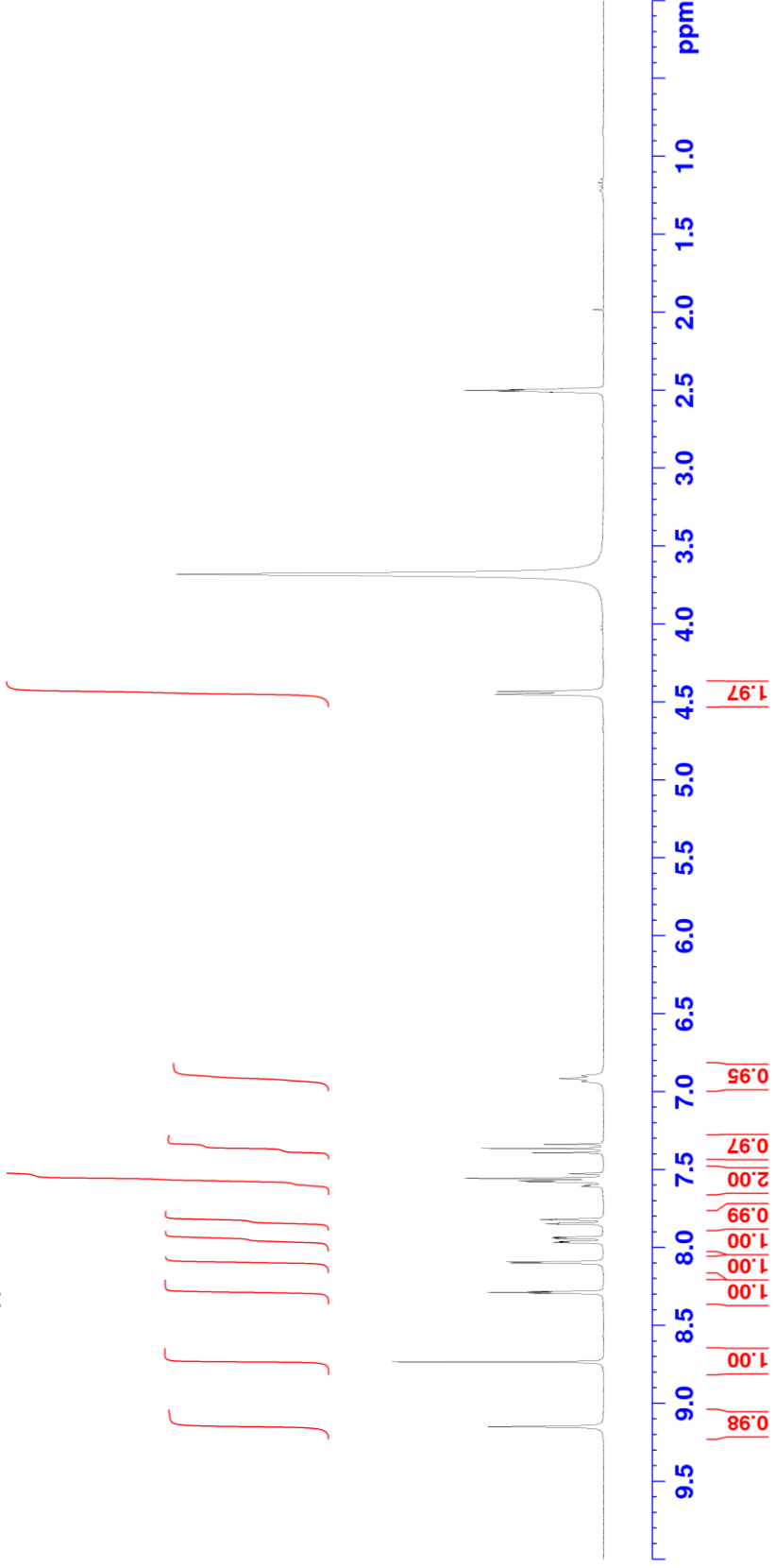
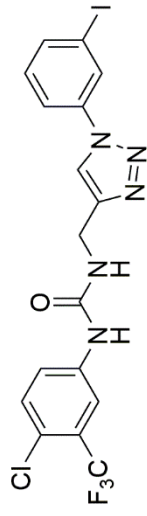
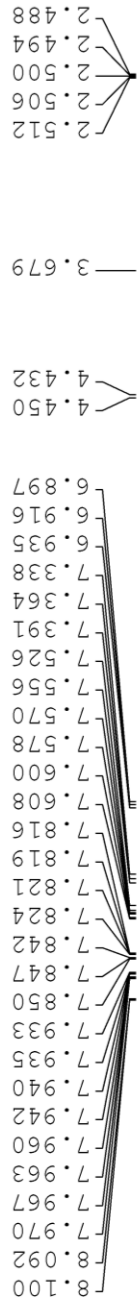
¹³C NMR of compound **12k** (75 MHz, DMSO-d₆)



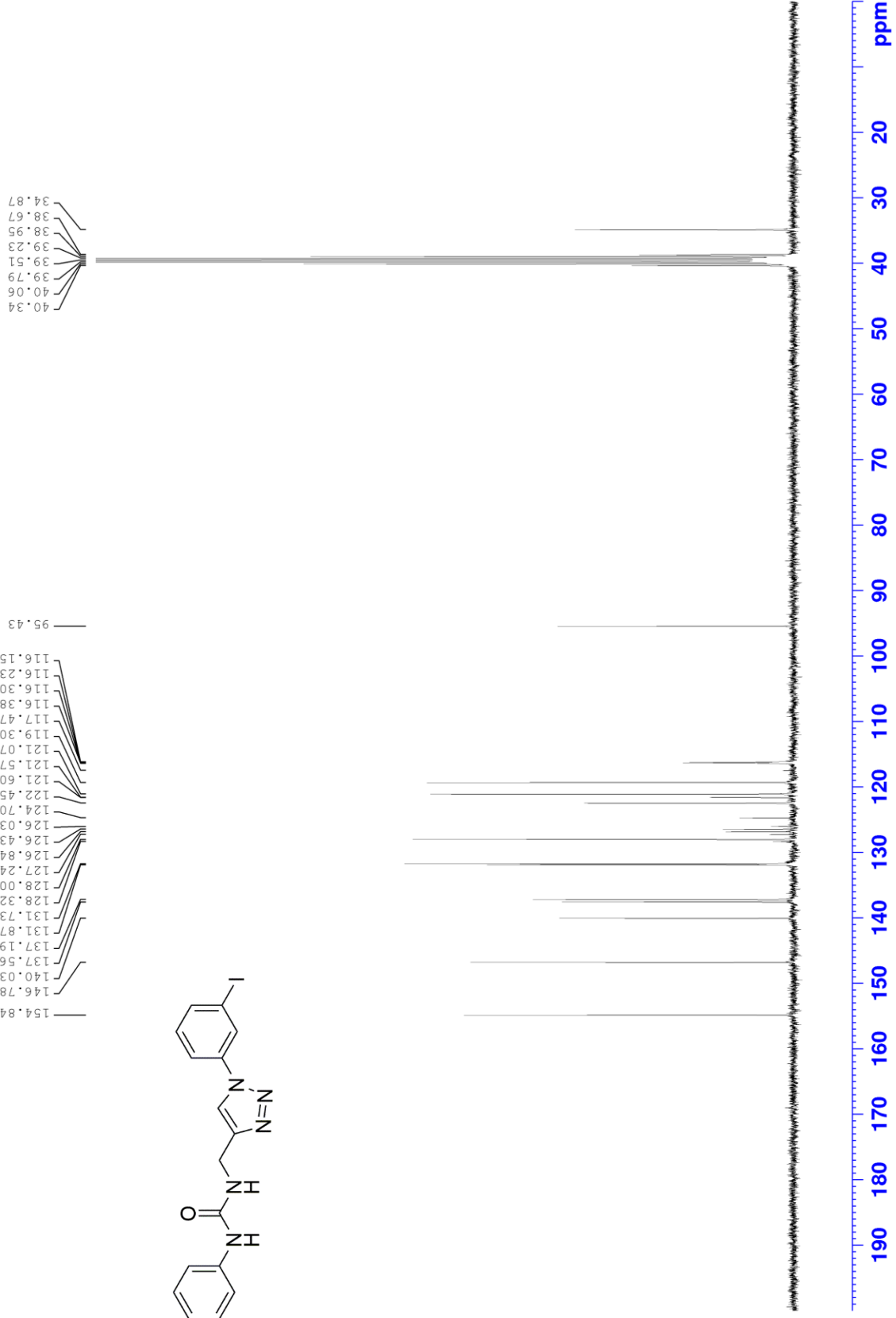
^{19}F NMR of compound **12k** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



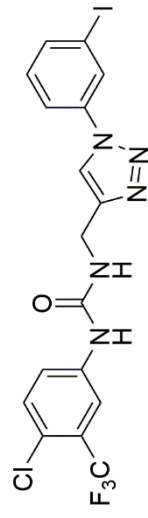
¹H NMR of compound **12l** (300 MHz, DMSO-d₆)



^{13}C NMR of compound **12l** (75 MHz, DMSO-d_6)

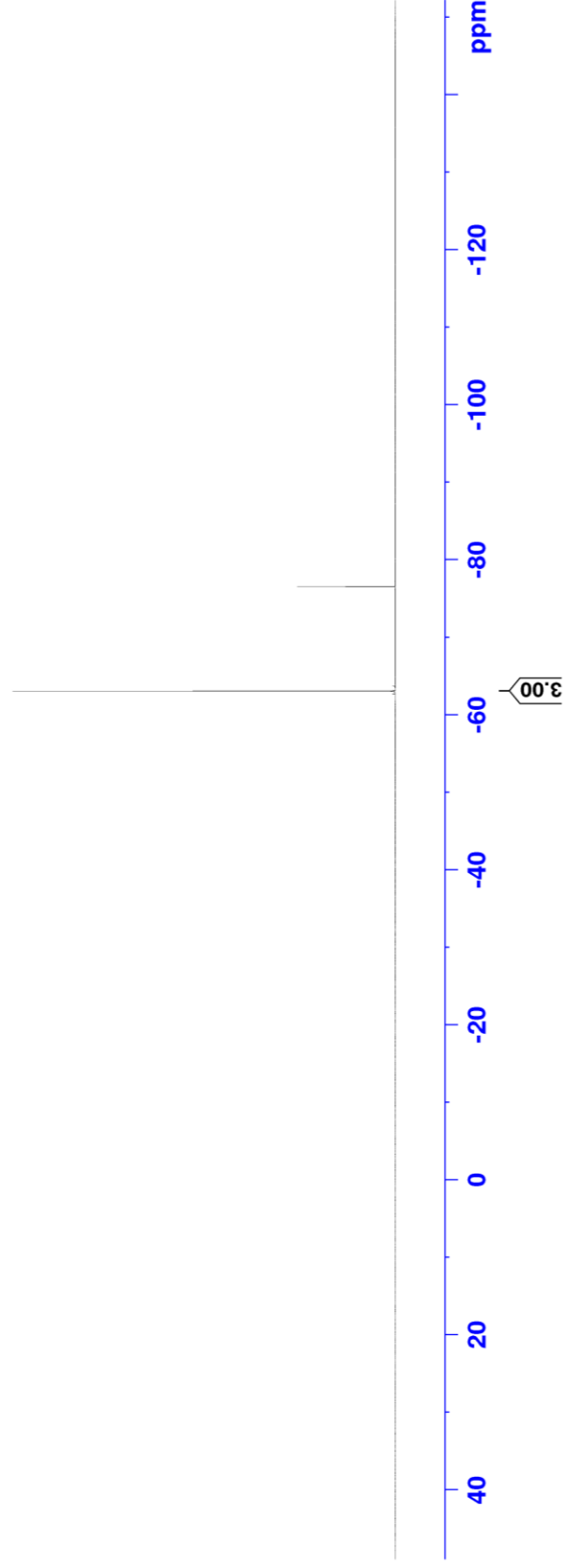


^{19}F NMR of compound **12c** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



— -63.07

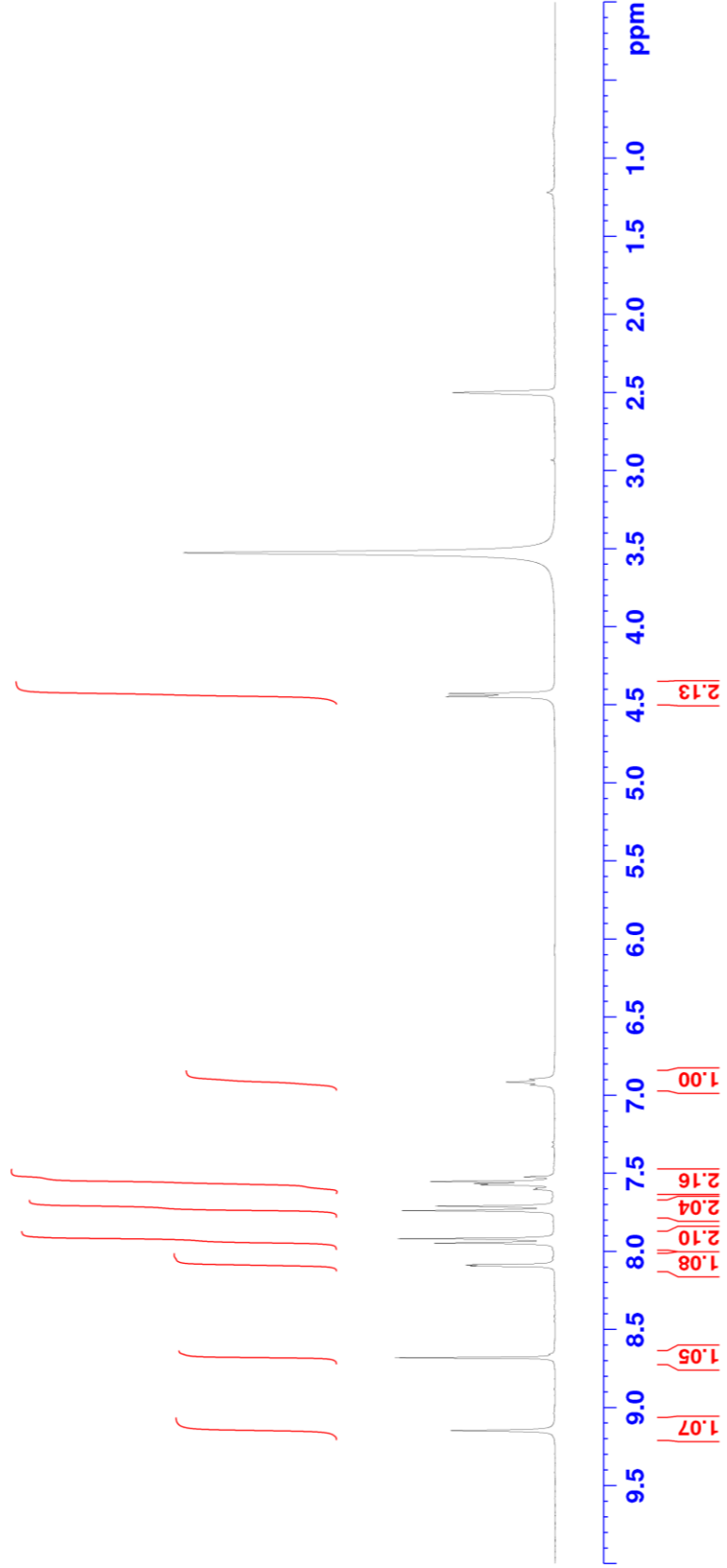
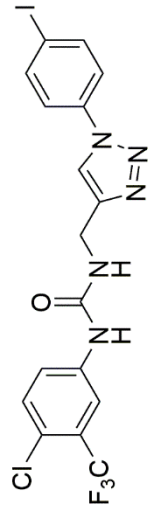
— -76.55



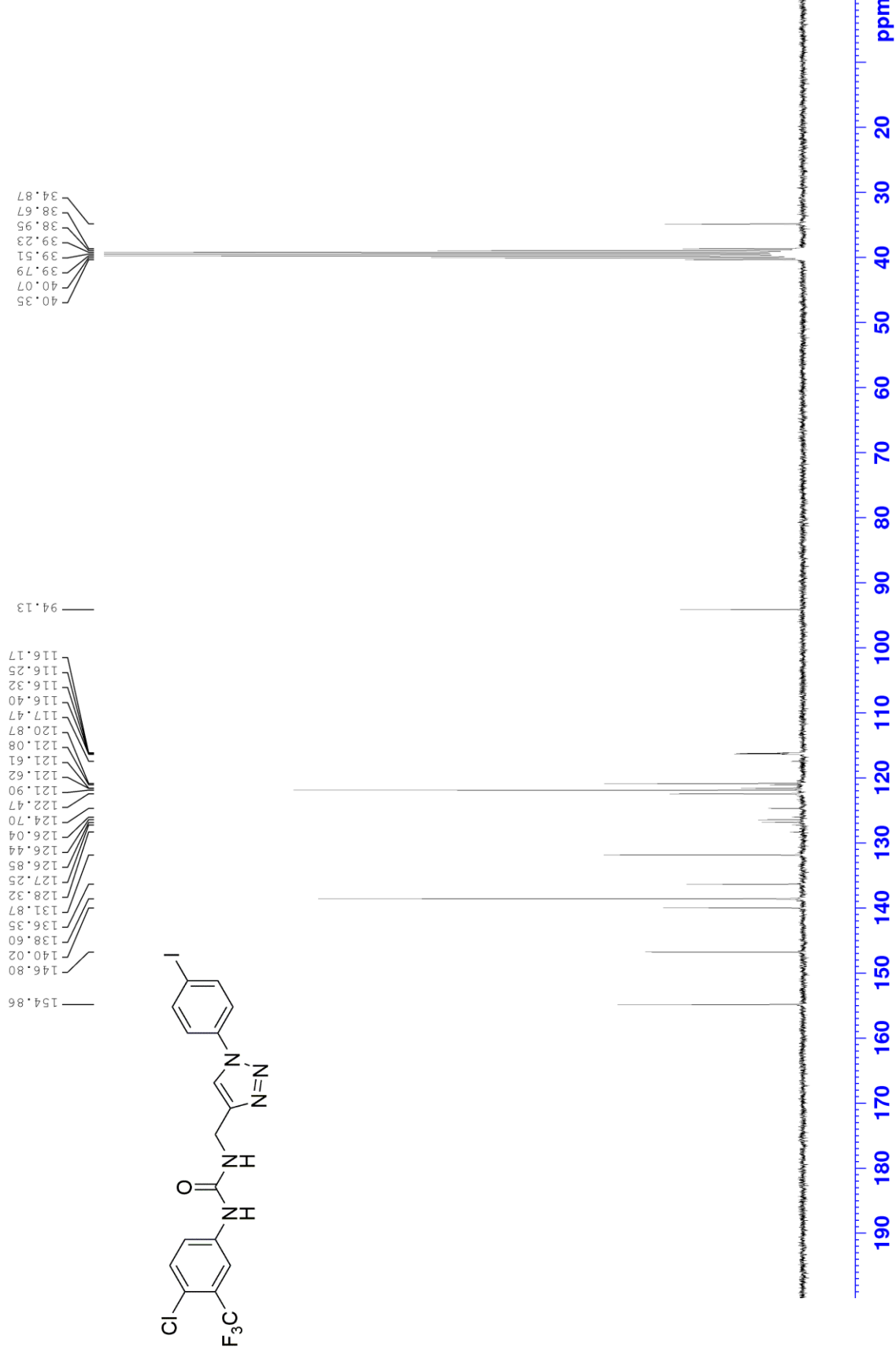
^1H NMR of compound **12m** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

9.149
8.682
8.658
8.094
8.087
7.948
7.919
7.740
7.711
7.604
7.597
7.574
7.567
7.553
7.524
6.935
6.917
6.898

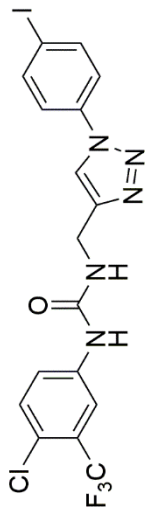
4.447
4.429
3.527
2.506
2.500
2.494



¹³C NMR of compound 12m (75 MHz, DMSO-d₆)



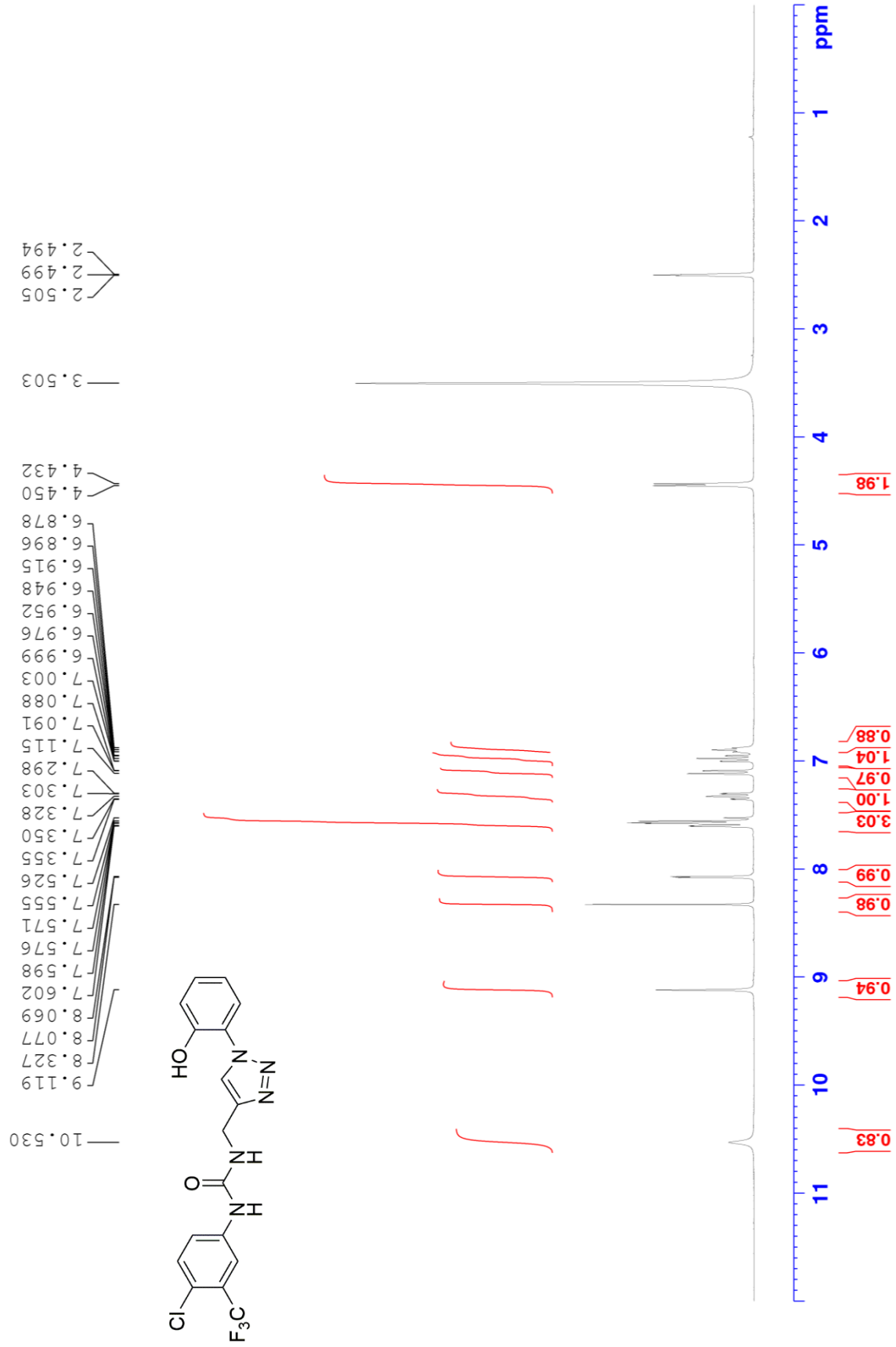
^{19}F NMR of compound **12m** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



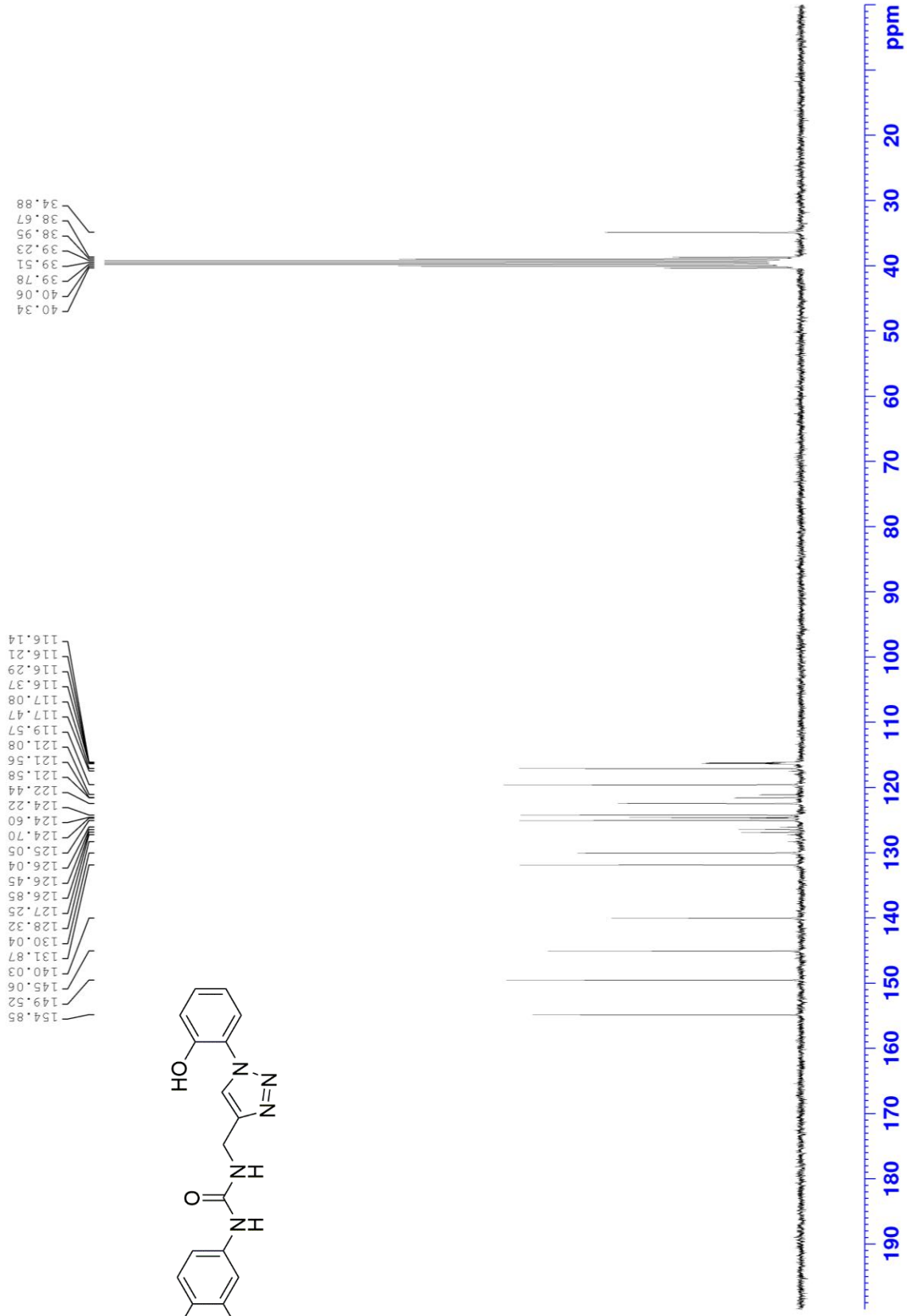
— -76.55
— -63.26



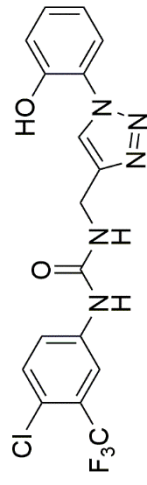
^1H NMR of compound **12n** (300 MHz, DMSO-d_6)



^{13}C NMR of compound **12h** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



^{19}F NMR of compound **12n** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

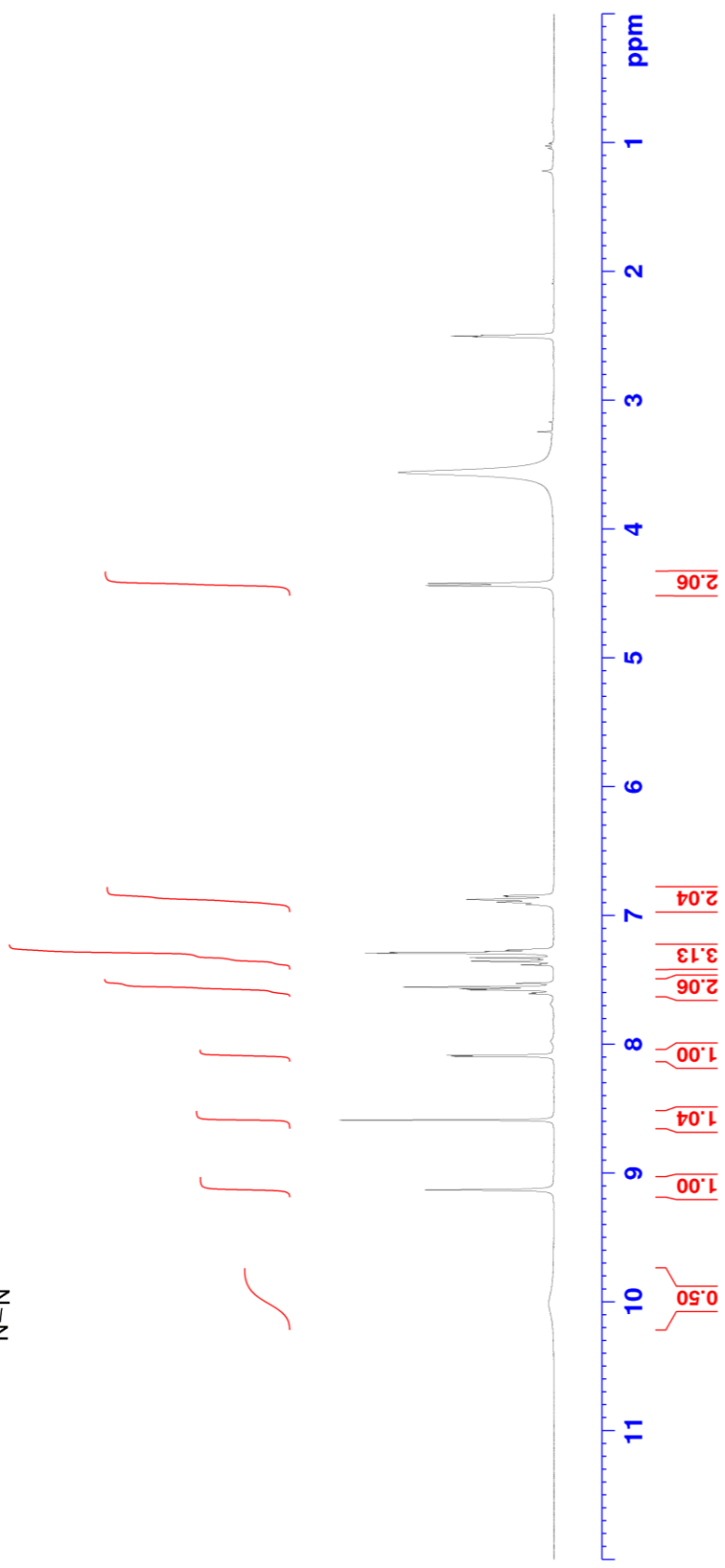
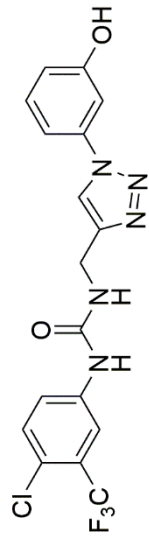
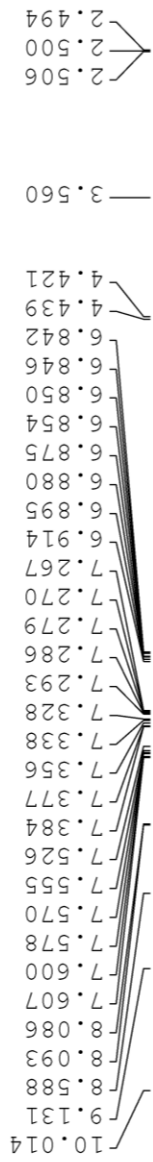


— -76.55

— -63.28

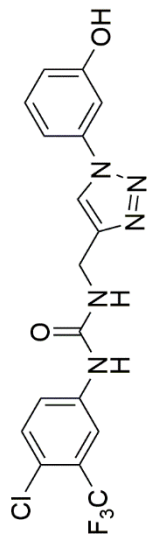


¹H NMR of compound **12o** (300 MHz, DMSO-d₆)

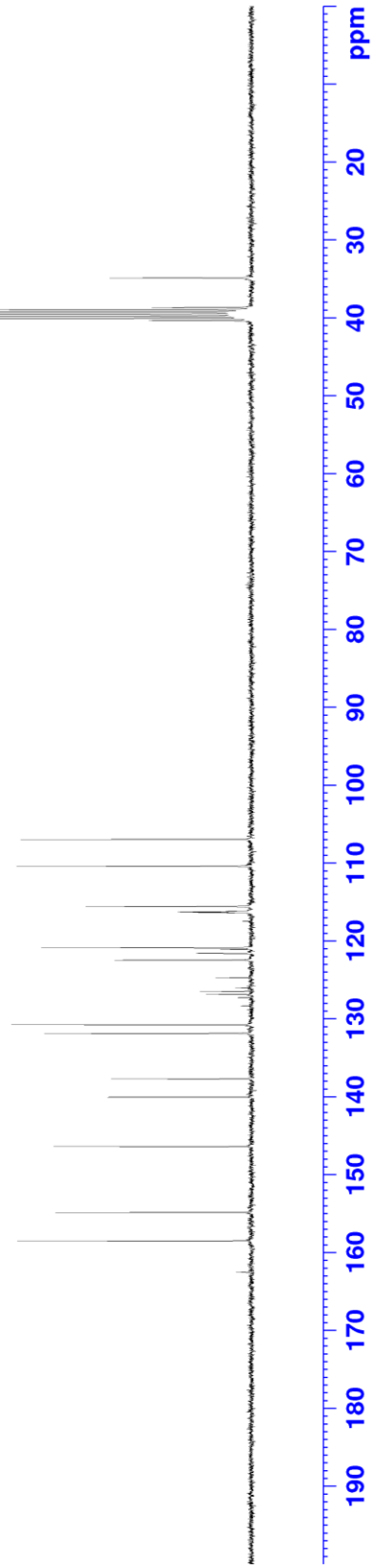


¹³C NMR of compound **12o** (75 MHz, DMSO-d₆)

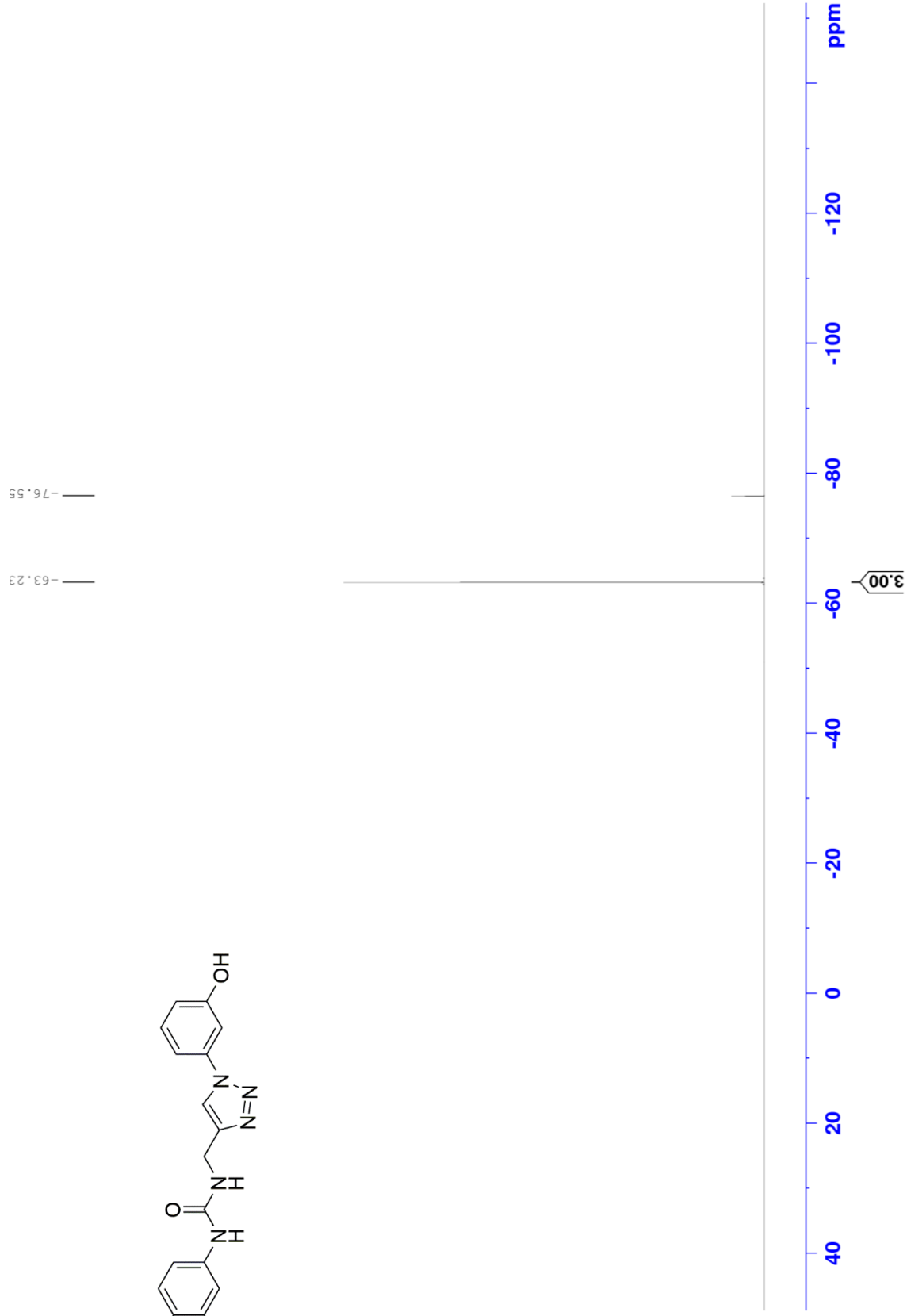
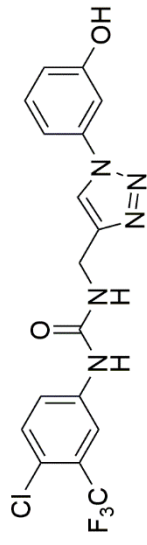
158.49
154.84
146.38
140.04
137.69
131.86
130.76
128.32
127.26
126.85
126.45
126.05
124.71
122.45
121.60
121.57
121.09
120.88
117.47
116.39
116.31
116.24
116.16
115.57
110.40
106.96



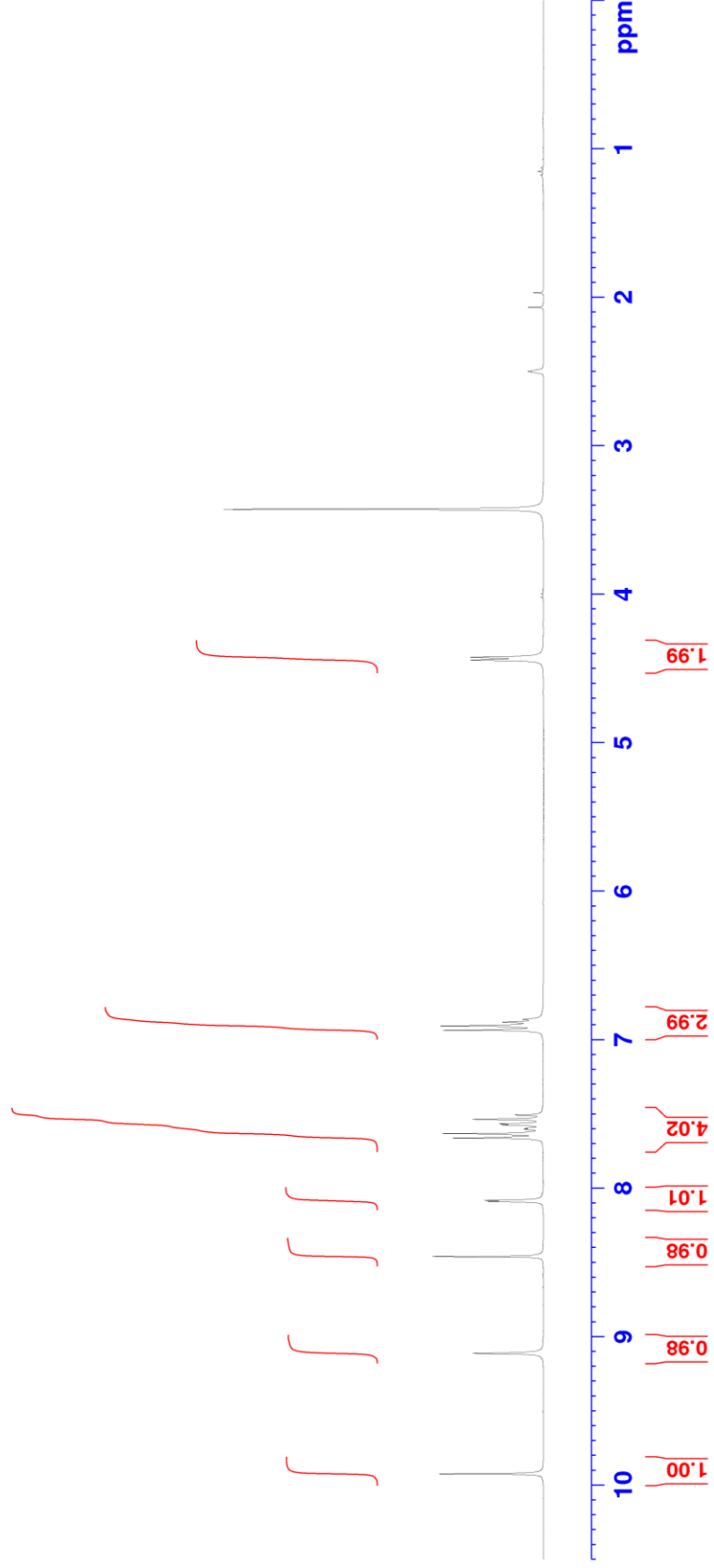
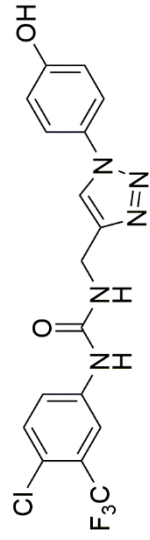
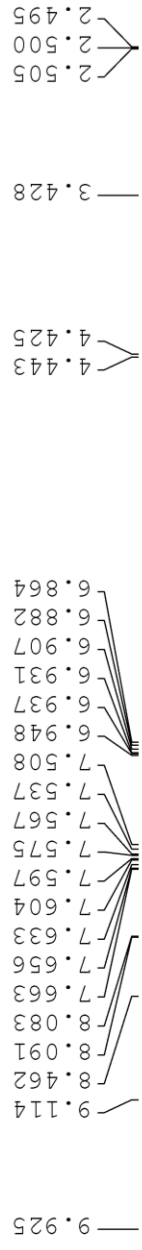
40.34
40.06
39.79
39.51
39.23
38.95
38.67
34.88



^{19}F NMR of compound **12o** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



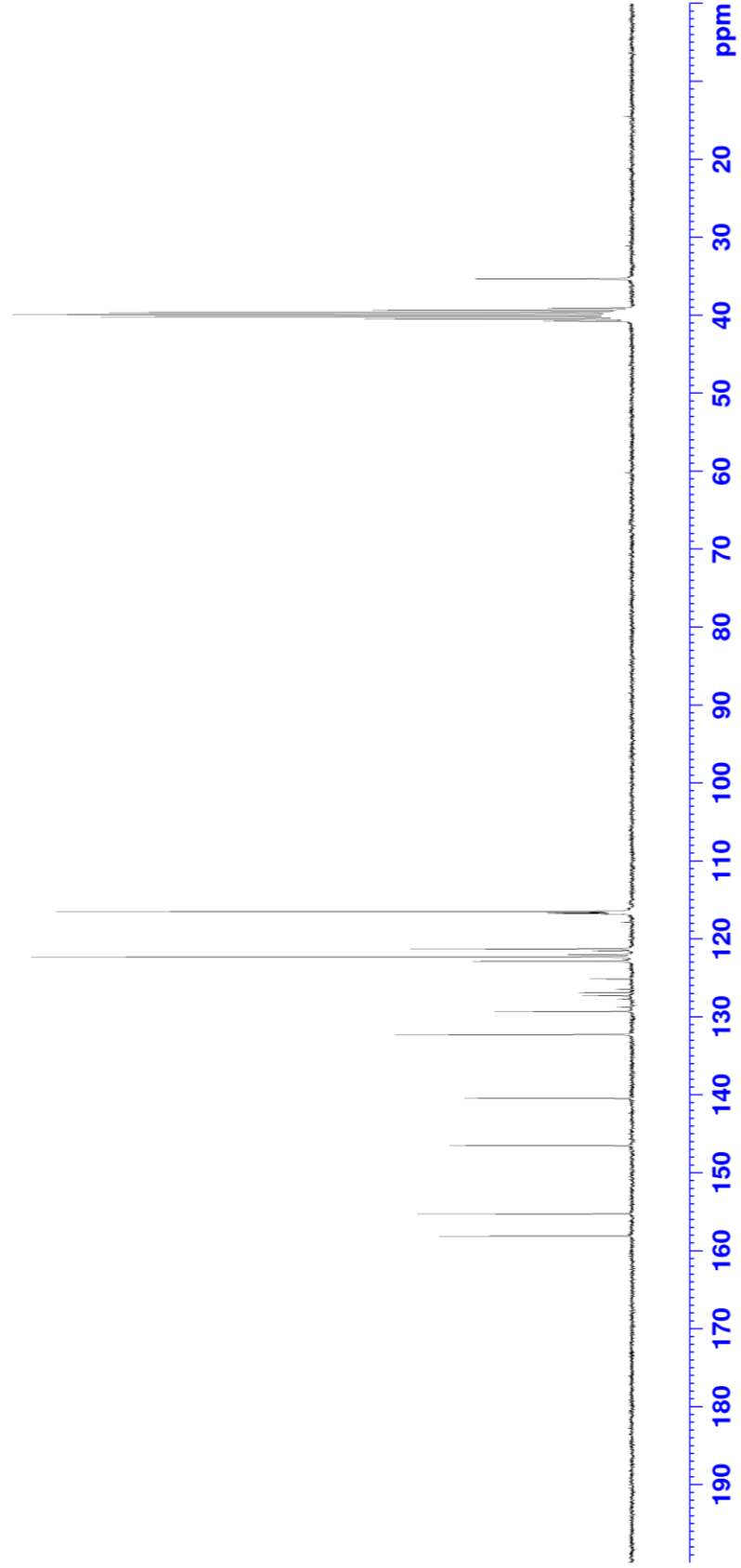
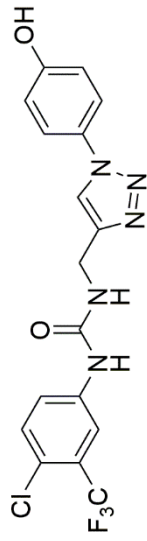
^1H NMR of compound **12p** (300 MHz, DMSO- d_6)



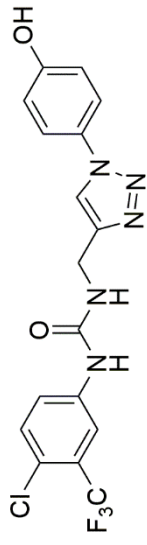
^{13}C NMR of compound **12p** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

40.76
40.48
40.20
39.92
39.64
39.36
39.09
35.33

158.13
155.26
146.52
140.45
132.27
129.31
128.74
127.69
127.29
126.88
126.48
125.13
122.86
122.31
122.03
122.01
121.51
121.26
117.90
116.81
116.74
116.66
116.58
116.48



^{19}F NMR of compound **12p** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

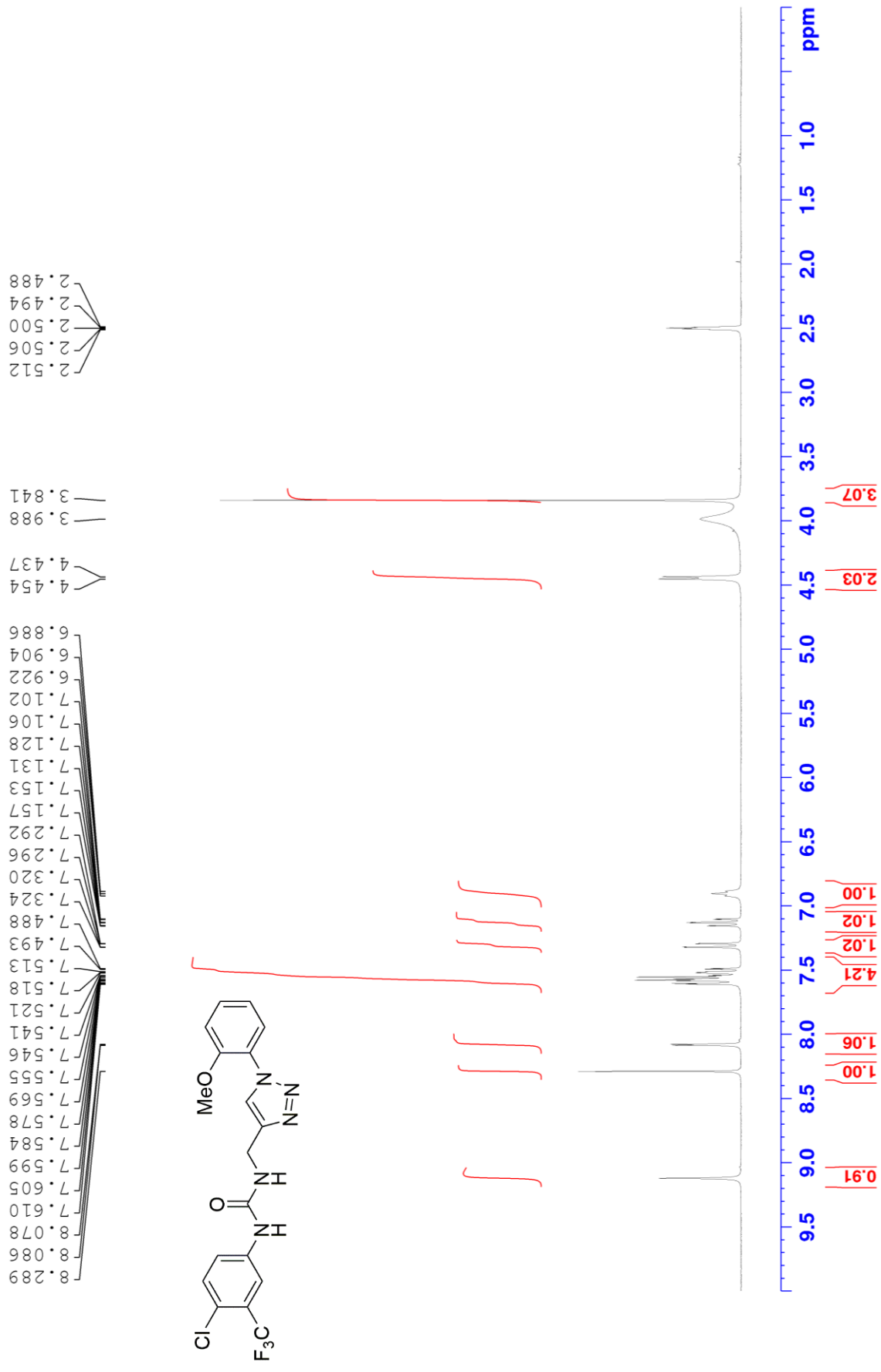


— -63.47

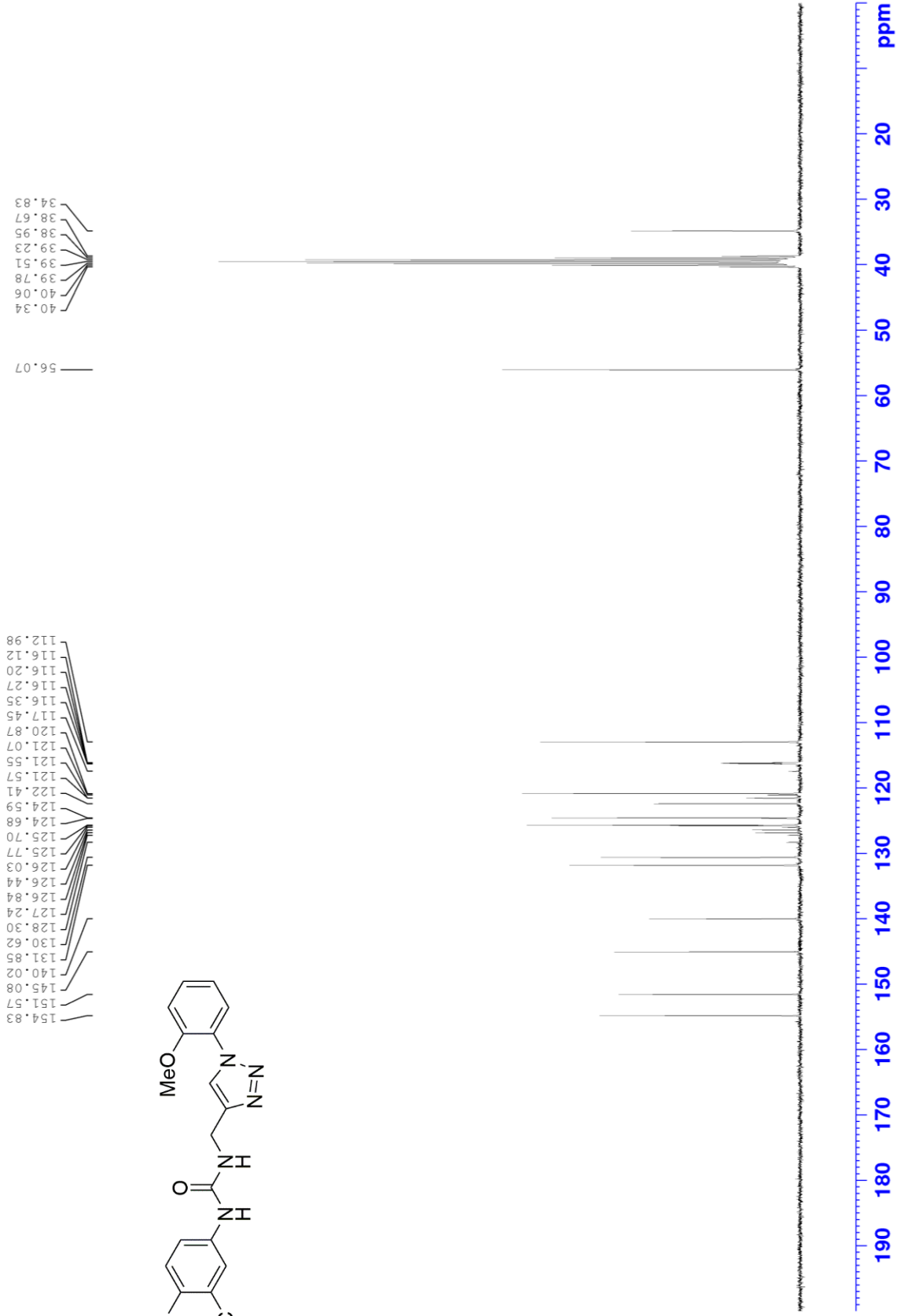
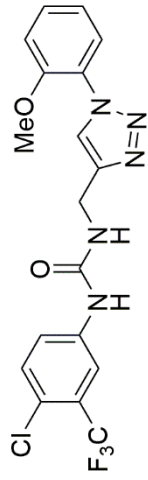
— -76.55



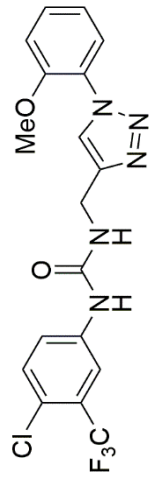
¹H NMR of compound **12q** (300 MHz, DMSO-d₆)



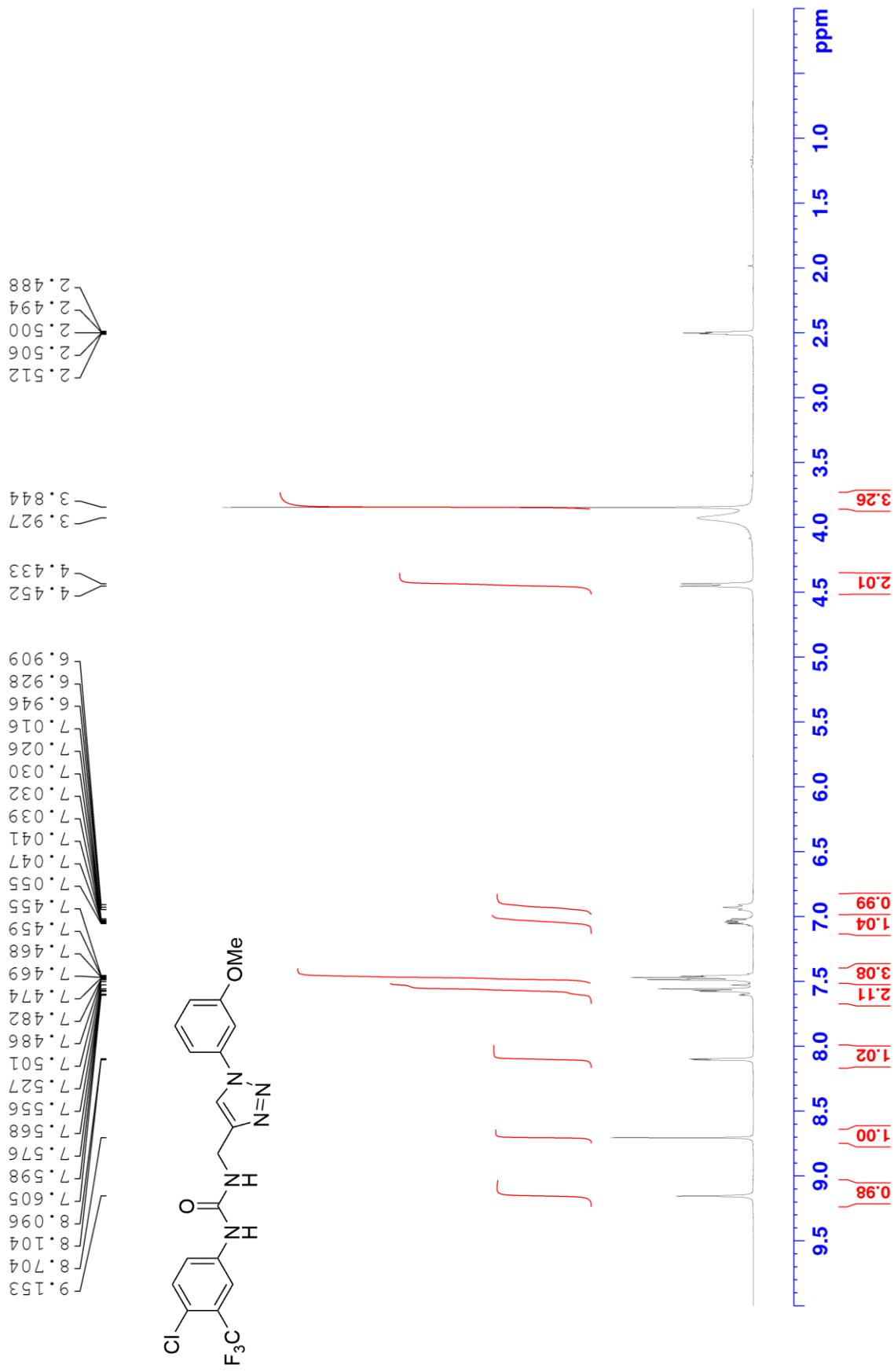
^{13}C NMR of compound **12q** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



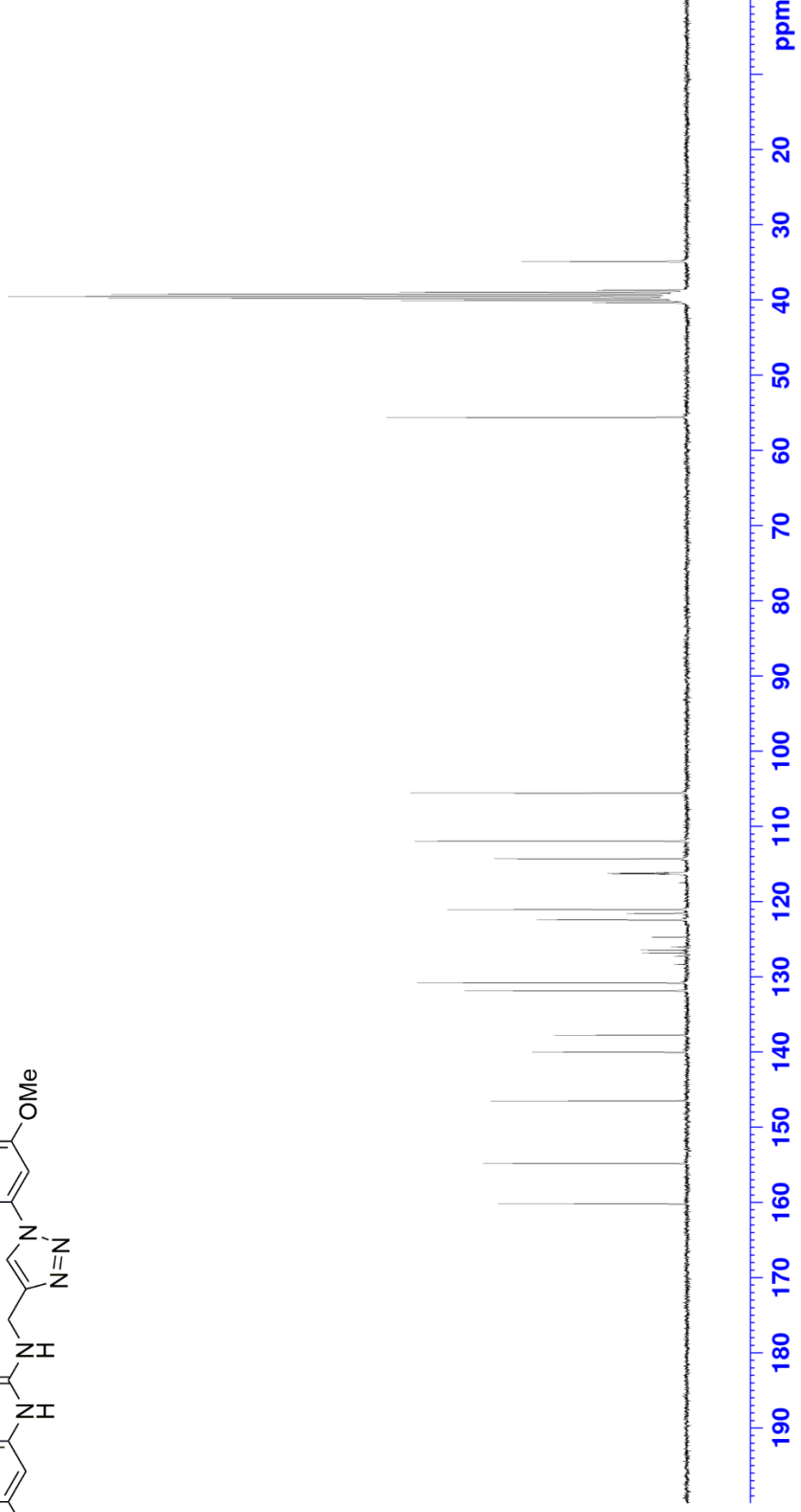
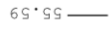
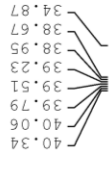
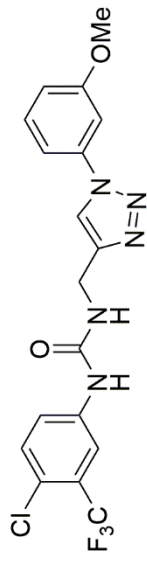
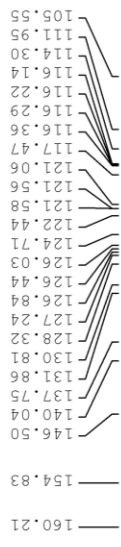
^{19}F NMR of compound **12q** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



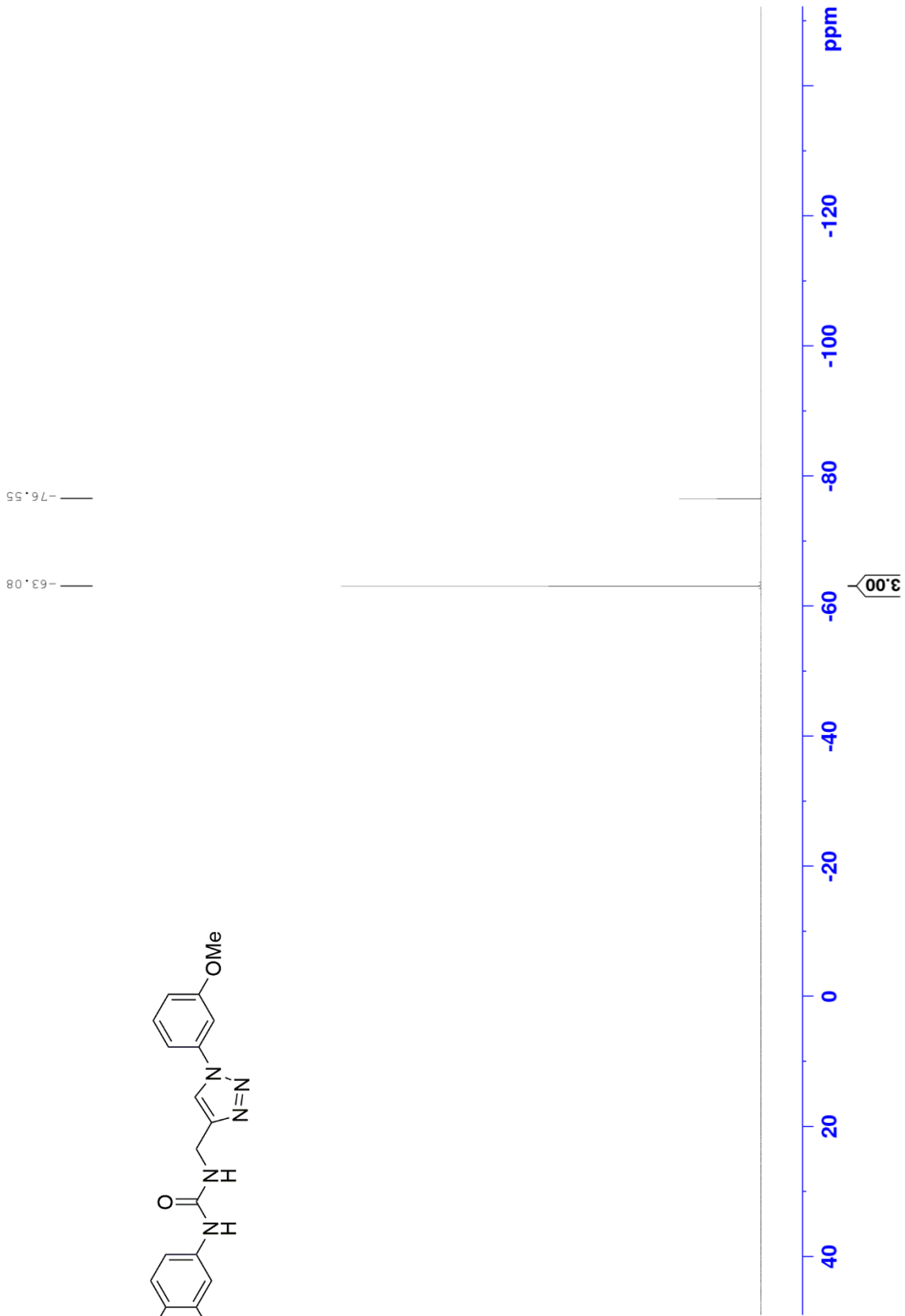
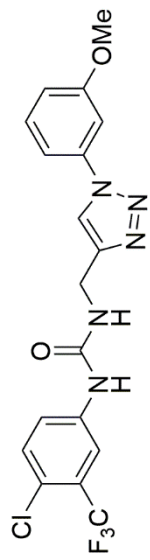
¹H NMR of compound **12r** (300 MHz, DMSO-d₆)



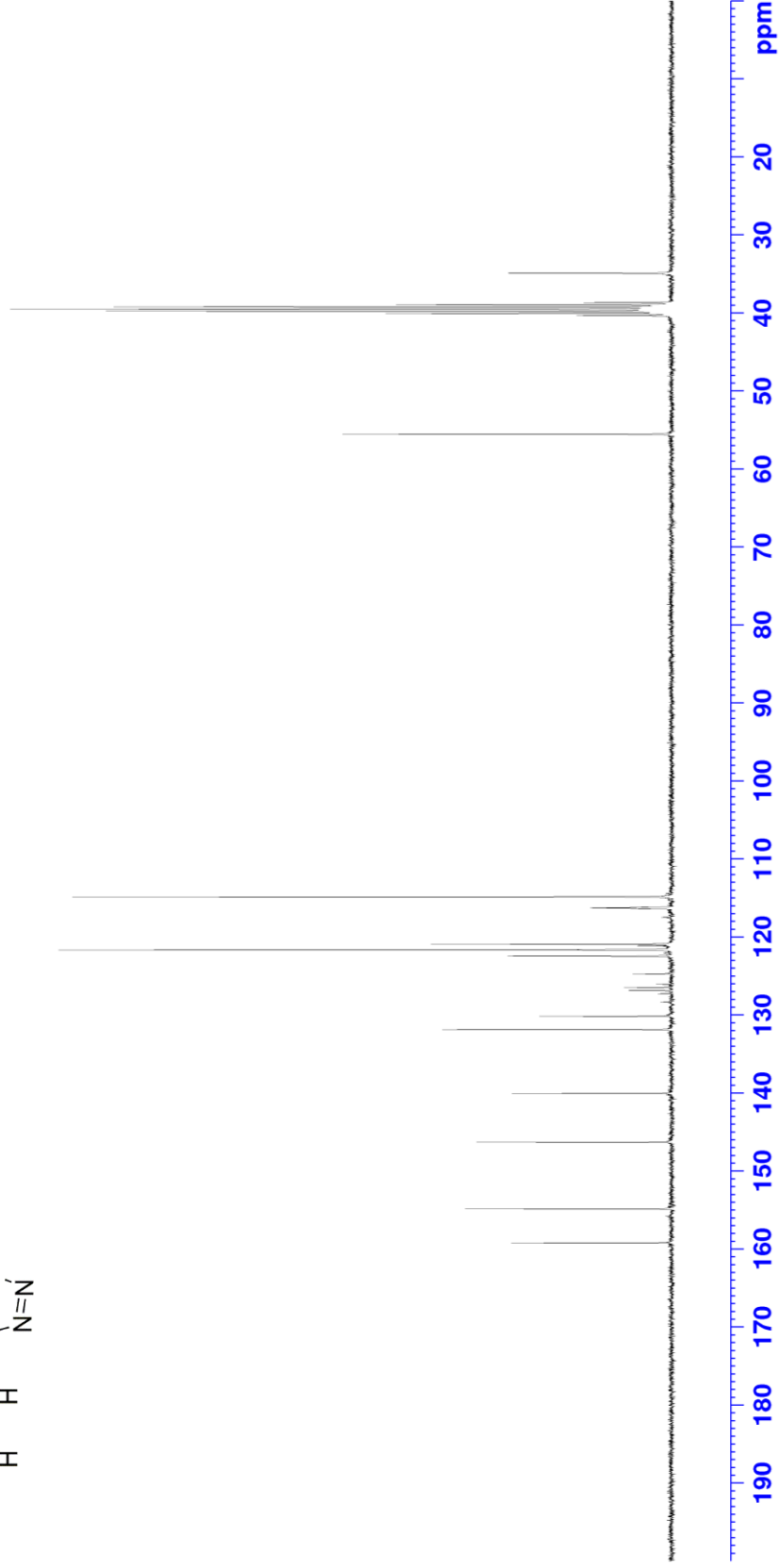
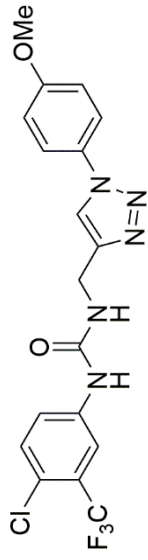
¹³C NMR of compound **12r** (75 MHz, DMSO-d₆)



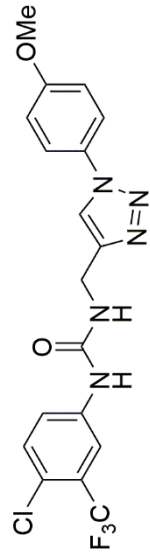
^{19}F NMR of compound **12r** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



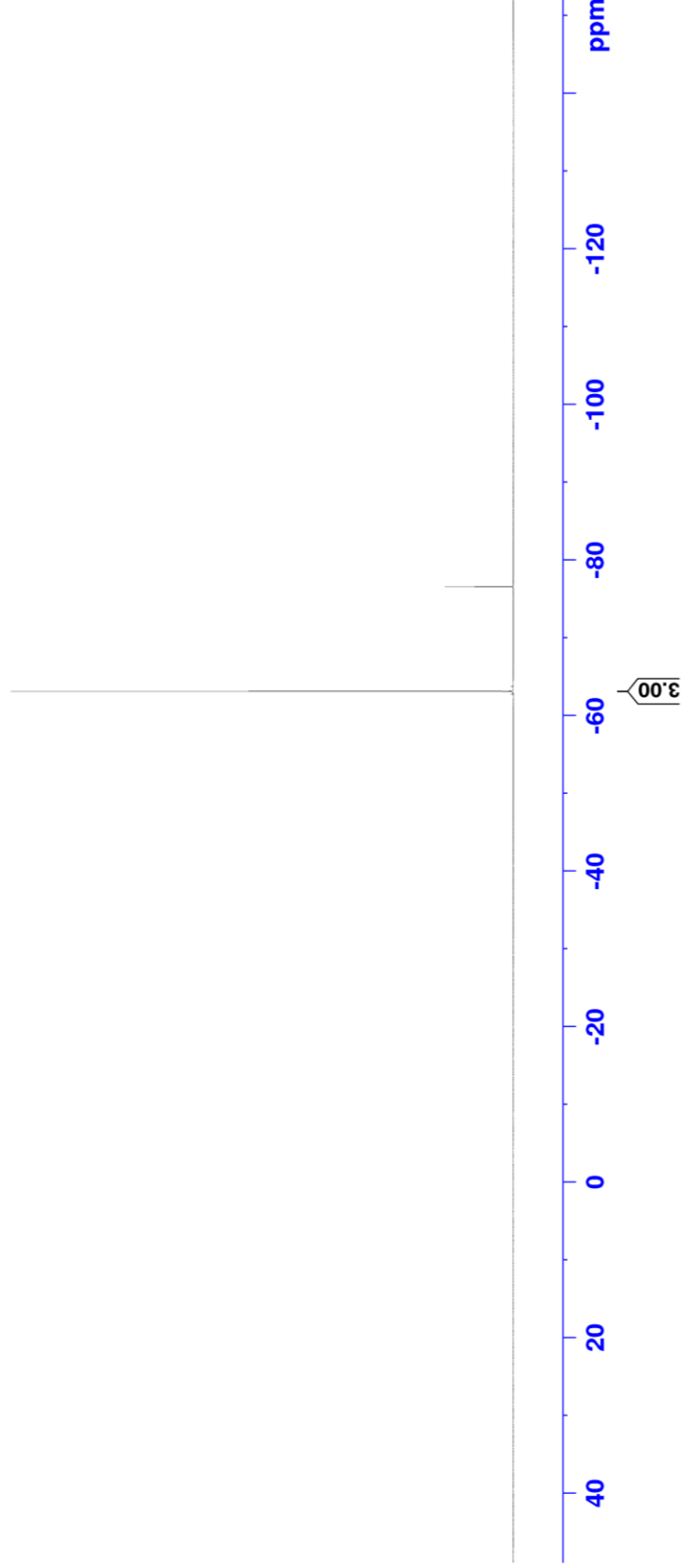
¹³C NMR of compound **12s** (75 MHz, DMSO-d₆)



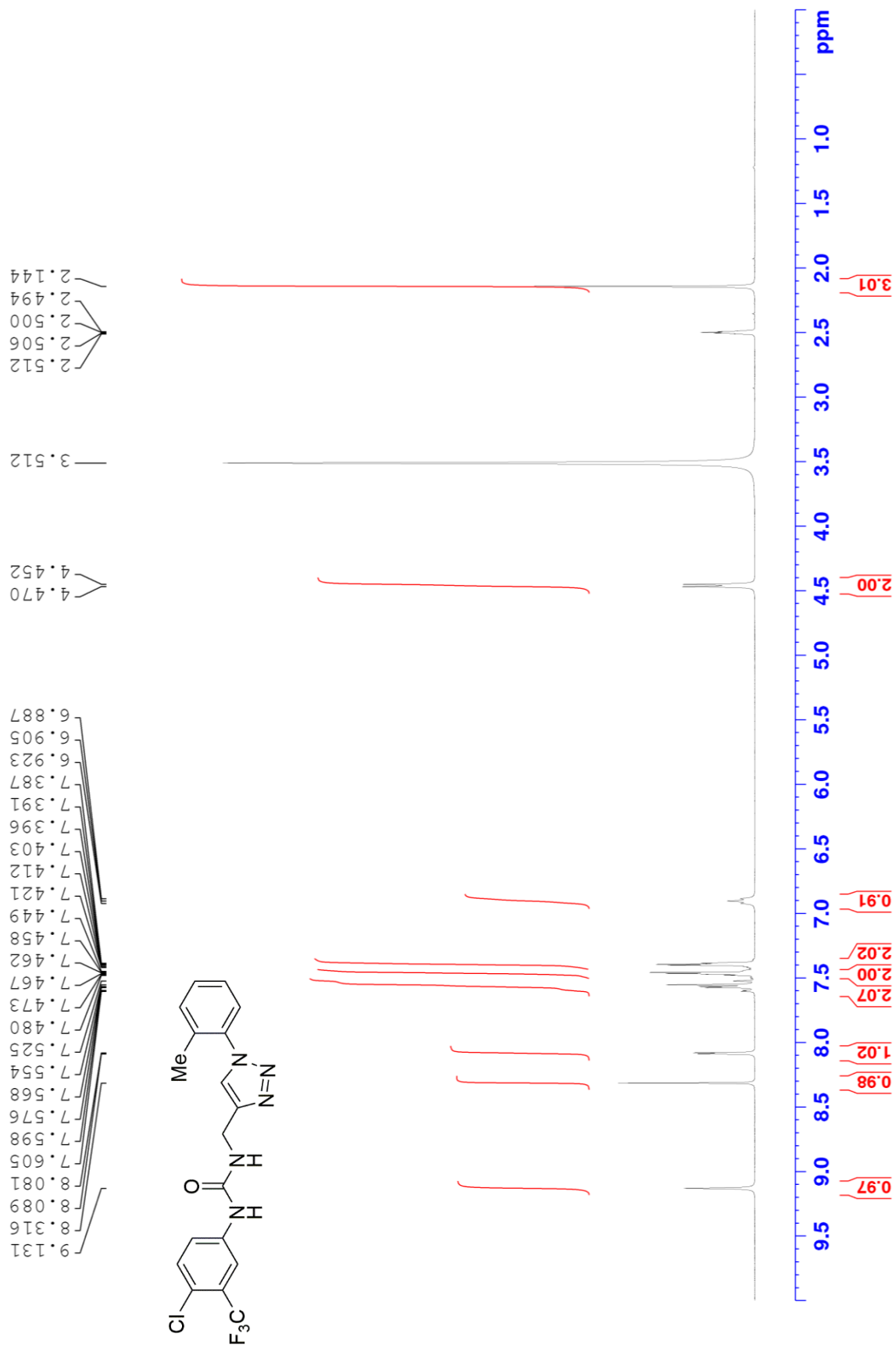
^{19}F NMR of compound **12s** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



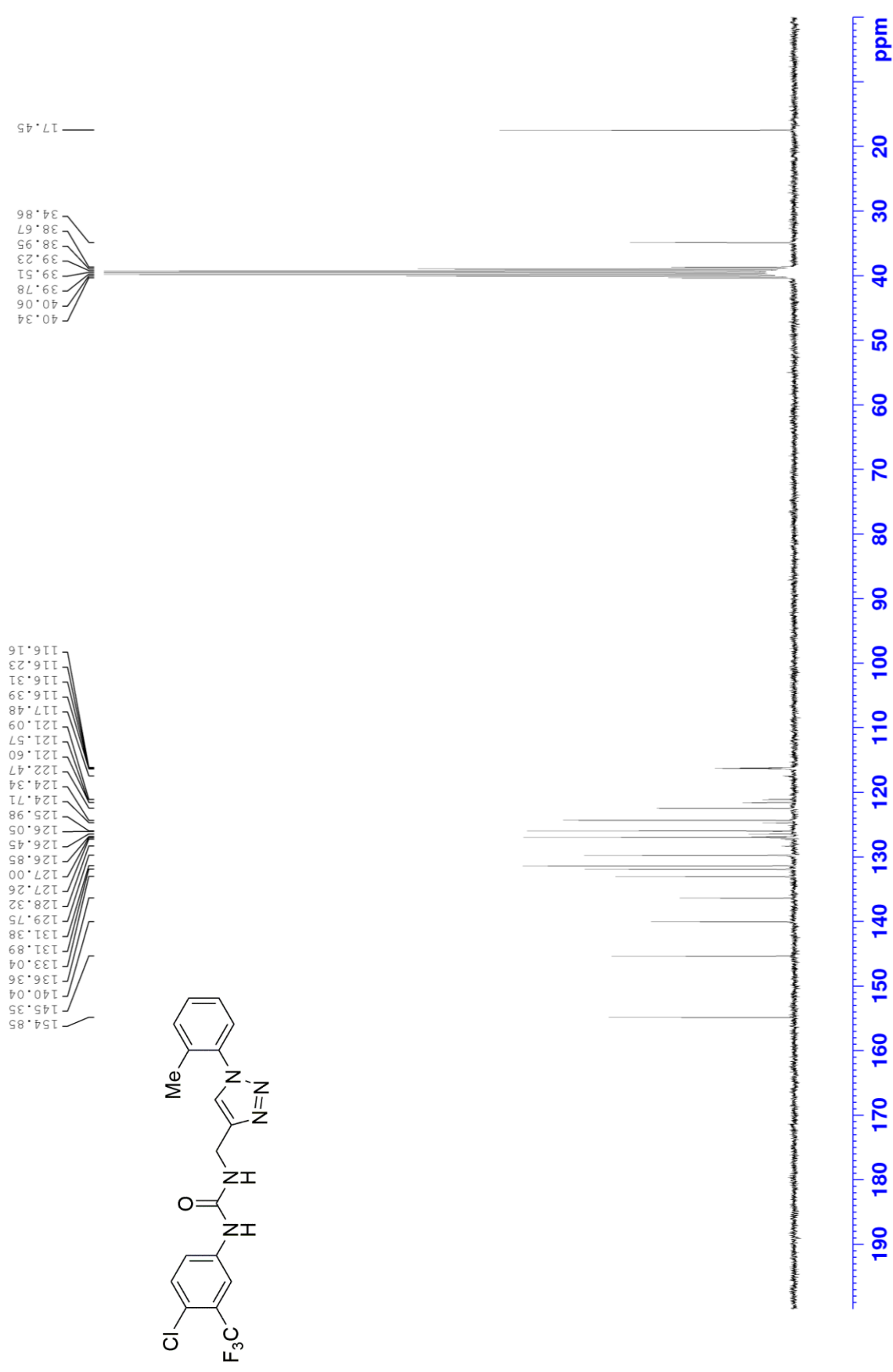
— -76.55
— -63.08



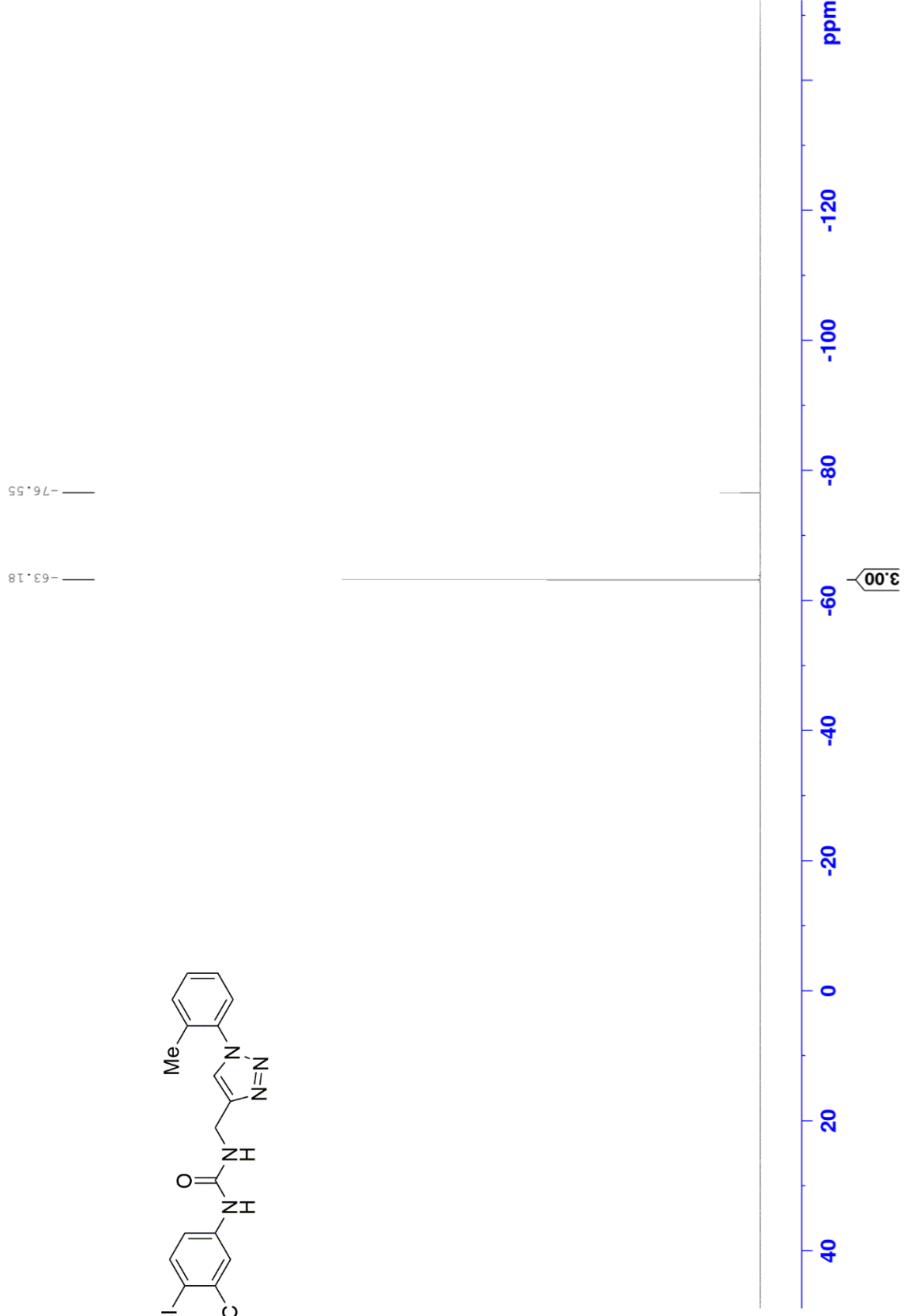
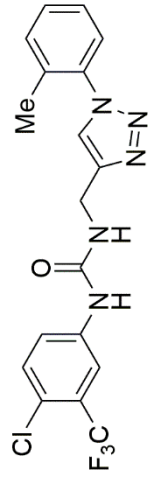
¹H NMR of compound **12t** (300 MHz, DMSO-d₆)



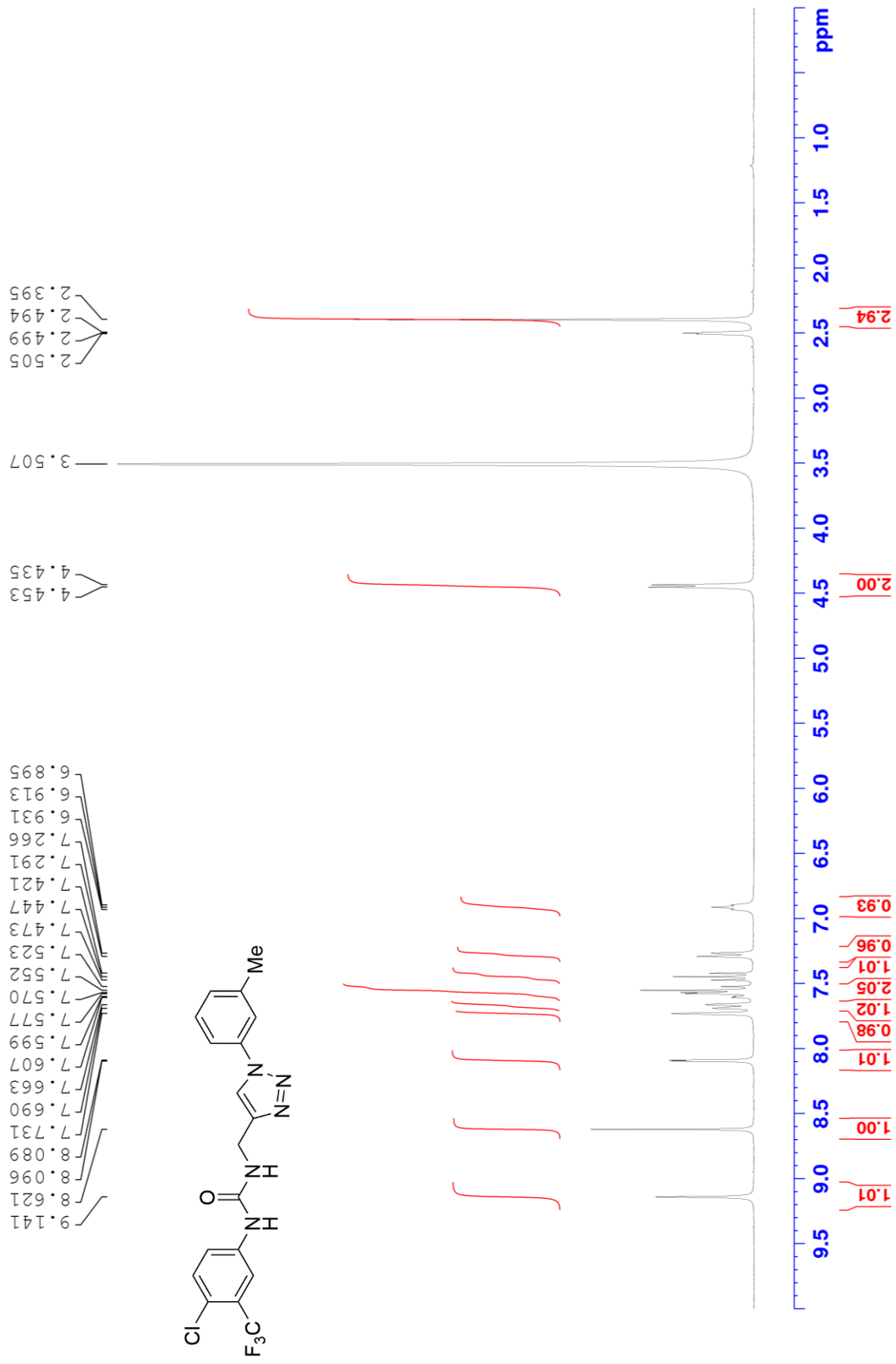
^{13}C NMR of compound **12t** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



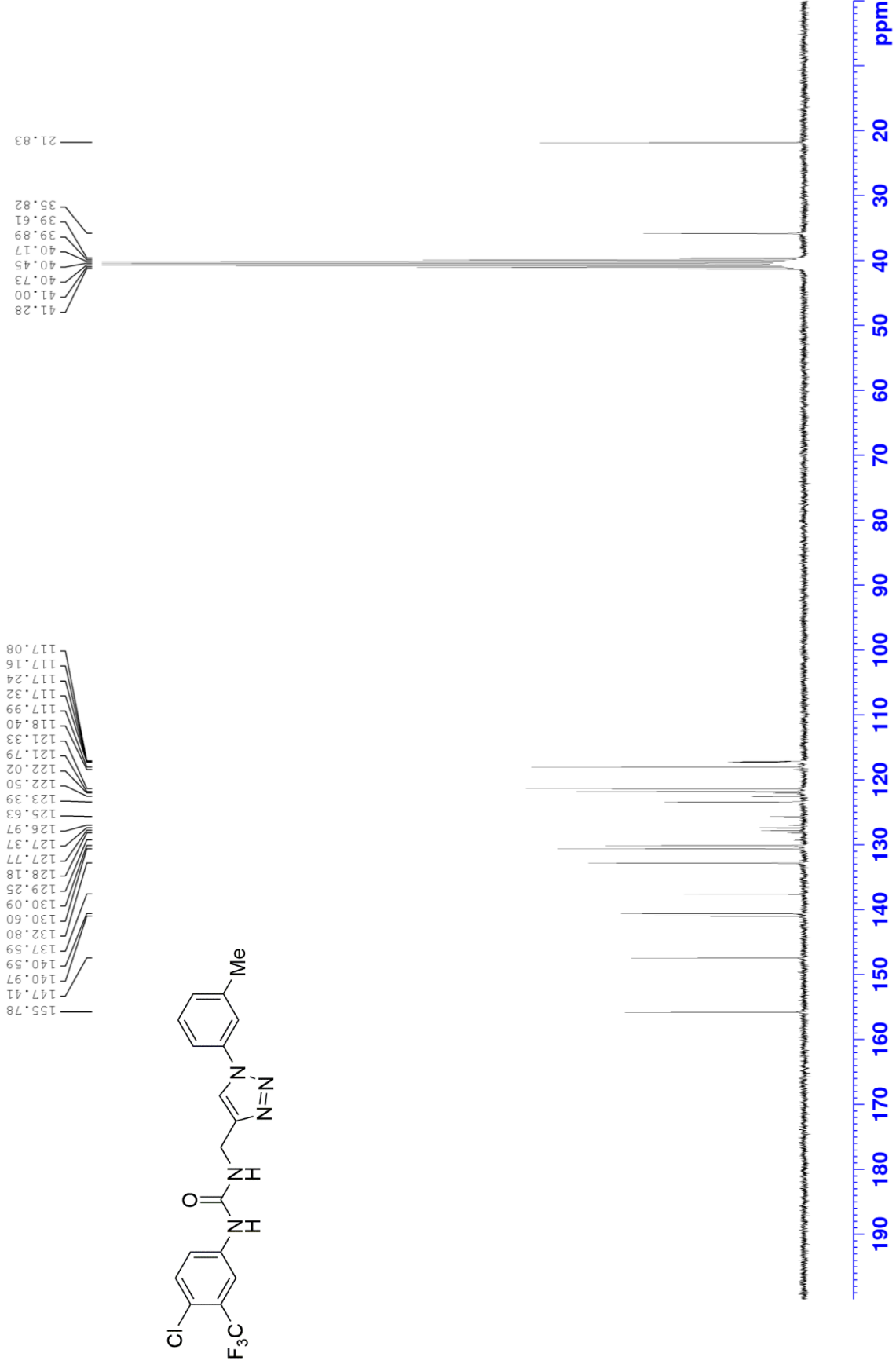
^{19}F NMR of compound **12t** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



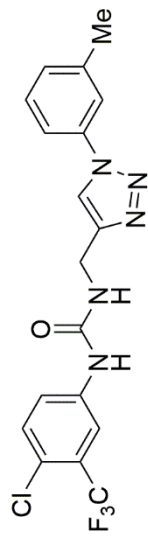
¹H NMR of compound **12u** (300 MHz, DMSO-d₆)



^{13}C NMR of compound **12u** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



^{19}F NMR of compound **12u** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

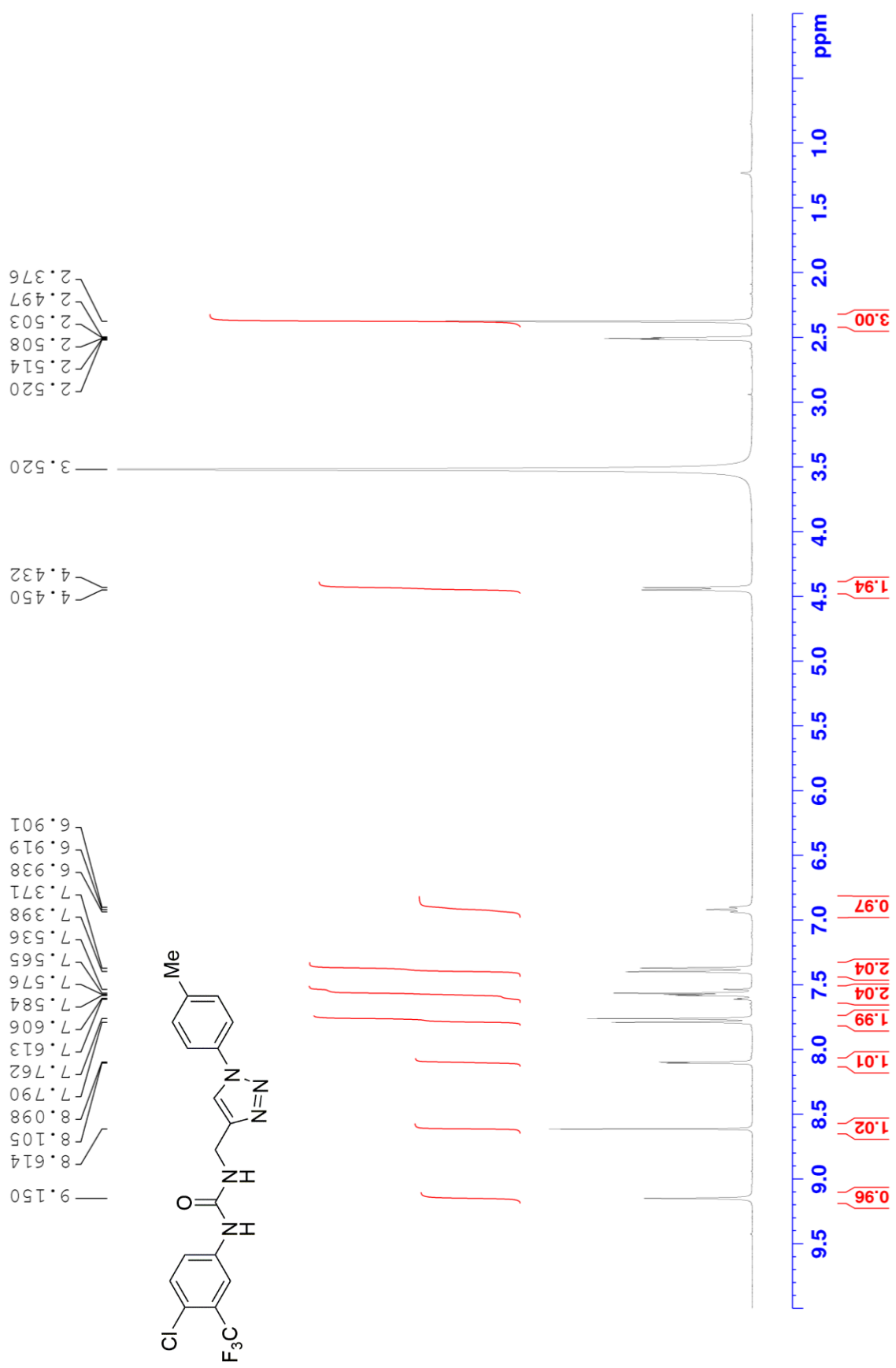


— -63.17

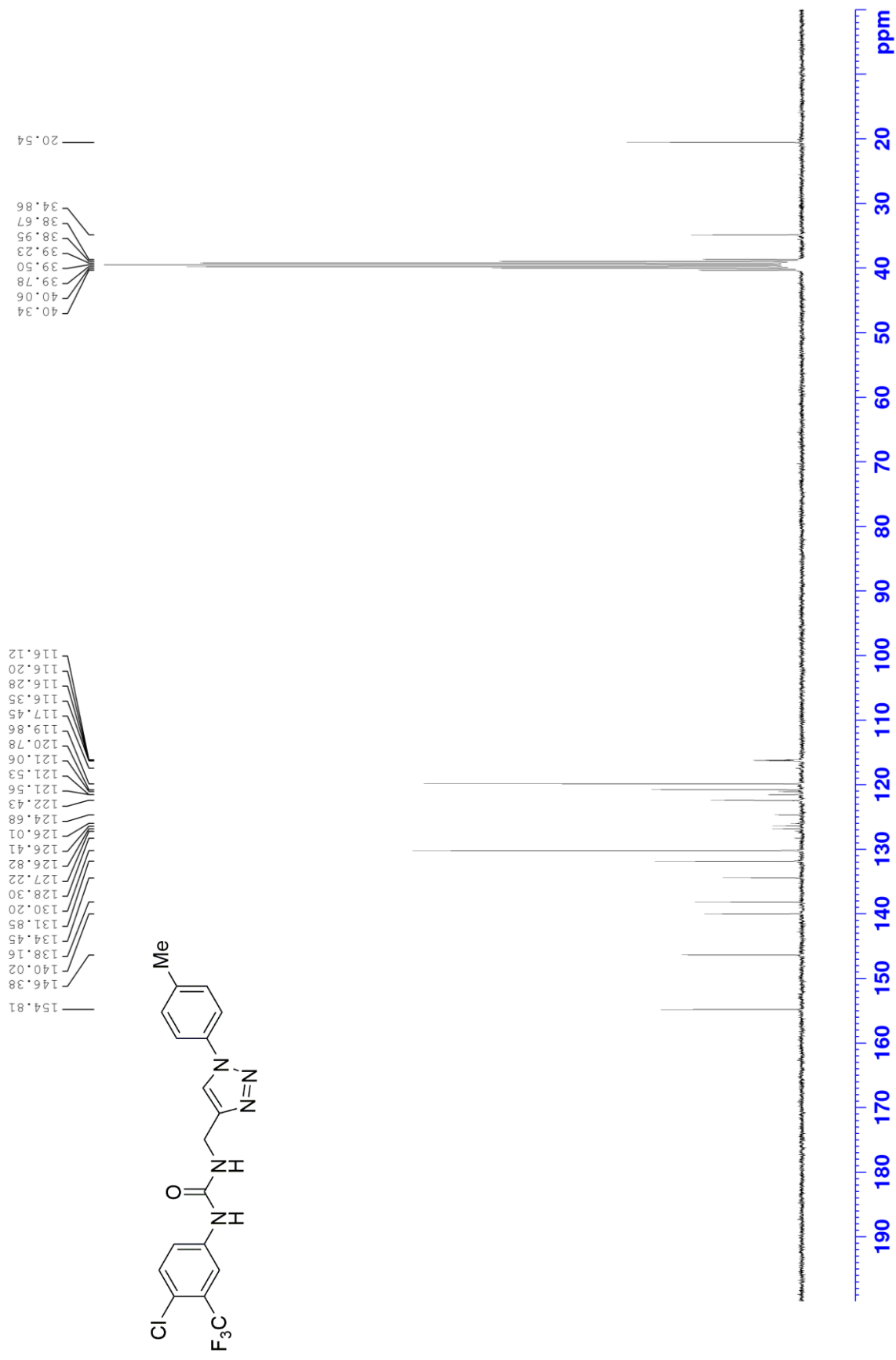
— -76.55



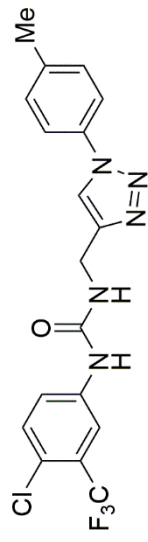
¹H NMR of compound **12v** (300 MHz, DMSO-d₆)



^{13}C NMR of compound **12v** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



^{19}F NMR of compound **12v** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

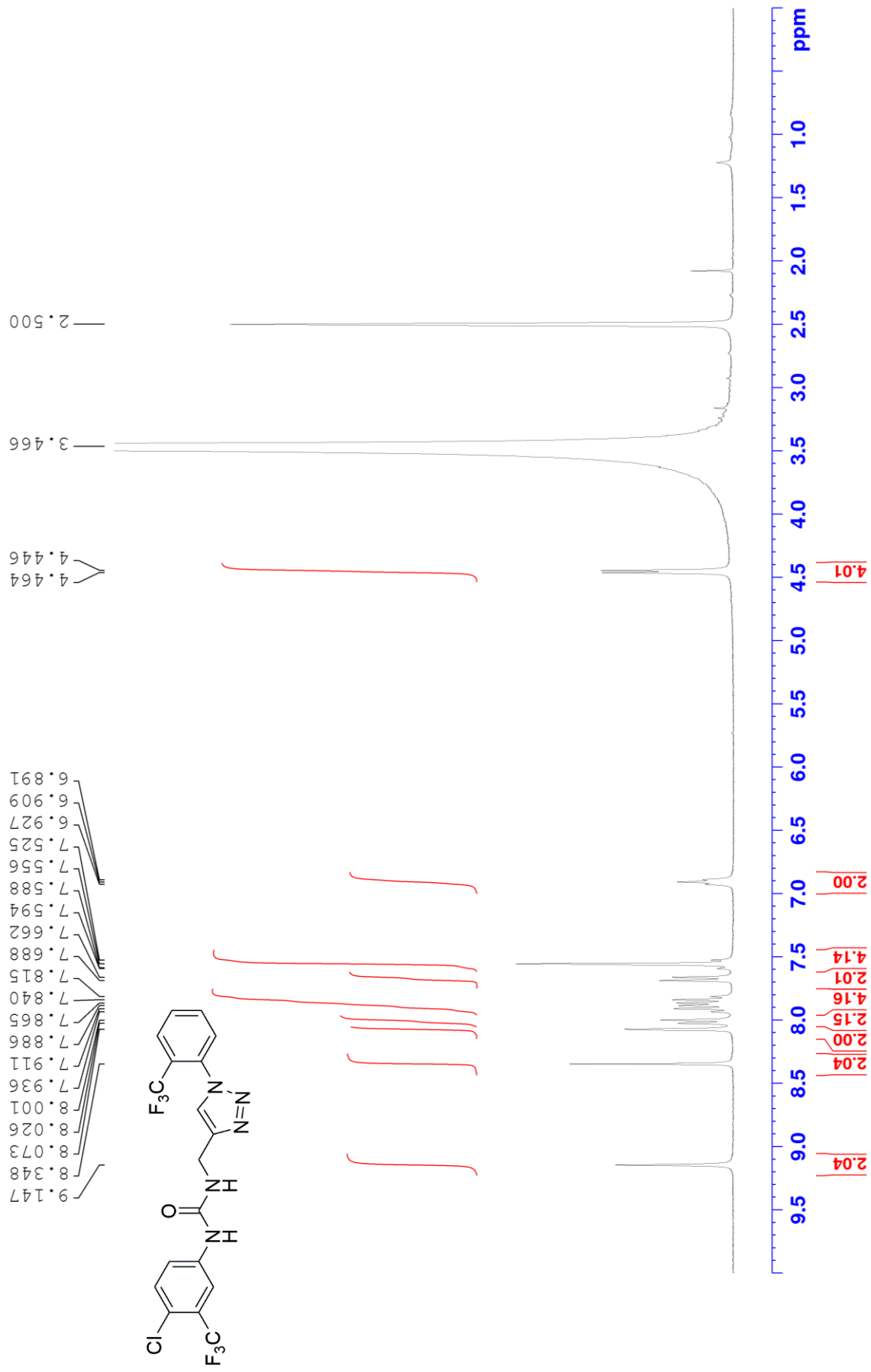


— -63.31

— -76.55



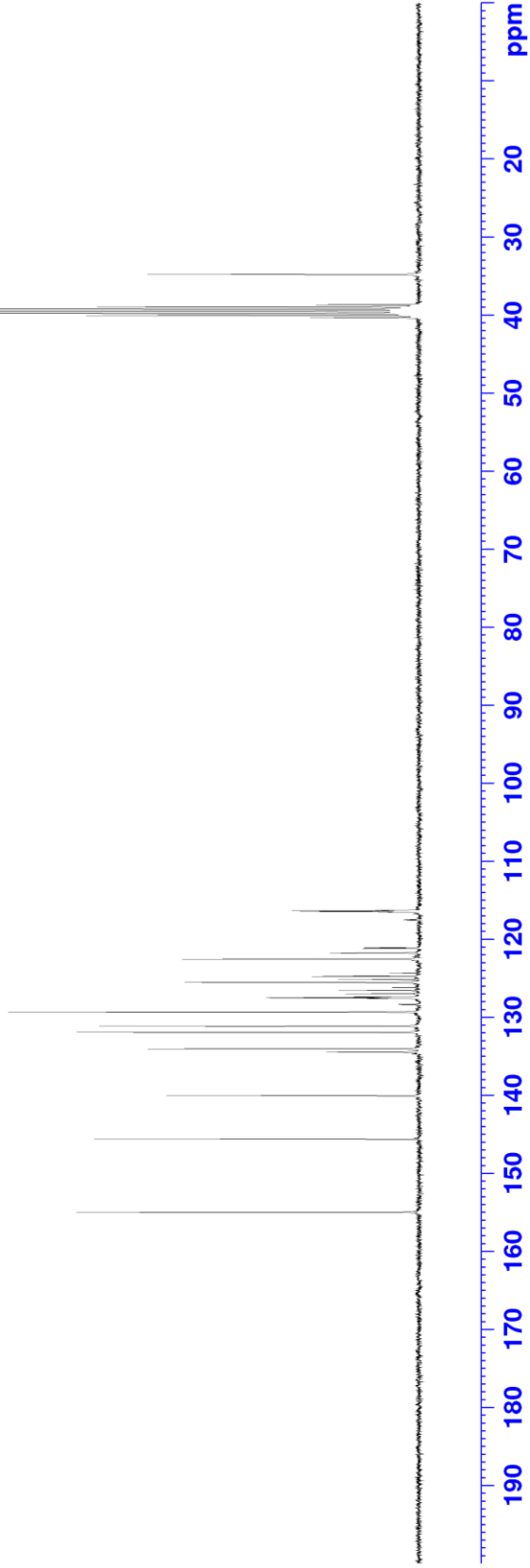
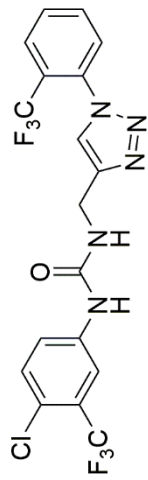
^1H NMR of compound **12w** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



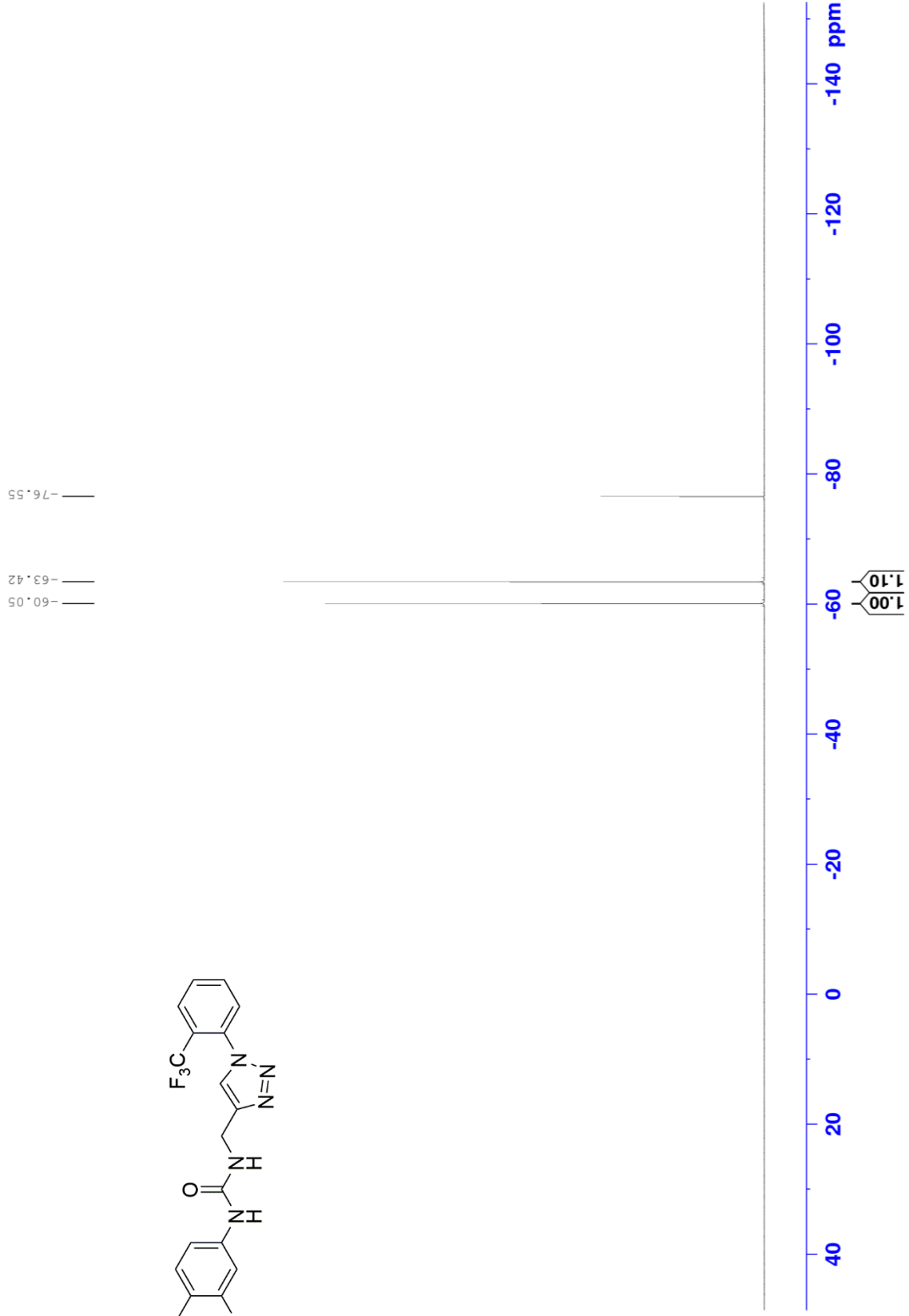
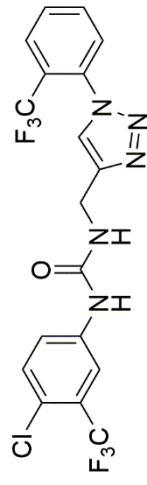
¹³C NMR of compound 12w (75 MHz, DMSO-d₆)

154.98
145.63
140.05
134.46
134.44
134.04
131.93
131.12
129.32
128.38
128.32
128.32
127.59
127.52
127.46
127.39
126.97
126.57
126.16
125.52
125.16
124.74
124.70
124.33
122.54
121.77
121.75
121.15
121.08
117.53
117.45
116.50
116.43
116.35
116.28

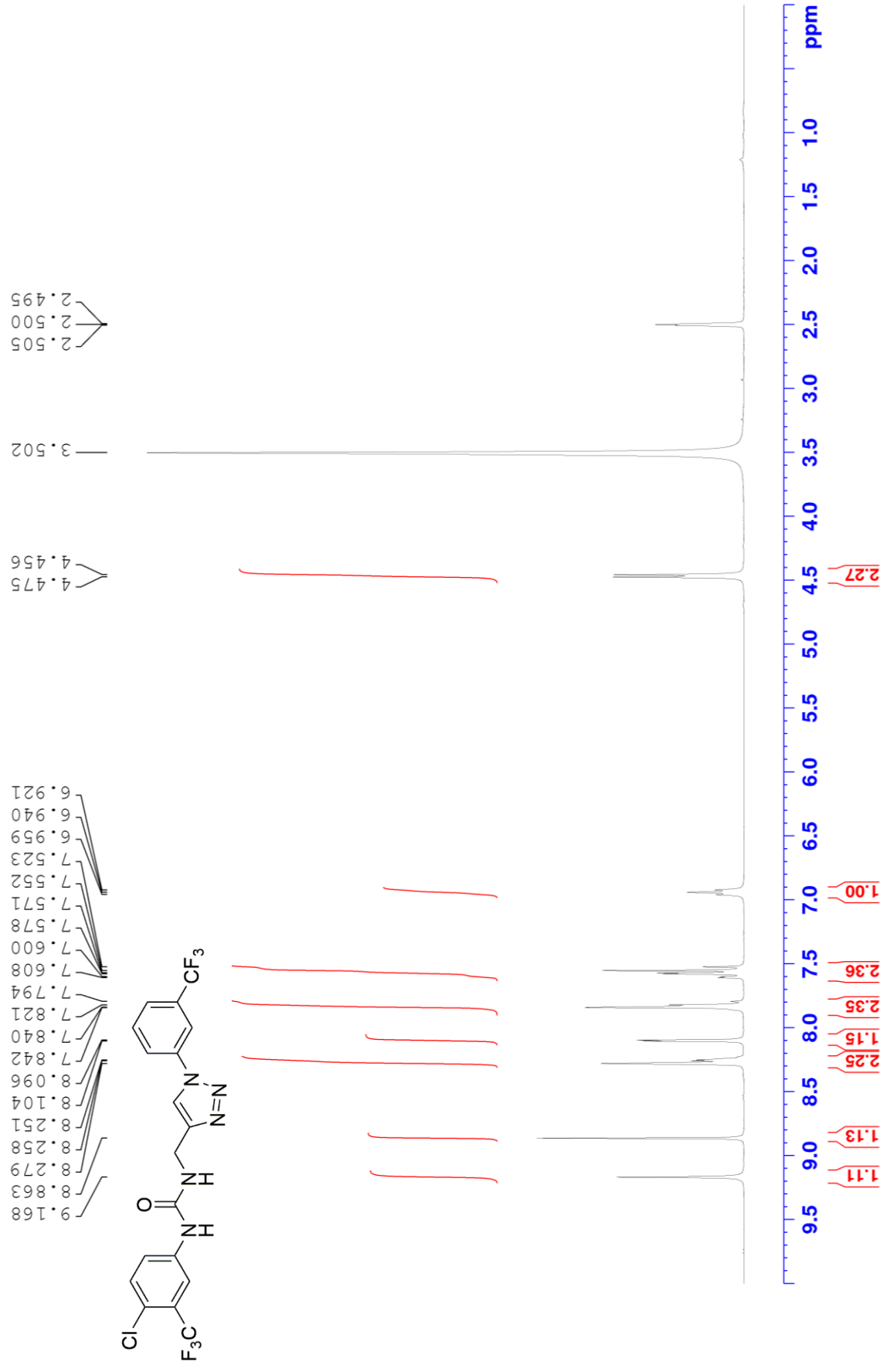
40.33
40.05
39.77
39.50
39.22
38.94
38.66
34.80



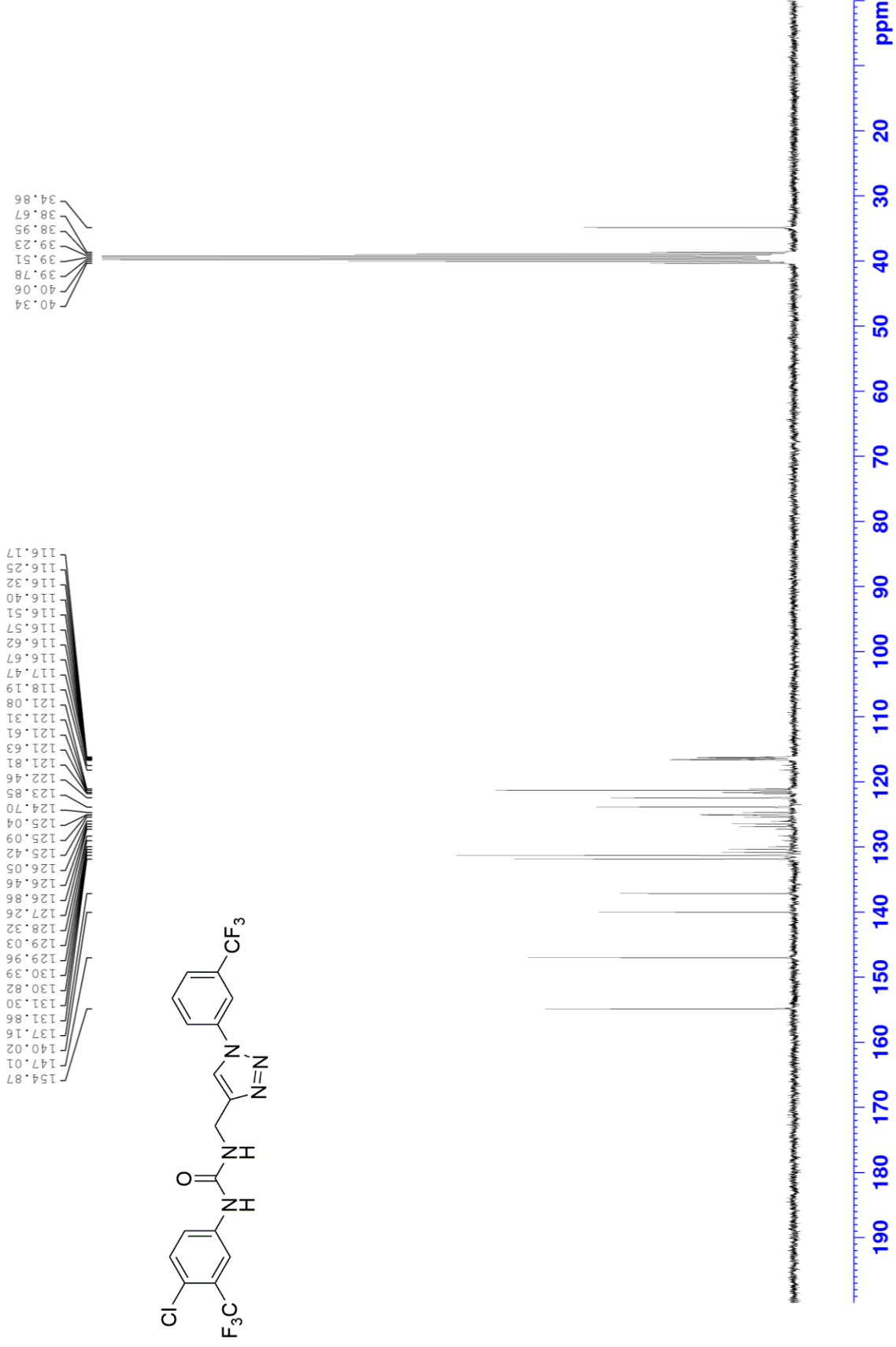
^{19}F NMR of compound **12w** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



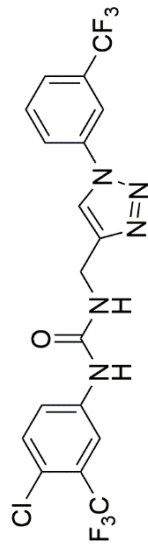
¹H NMR of compound **12x** (300 MHz, DMSO-d₆)



^{13}C NMR of compound **12x** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



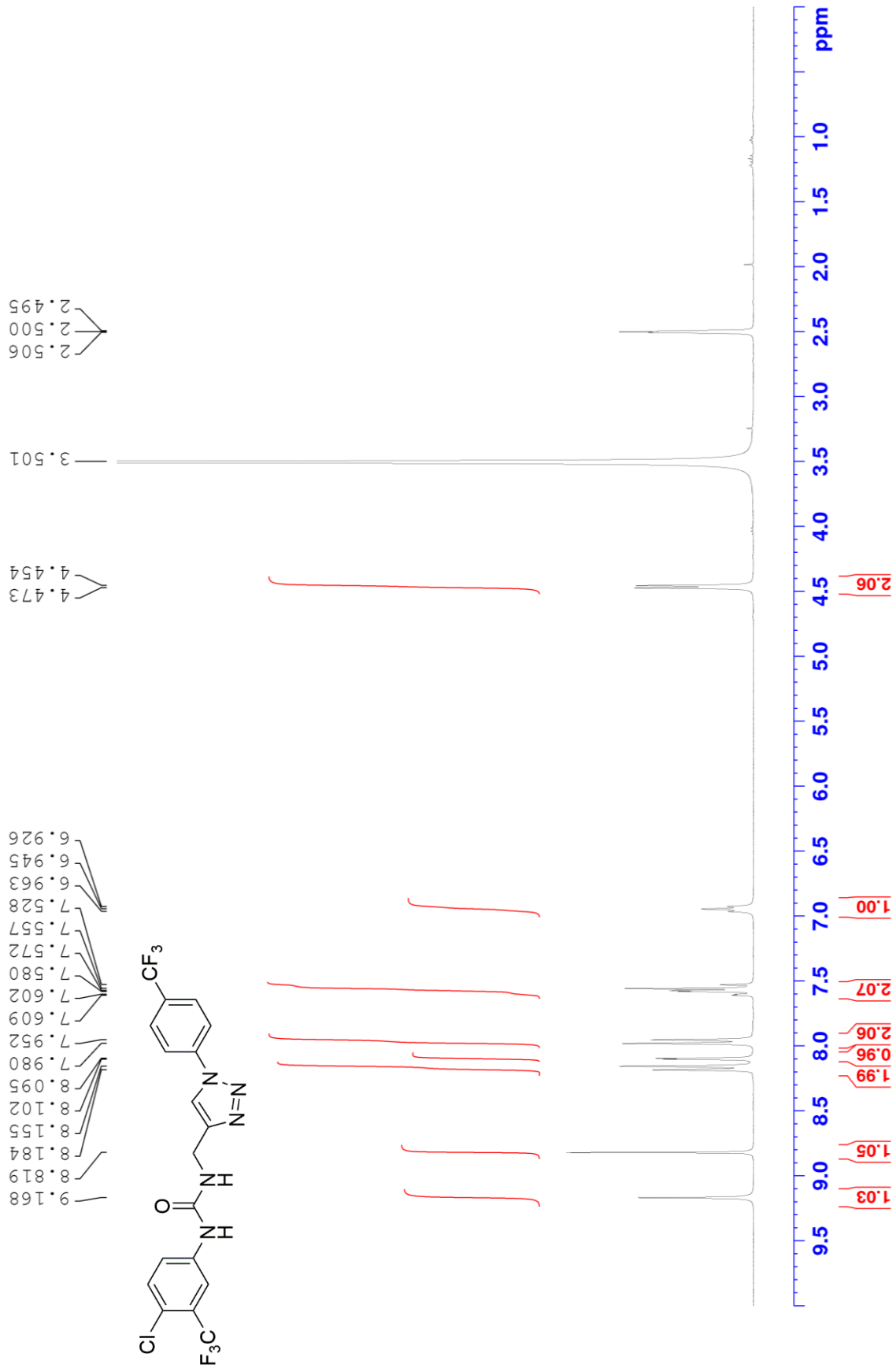
^{19}F NMR of compound **12x** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



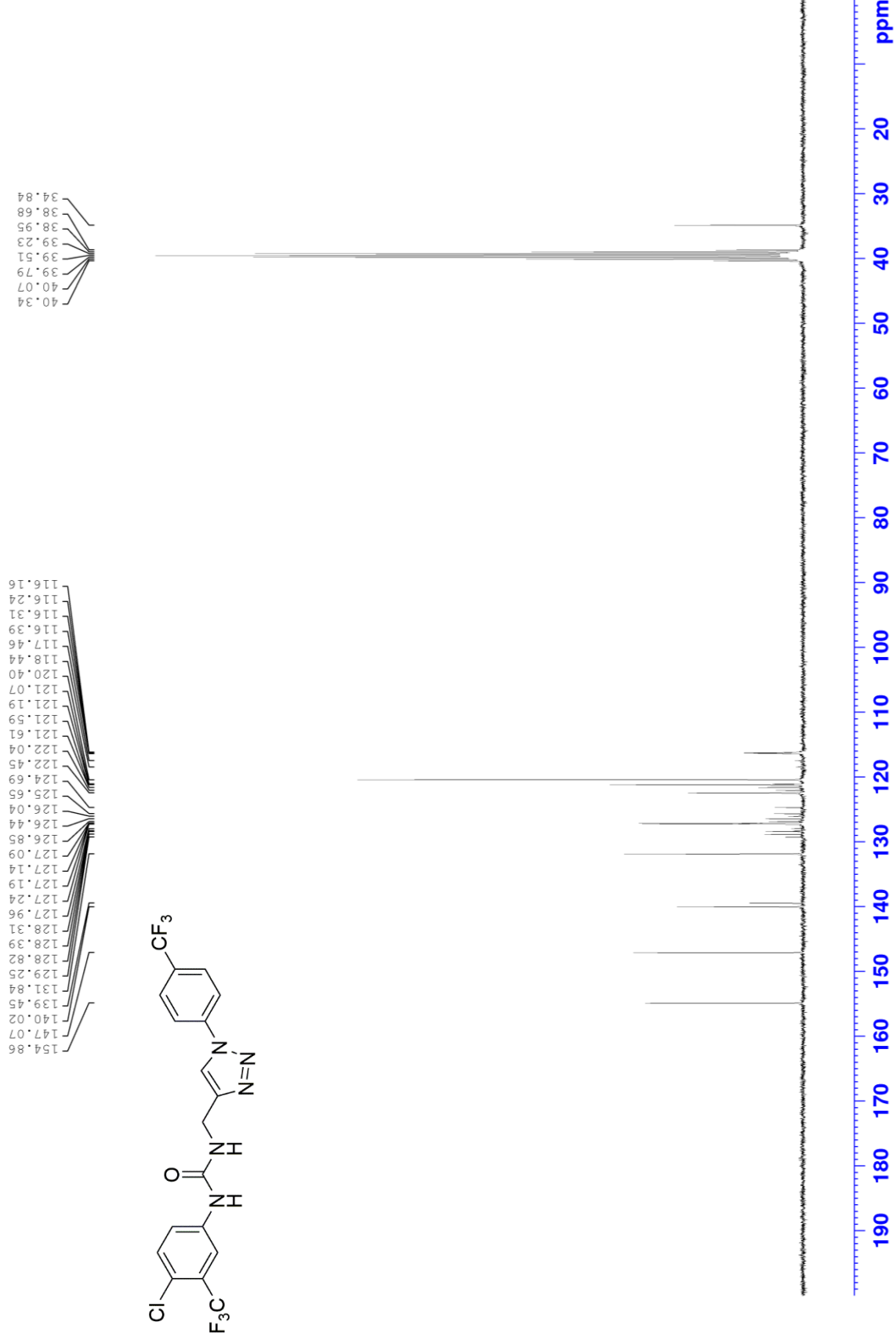
— -76.55
— -63.23
— -63.01



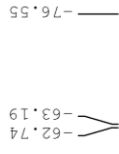
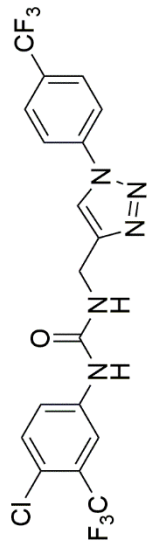
¹H NMR of compound **12y** (300 MHz, DMSO-d₆)



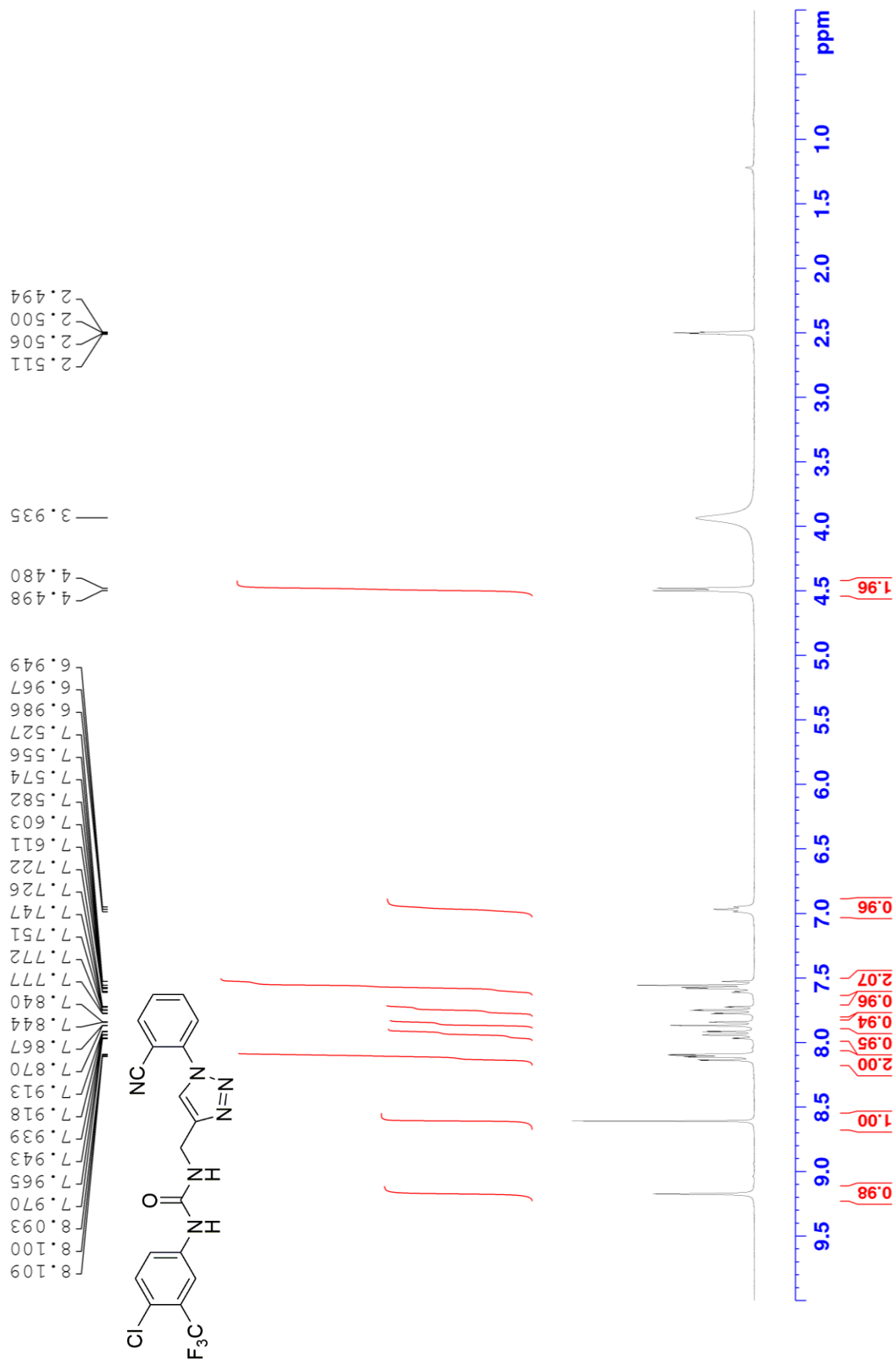
^{13}C NMR of compound **12y** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



^{19}F NMR of compound **12y** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

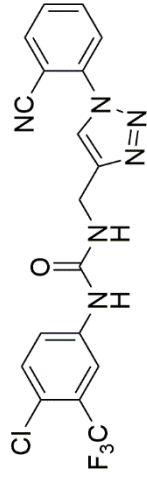


^1H NMR of compound **12z** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

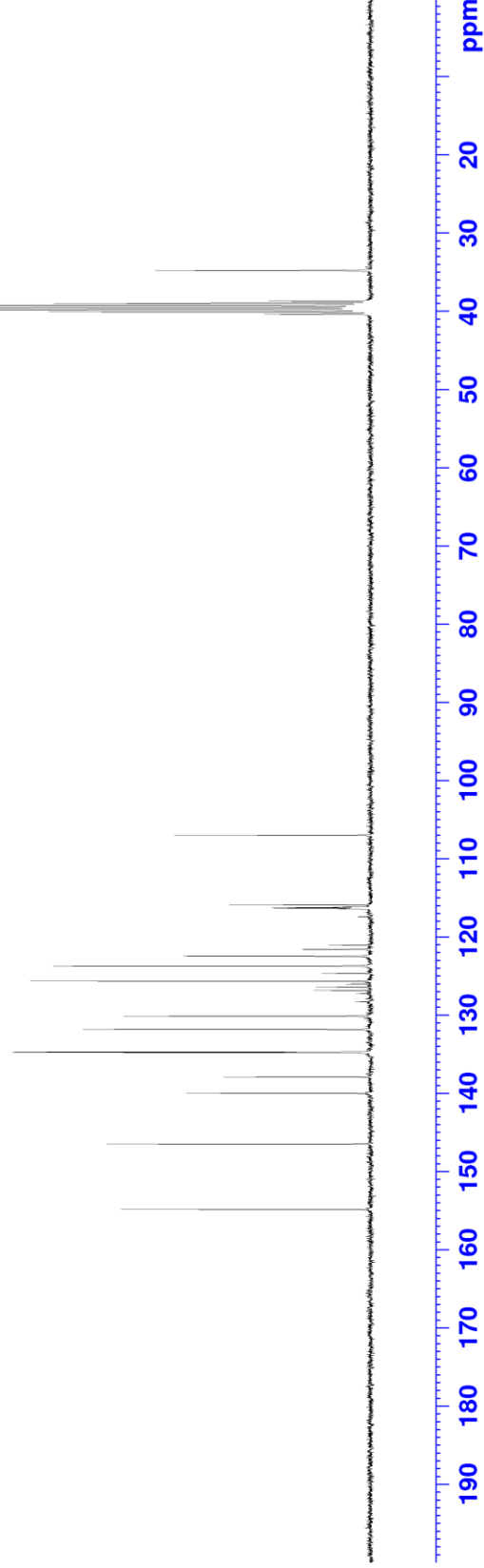


¹³C NMR of compound **12z** (75 MHz, DMSO-d₆)

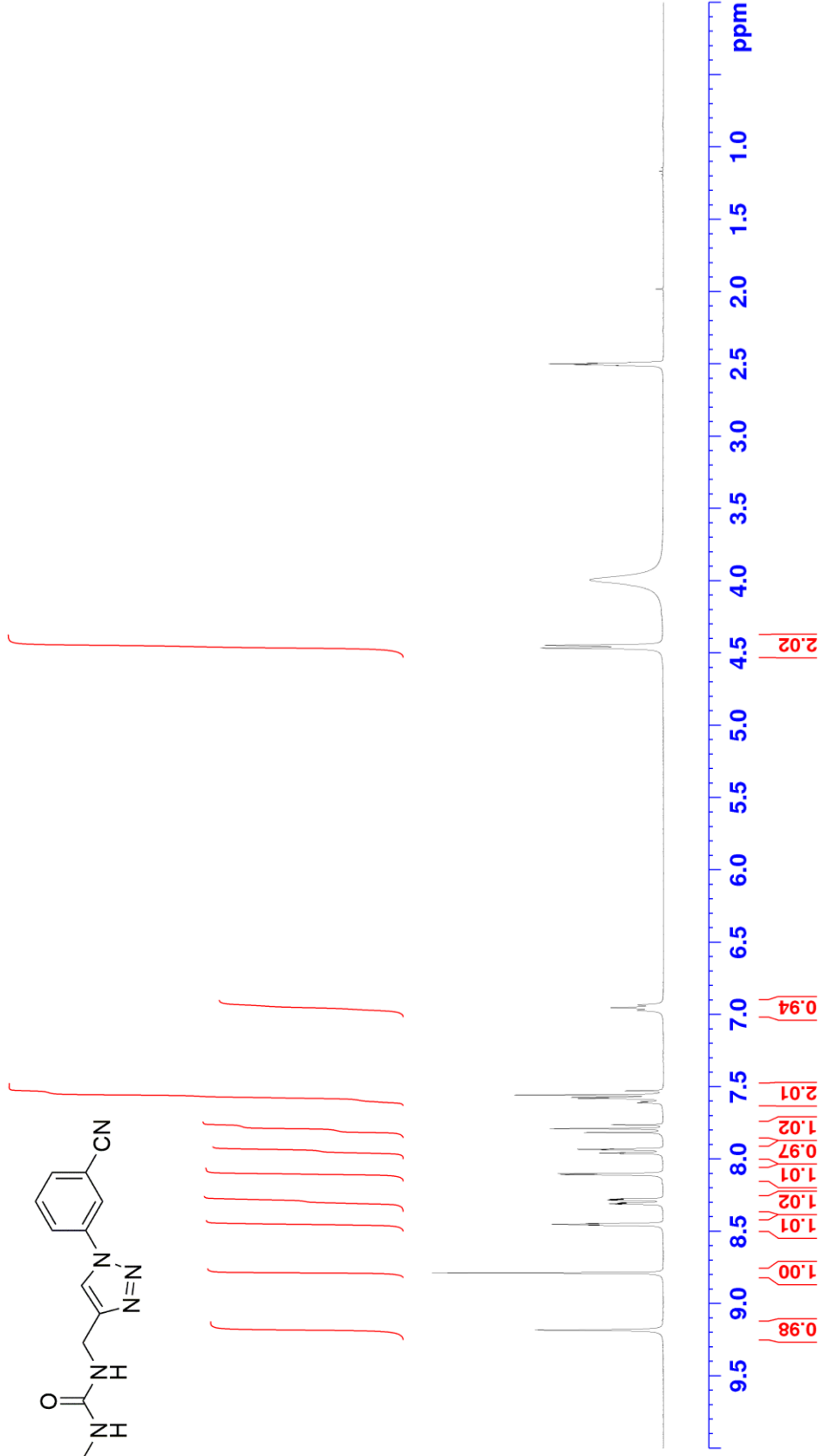
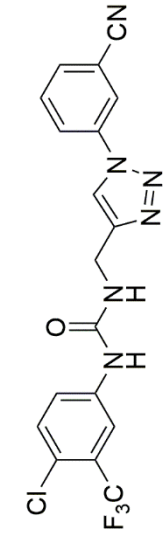
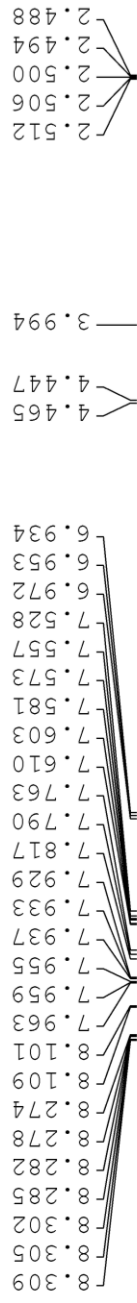
154.85
146.48
140.00
137.91
134.77
134.71
131.83
130.12
128.29
127.23
126.83
126.42
126.02
125.65
124.67
123.72
122.46
121.60
121.58
121.06
117.44
116.41
116.33
116.25
116.18
115.91
106.98



40.34
40.06
39.79
39.51
39.23
38.95
38.67
34.77

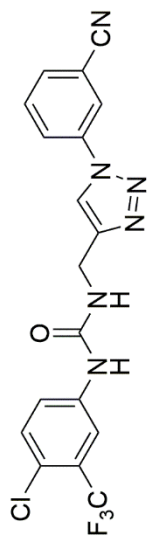


^1H NMR of compound **12a'** (300 MHz, DMSO-d_6)

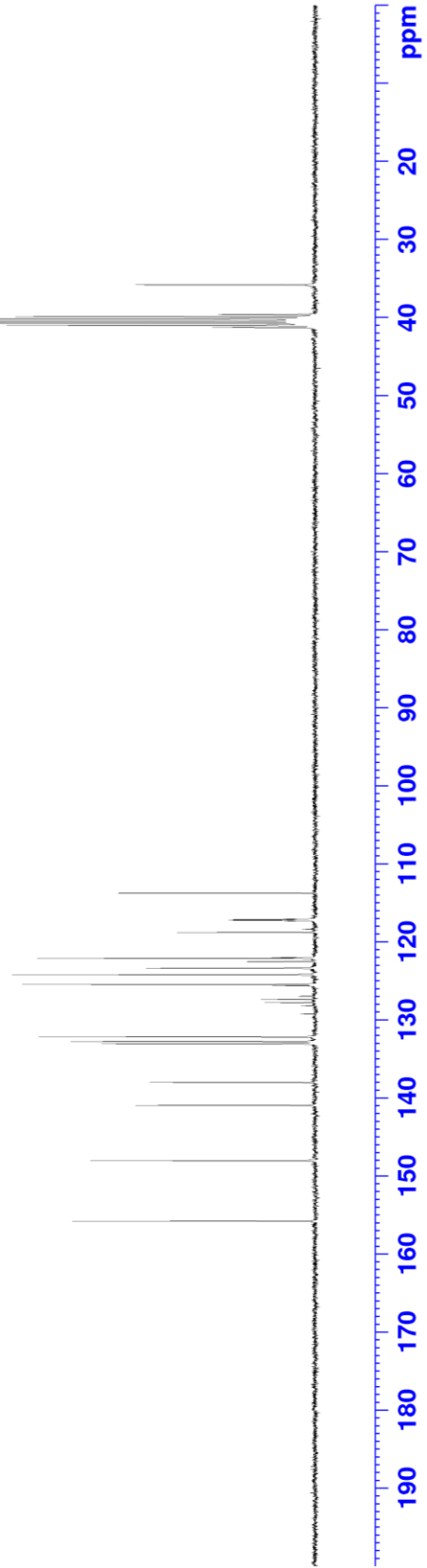


^{13}C NMR of compound **12a'** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

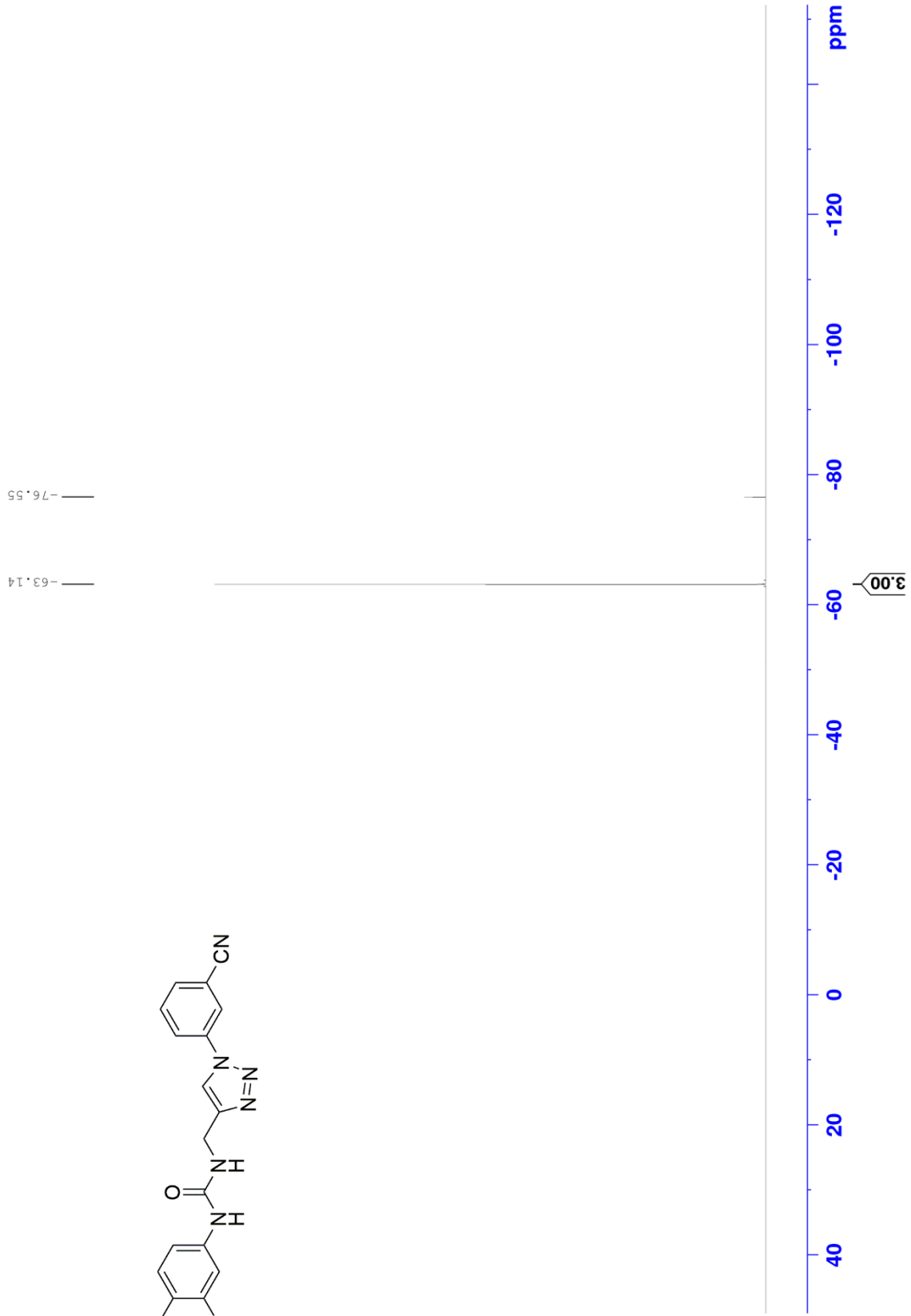
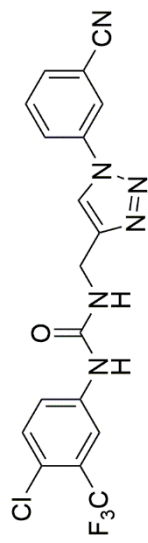
155.79
148.05
140.96
138.02
133.04
132.78
132.19
129.24
128.17
127.77
127.37
126.96
125.63
125.45
124.21
123.37
122.54
122.52
122.11
122.01
118.78
118.39
117.31
117.23
117.16
117.08
113.76



41.28
41.00
40.72
40.45
40.17
39.89
39.61
35.80



^{19}F NMR of compound **12a** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



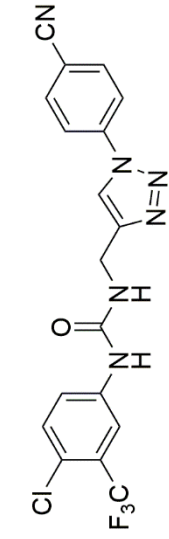
^1H NMR of compound **12b'** (300 MHz, DMSO-d_6)

9.147
8.816
8.152
8.123
8.080
8.072
8.056
8.027
7.598
7.591
7.569
7.561
7.520
7.491
6.948
6.929
6.910

4.481
4.462

3.401

2.505
2.500



1.01

1.03

5.19

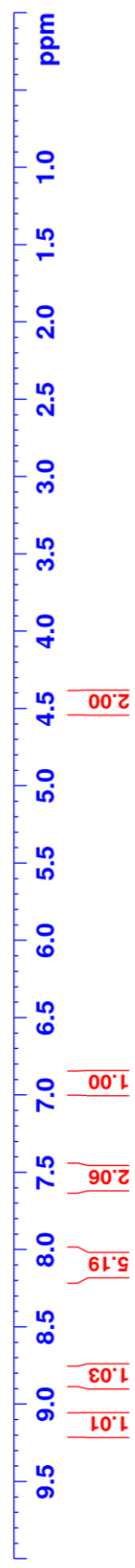
2.06

1.00

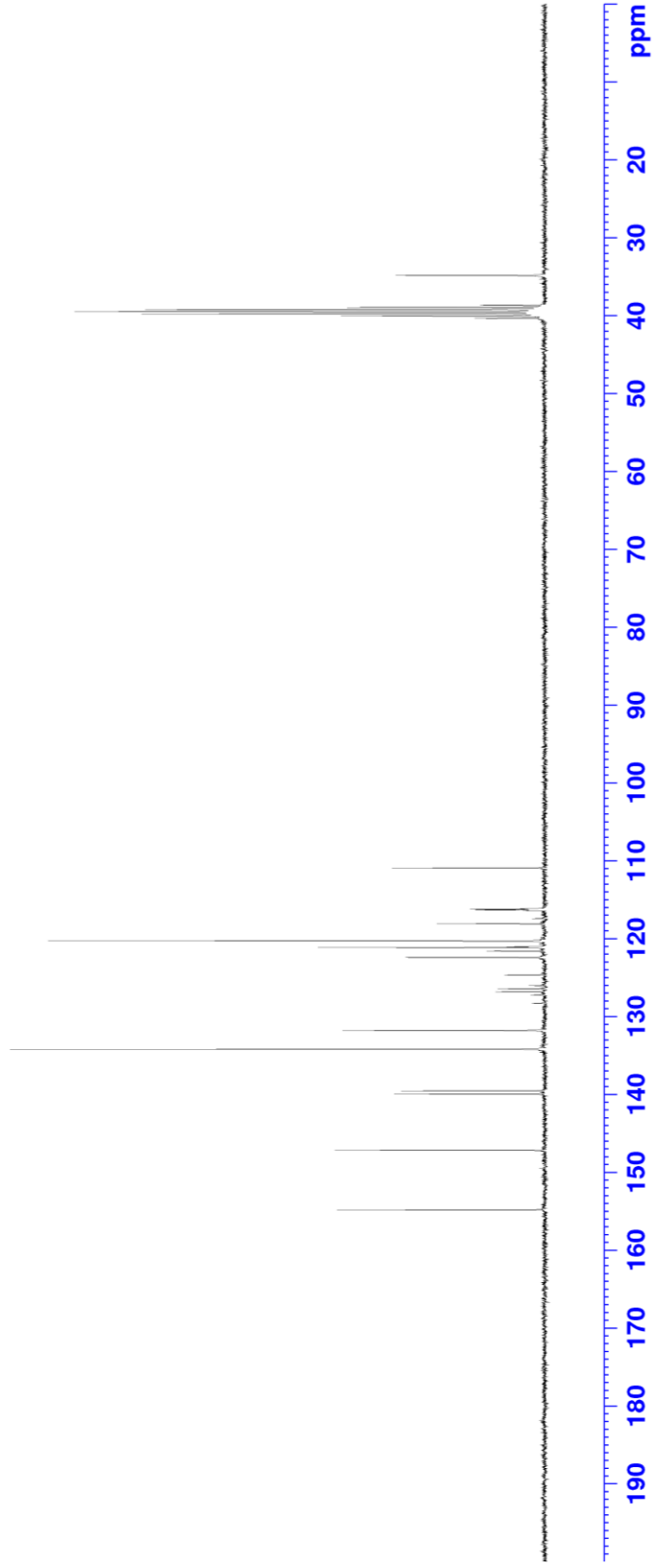
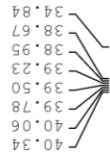
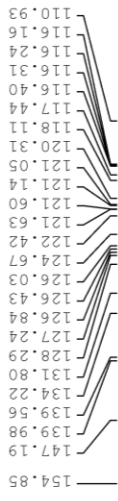
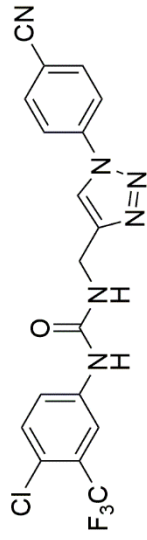
1.00

2.00

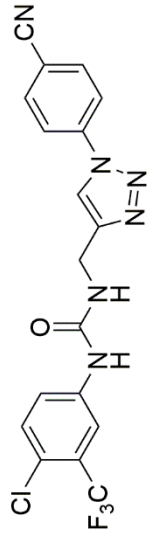
2.00



^{13}C NMR of compound **12b'** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



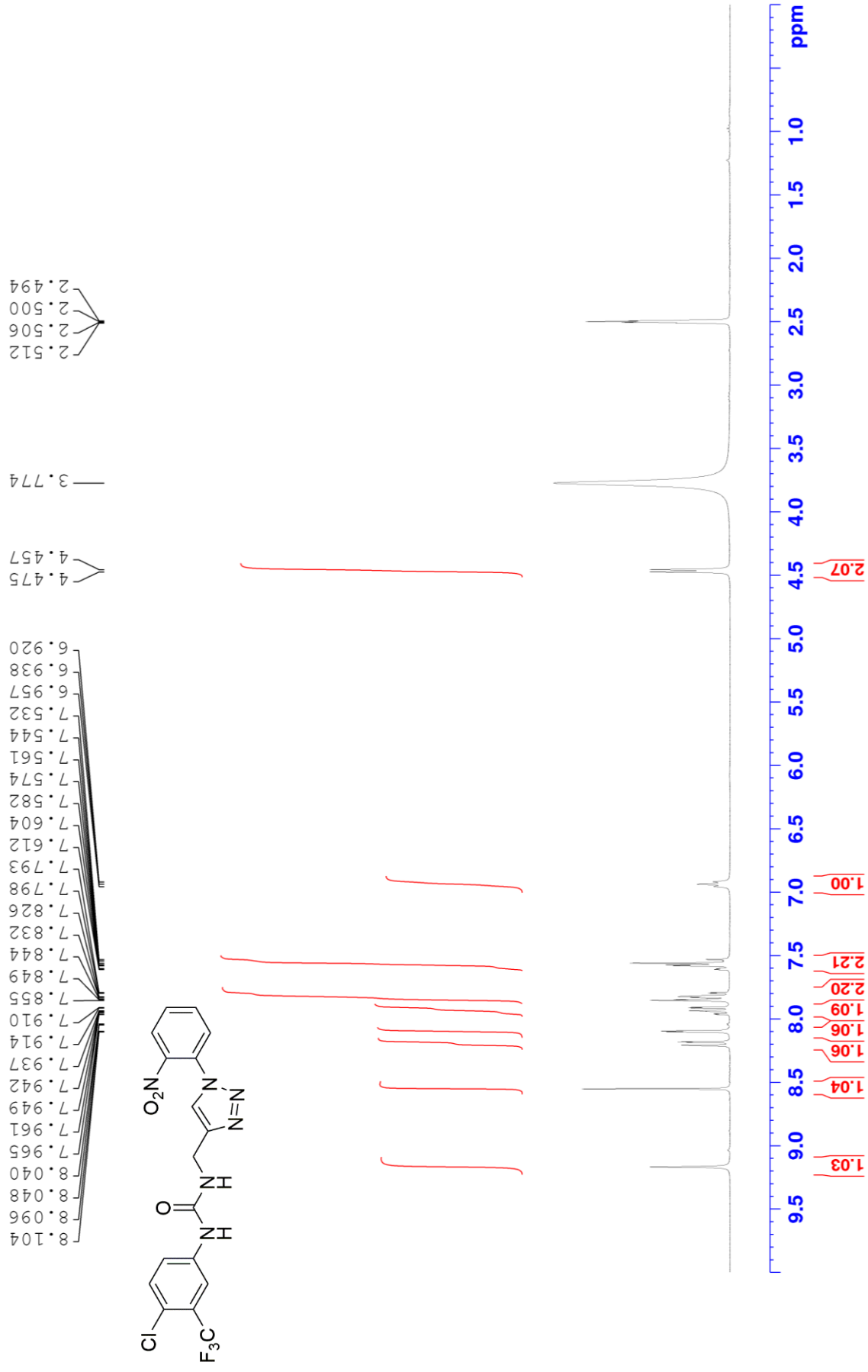
^{19}F NMR of compound **12b'** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



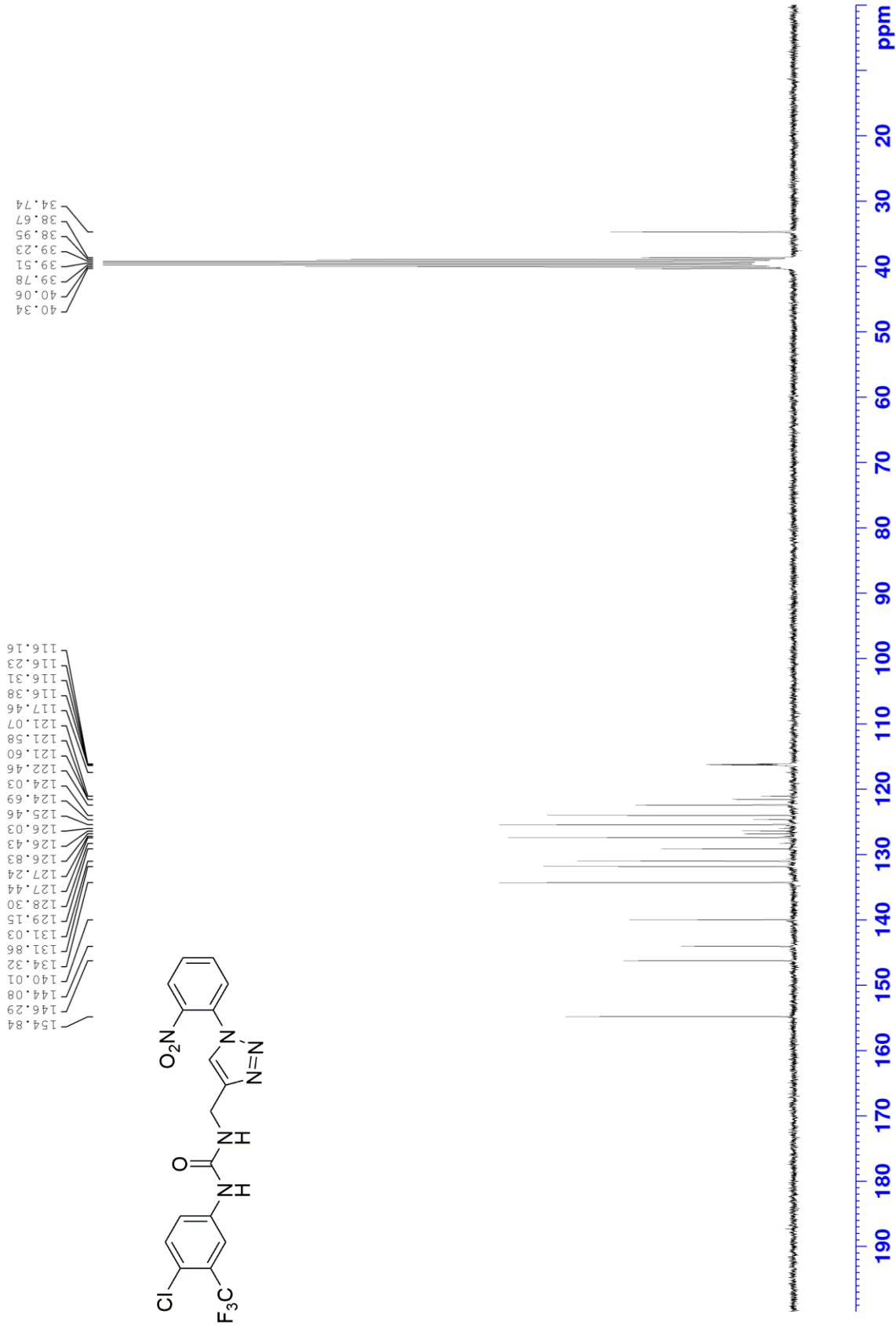
— -76.55
— -63.02



¹H NMR of compound **12c'** (300 MHz, DMSO-d₆)



^{13}C NMR of compound **12c'** (75 MHz, DMSO-d_6)

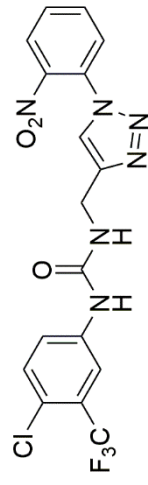


154.84
146.29
144.08
140.01
134.32
131.86
131.03
129.15
128.30
127.44
127.24
126.83
126.43
126.03
124.69
124.03
122.46
121.60
121.58
121.07
117.46
116.38
116.31
116.23
116.16

40.34
40.06
39.78
39.51
39.23
38.95
38.67
34.74

190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 ppm

^{19}F NMR of compound **12c** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



— -63.11

— -76.55

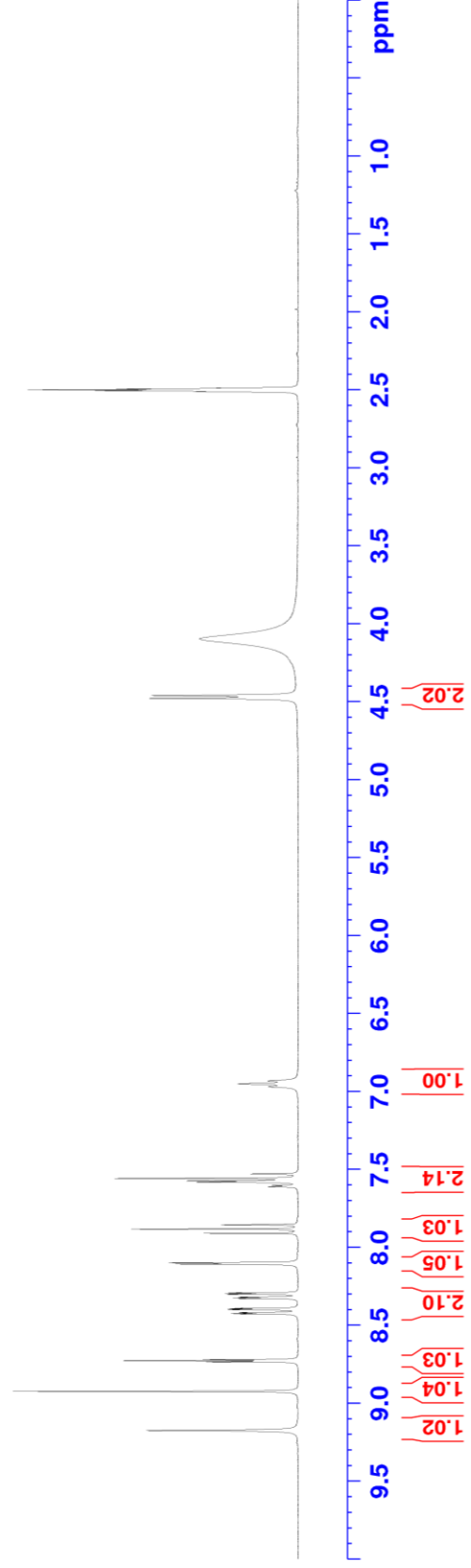
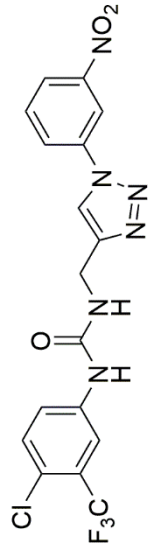


^1H NMR of compound **12d'** (300 MHz, DMSO-d_6)

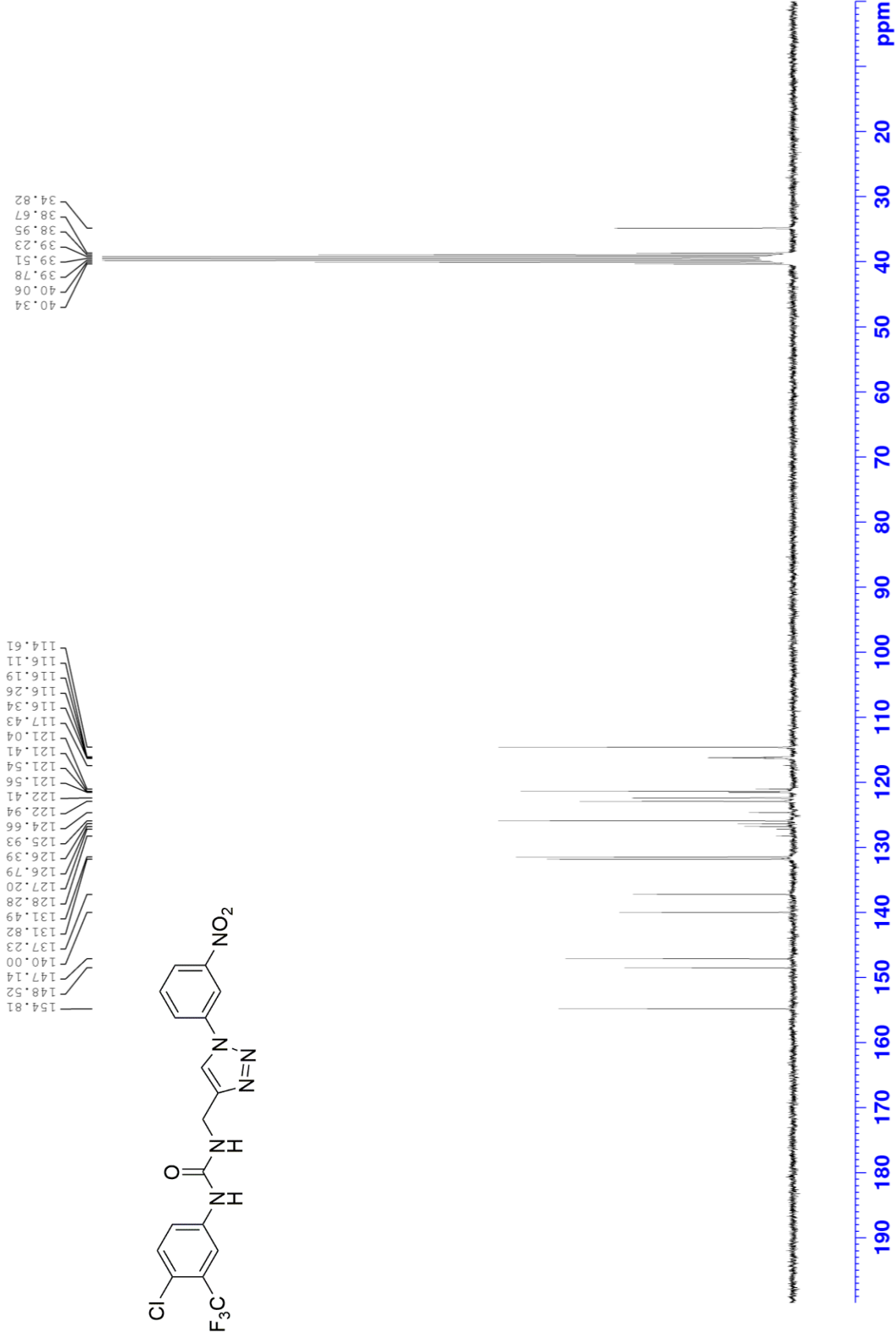
8.419, 8.399, 8.394, 8.391, 8.329, 8.327, 8.322, 8.319, 8.302, 8.299, 8.295, 8.292, 8.108, 8.100, 7.911, 7.883, 7.856, 7.612, 7.604, 7.582, 7.574, 7.559, 7.530, 6.971, 6.952, 6.933

4.479, 4.461, 4.097

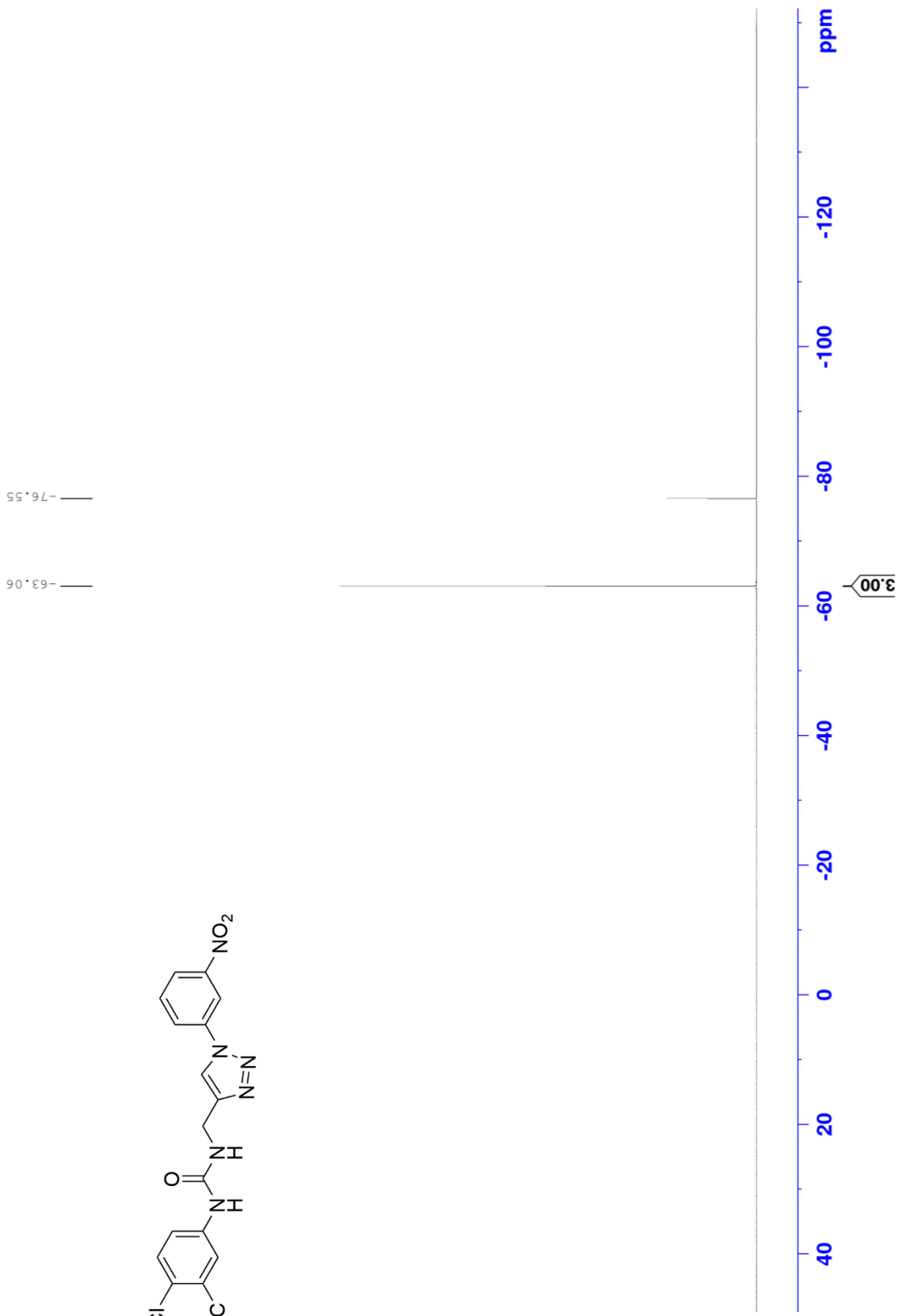
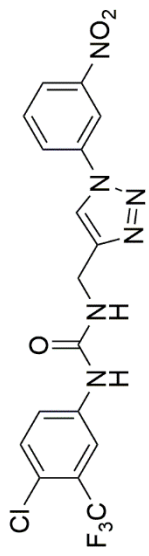
2.512, 2.506, 2.500, 2.494, 2.488



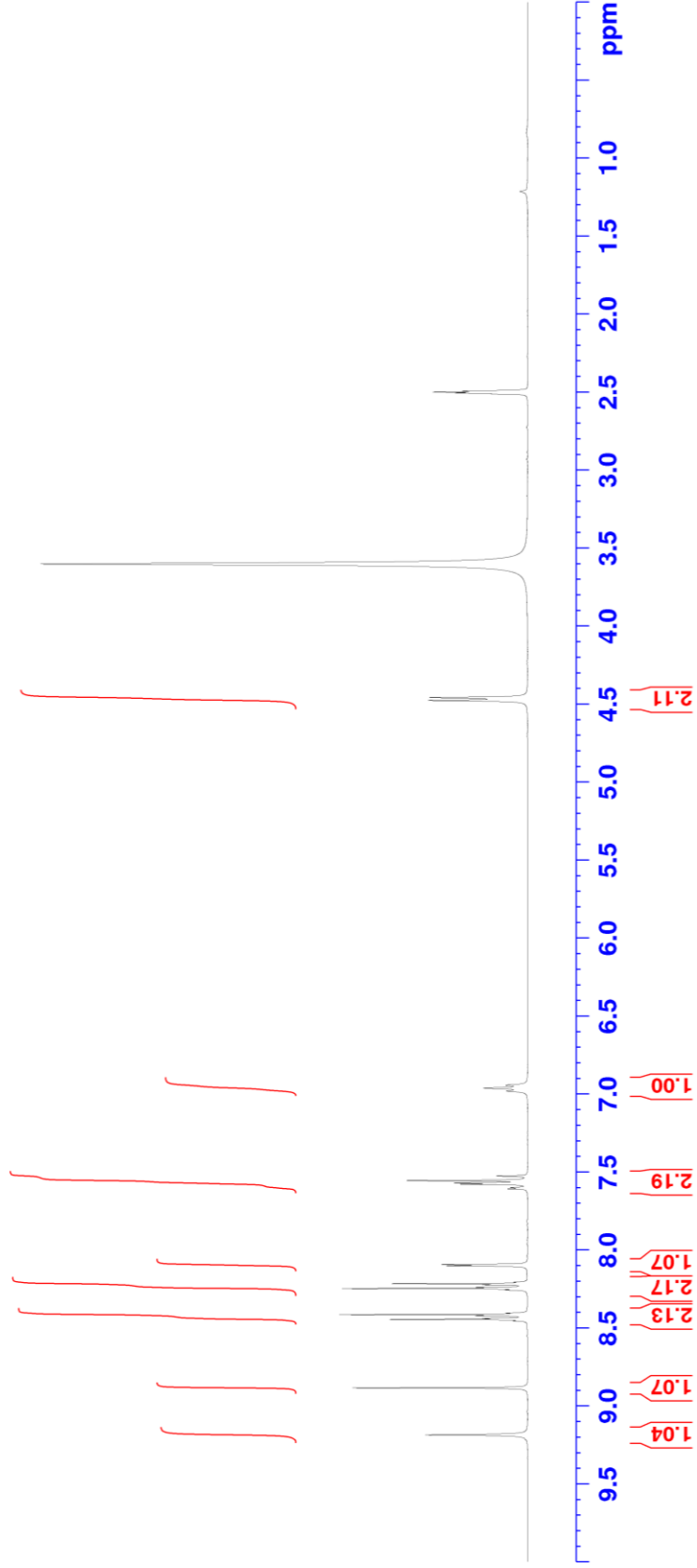
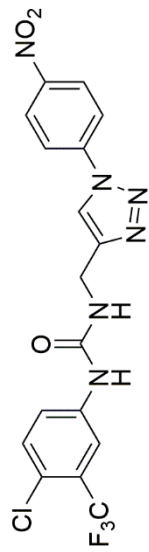
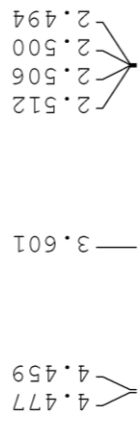
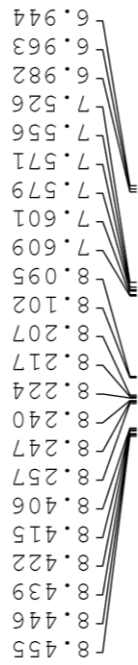
^{13}C NMR of compound **12d'** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



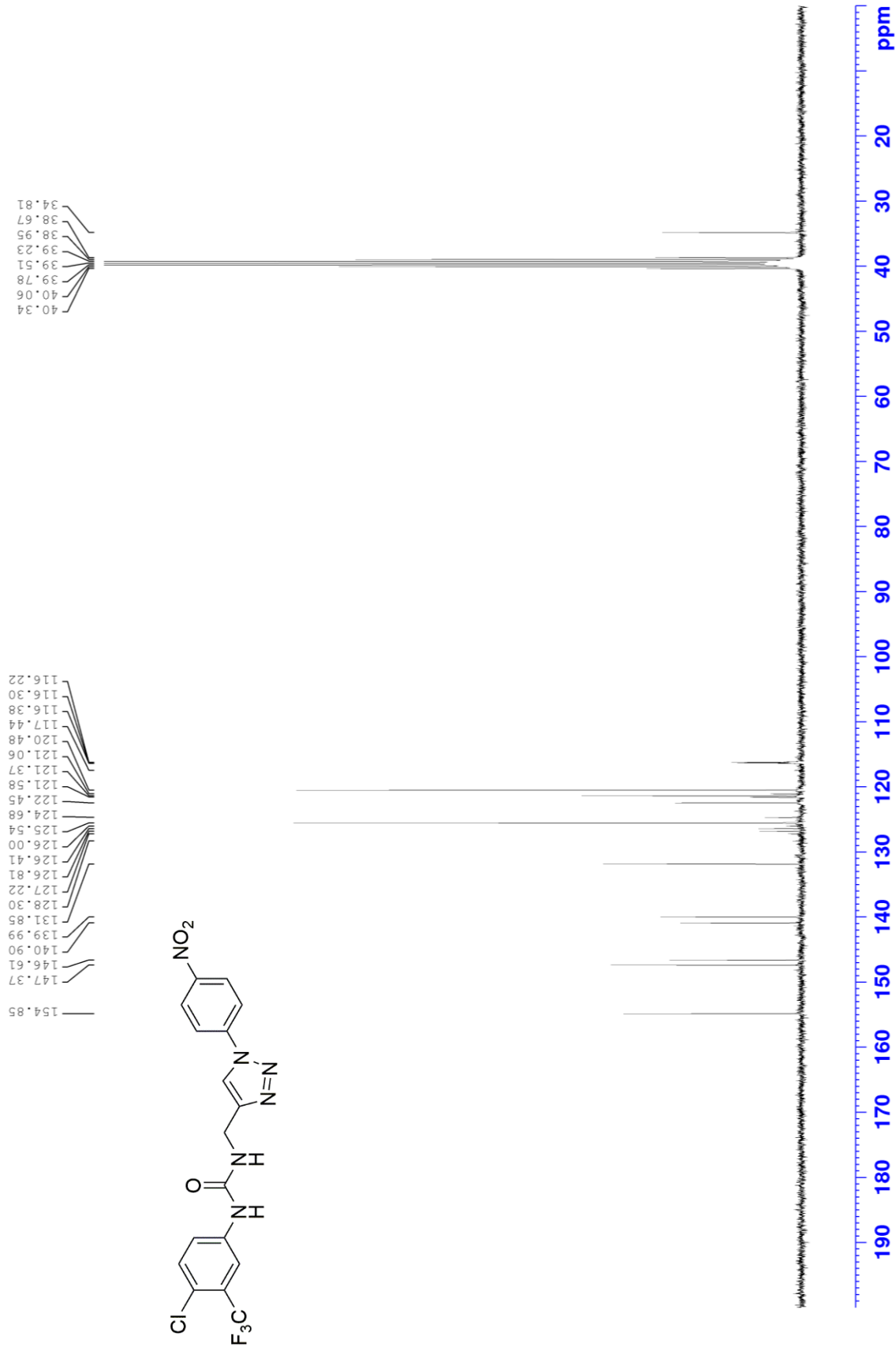
^{19}F NMR of compound **12d'** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



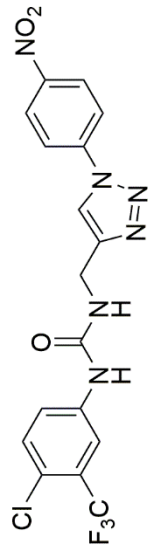
^1H NMR of compound **12e'** (300 MHz, DMSO-d_6)



¹³C NMR of compound **12e'** (75 MHz, DMSO-d₆)



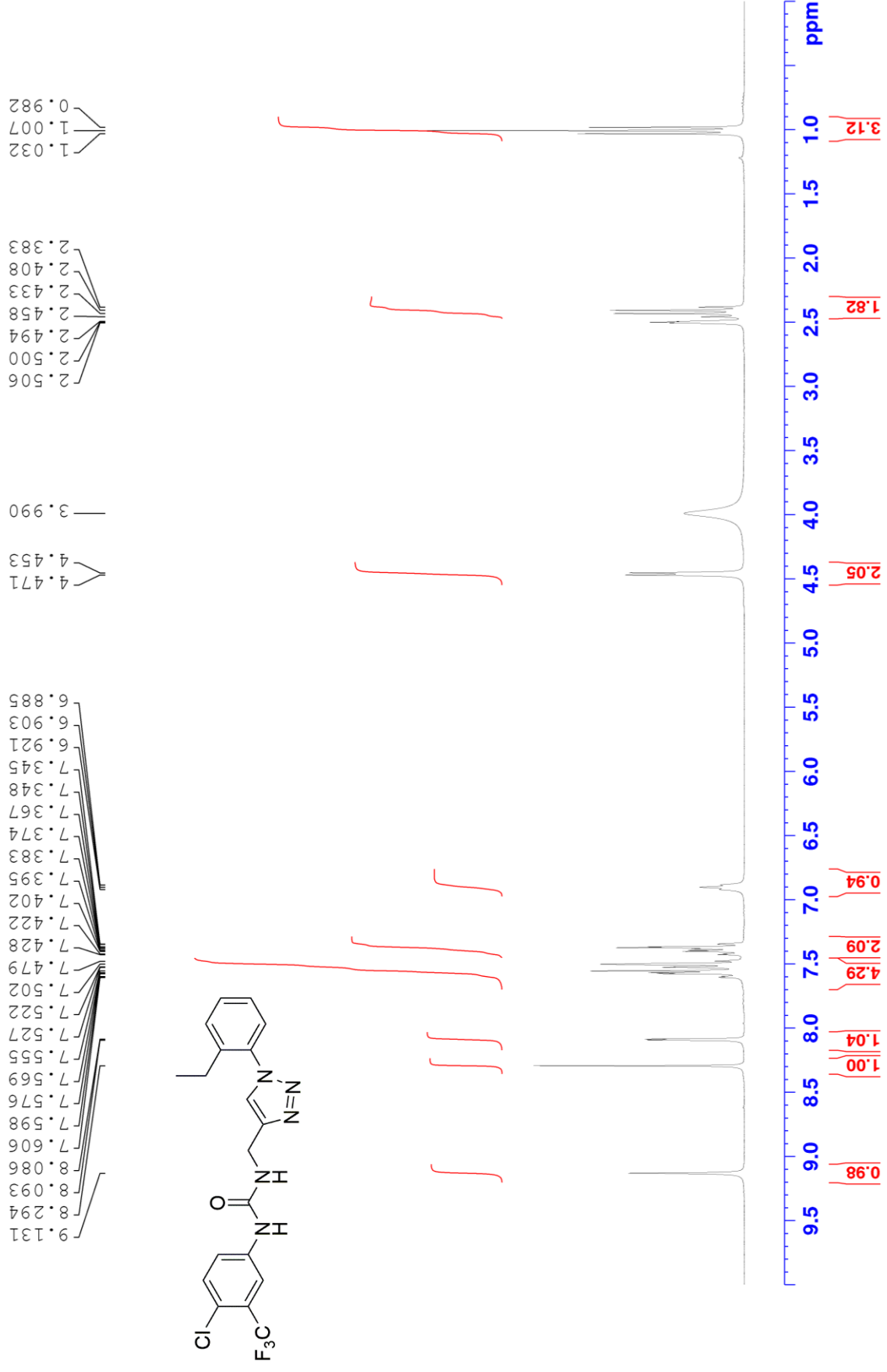
^{19}F NMR of compound **12e'** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



— -76.55
— -63.14



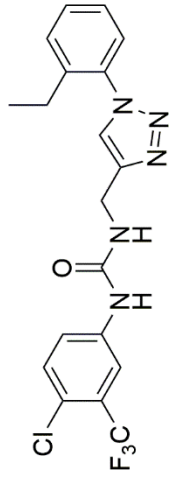
¹H NMR of compound **12f'** (300 MHz, DMSO-d₆)



¹³C NMR of compound **12f'** (75 MHz, DMSO-d₆)

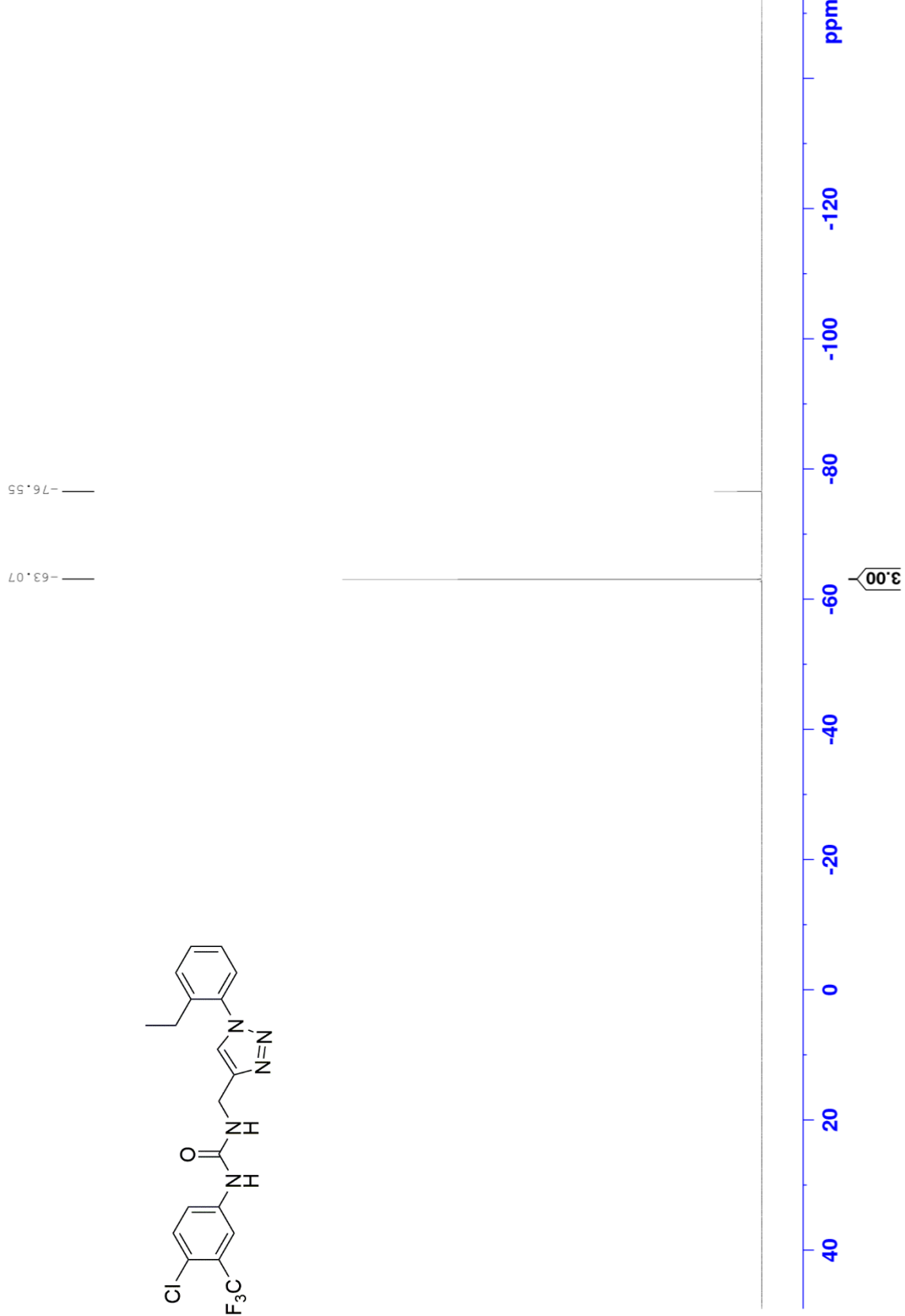
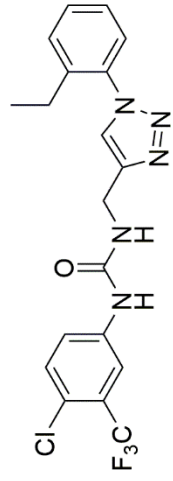
154.83
145.34
140.04
139.28
135.80
131.83
130.07
129.79
128.30
127.25
126.90
126.84
126.44
126.34
126.04
124.68
124.57
122.40
121.56
121.54
121.07
117.45
116.35
116.28
116.20
116.12

40.35
40.07
39.79
39.51
39.23
38.95
38.68
34.85
23.74
14.82

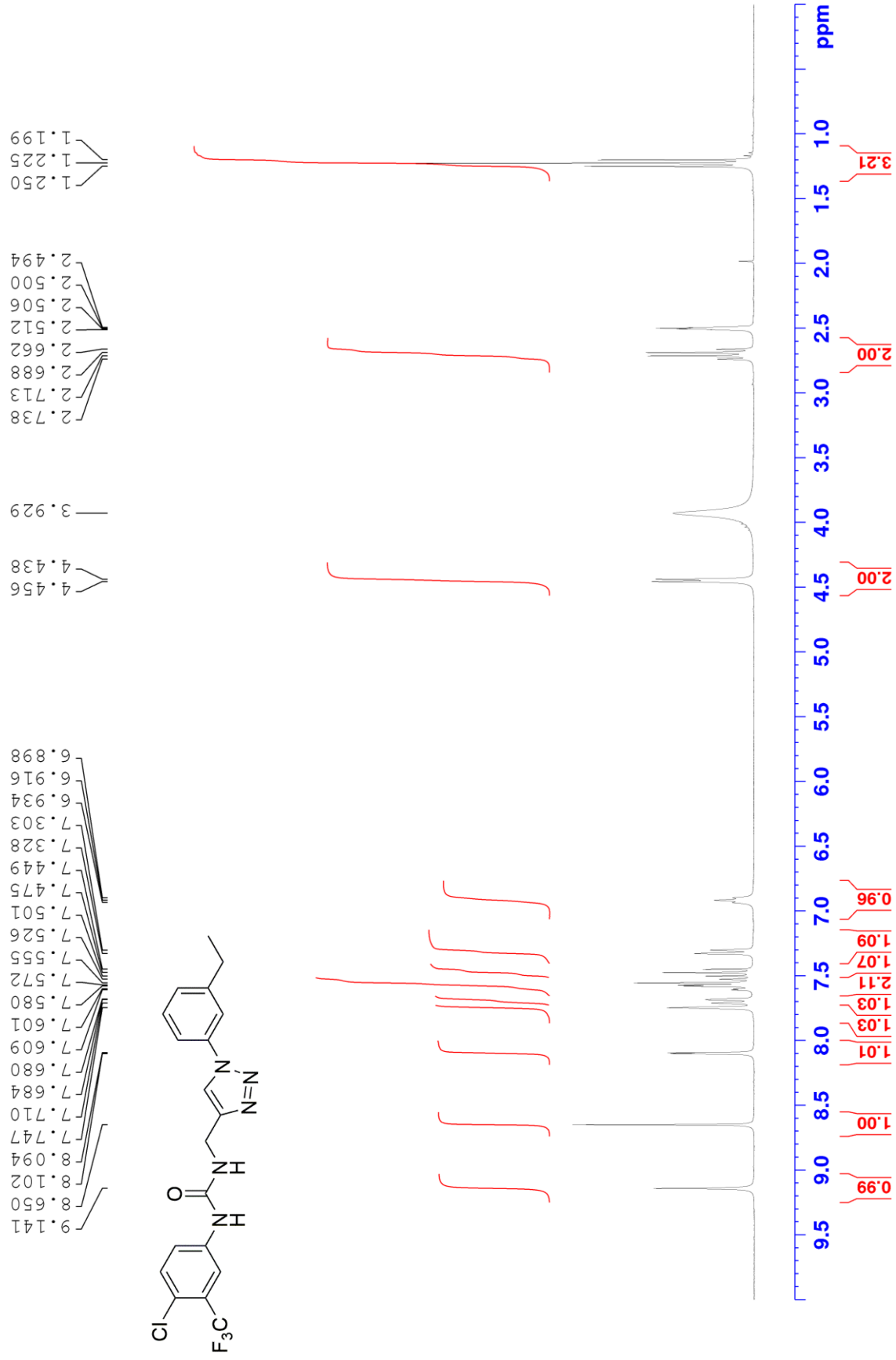


190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 ppm

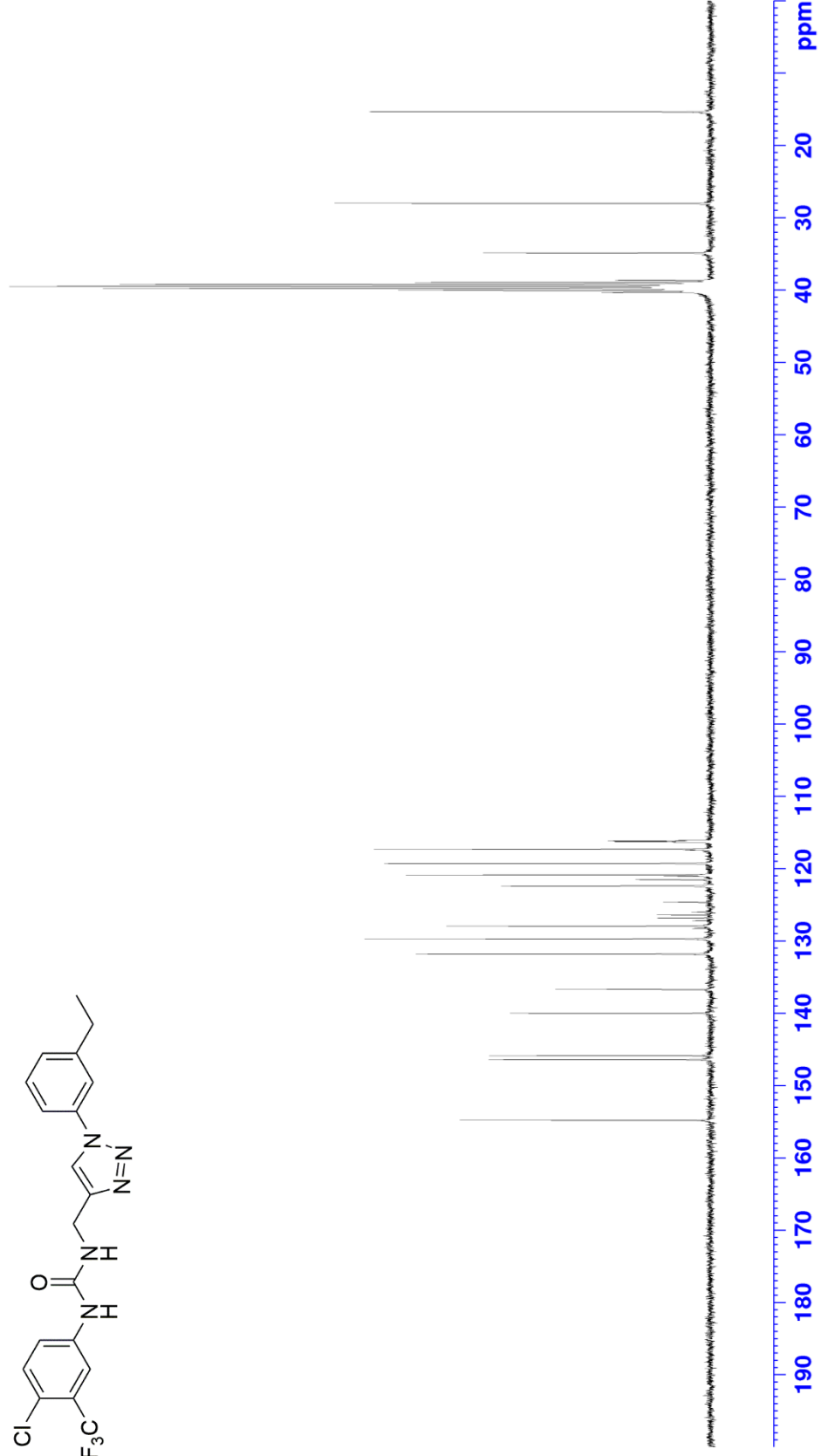
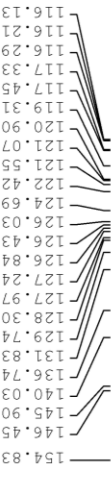
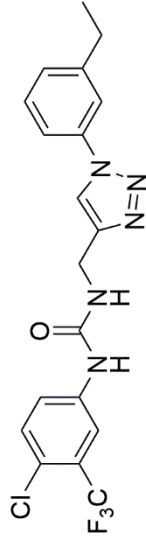
^{19}F NMR of compound **12f'** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



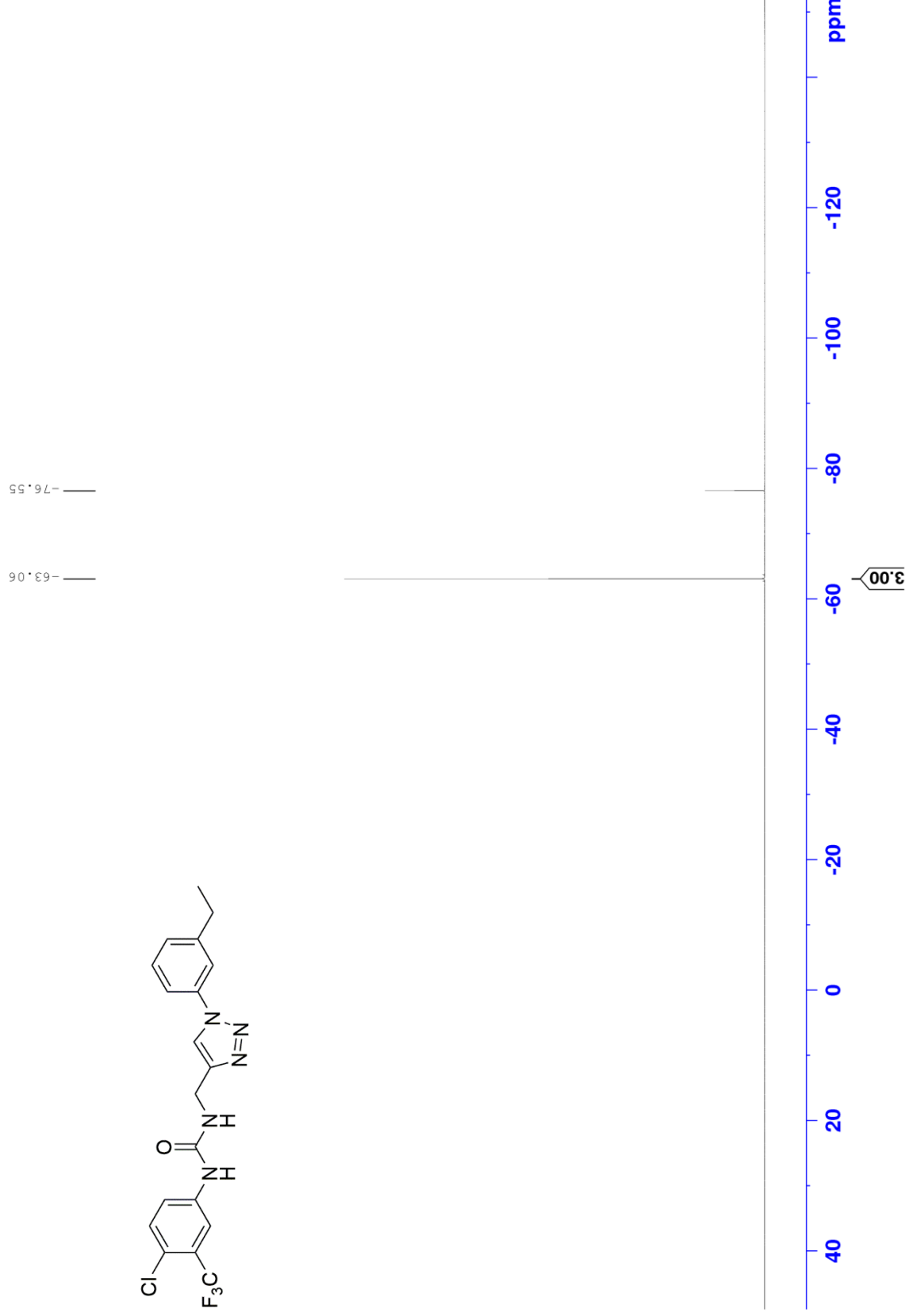
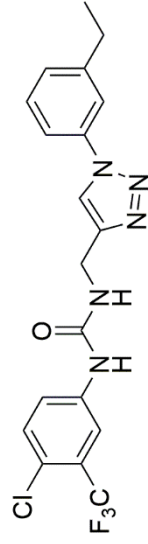
^1H NMR of compound **12g'** (300 MHz, DMSO-d_6)



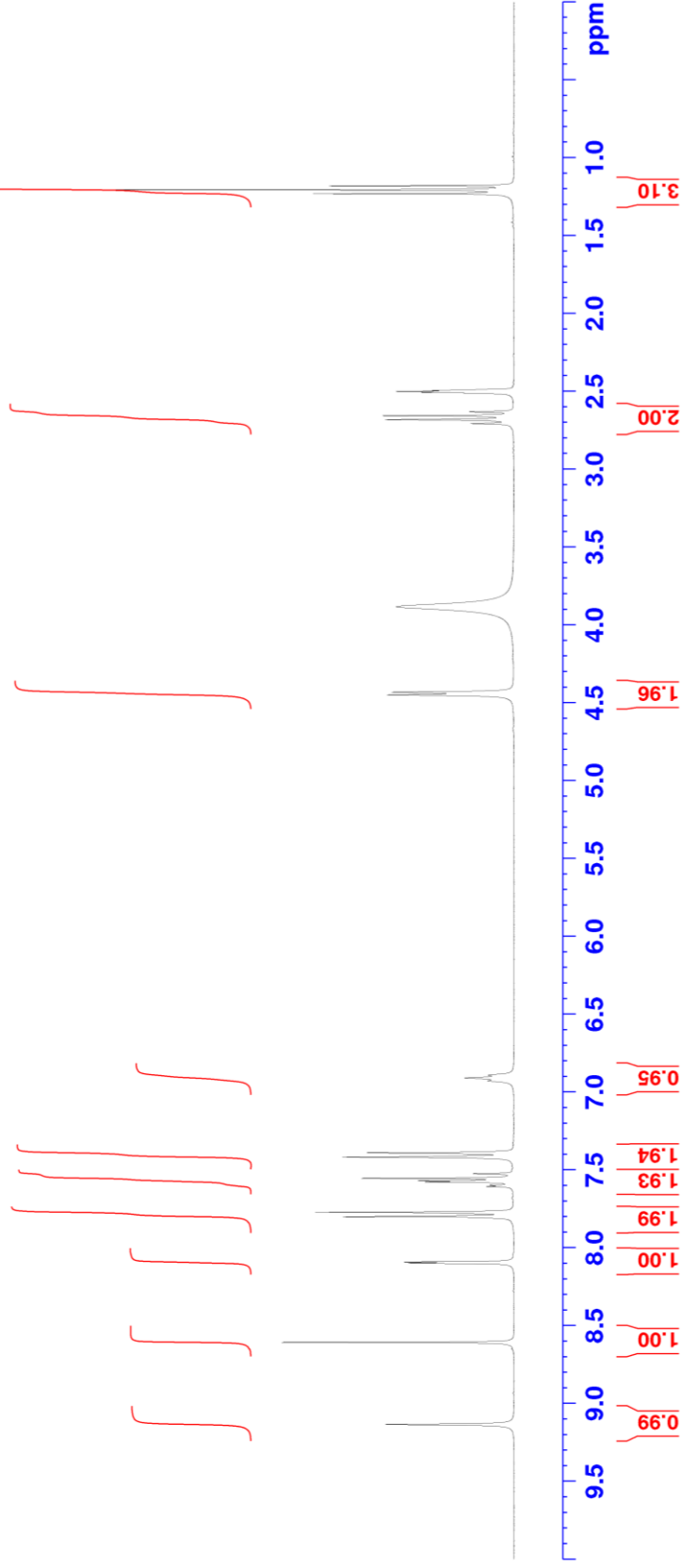
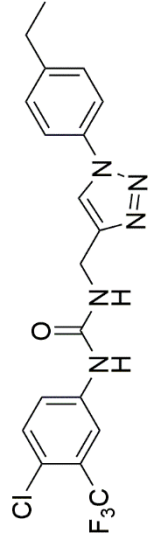
^{13}C NMR of compound **12g**^{*} (75 MHz, DMSO- d_6)



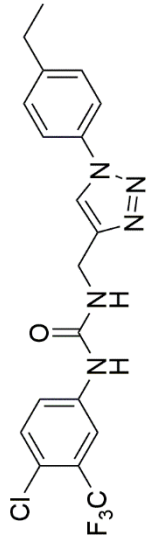
^{19}F NMR of compound **12g** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



¹H NMR of compound 12h' (300 MHz, DMSO-d₆)

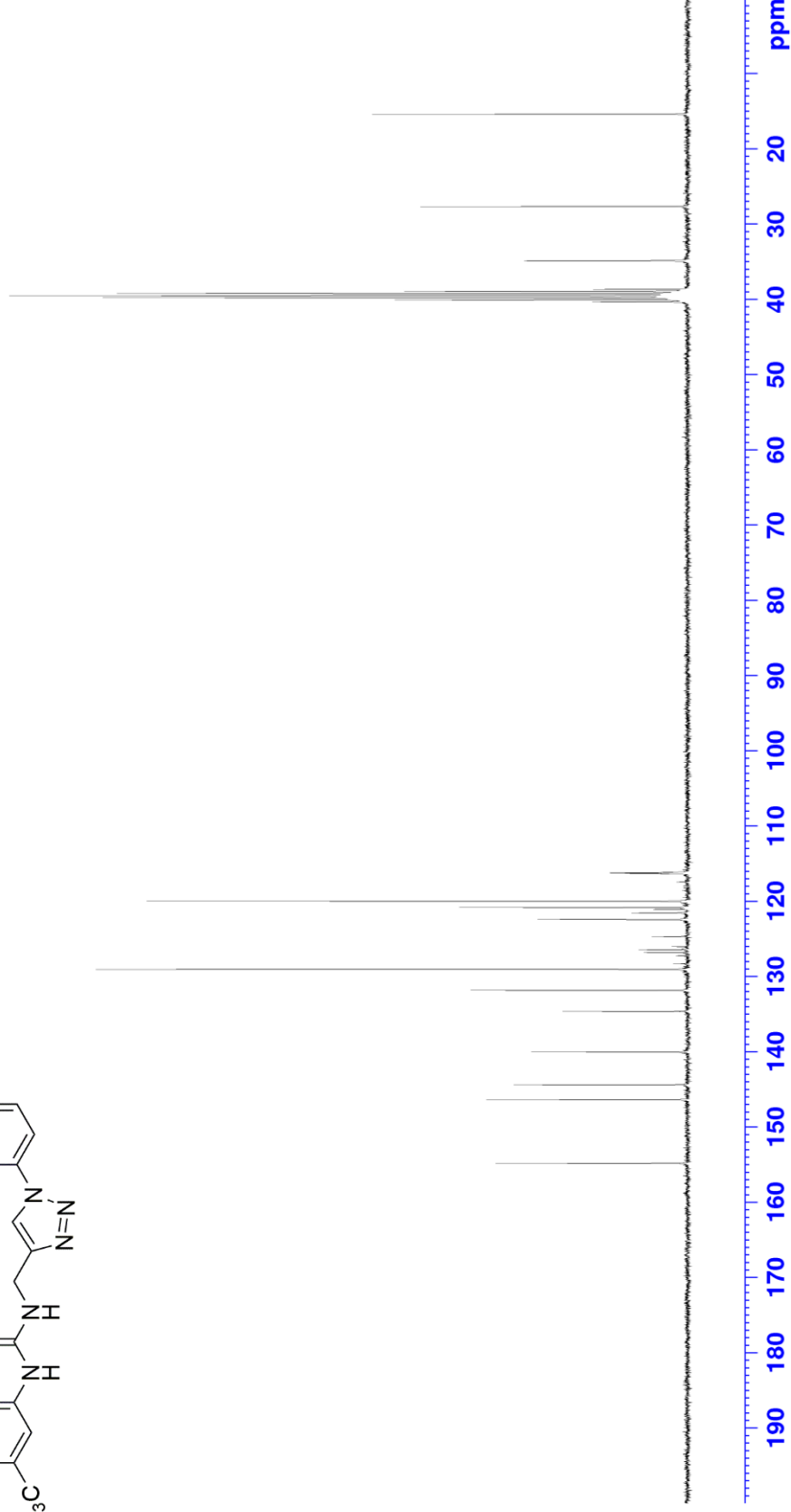


¹³C NMR of compound 12h' (75 MHz, DMSO-d₆)

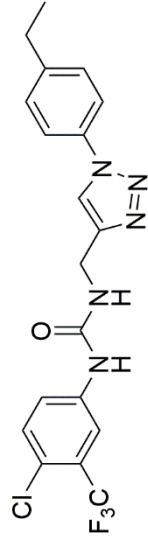


154.82
146.37
144.38
140.02
134.63
131.83
129.04
128.30
127.23
126.83
126.42
126.02
124.68
122.42
121.57
121.54
121.06
120.82
119.98
117.45
116.36
116.28
116.20
116.13

40.34
40.06
39.78
39.51
39.23
38.95
38.67
34.87
27.67
15.40



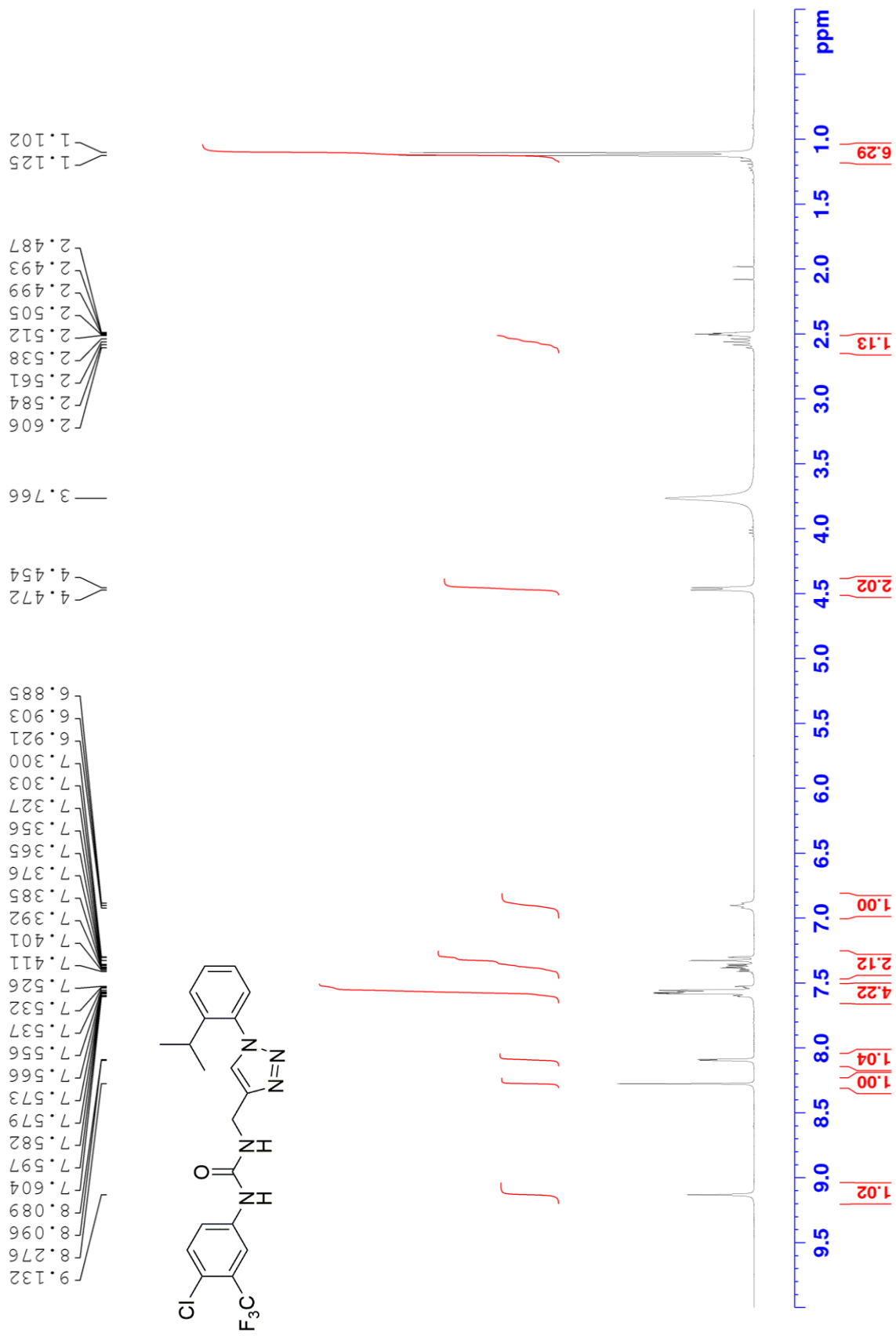
^{19}F NMR of compound **12h'** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



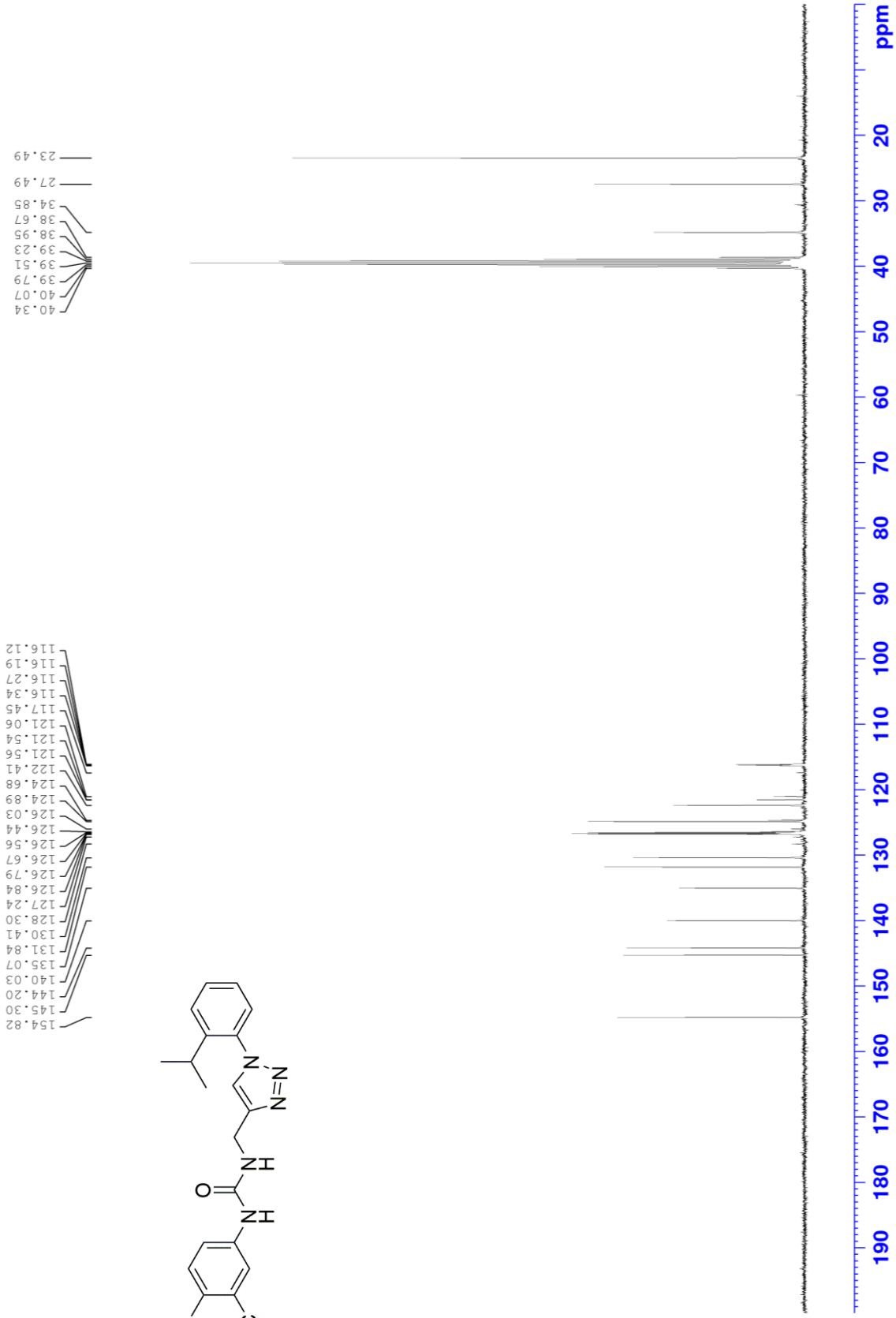
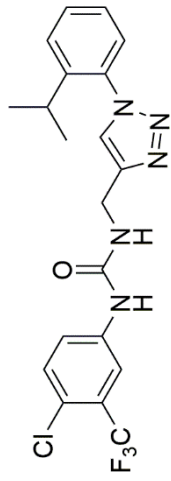
— -76.55
— -63.06



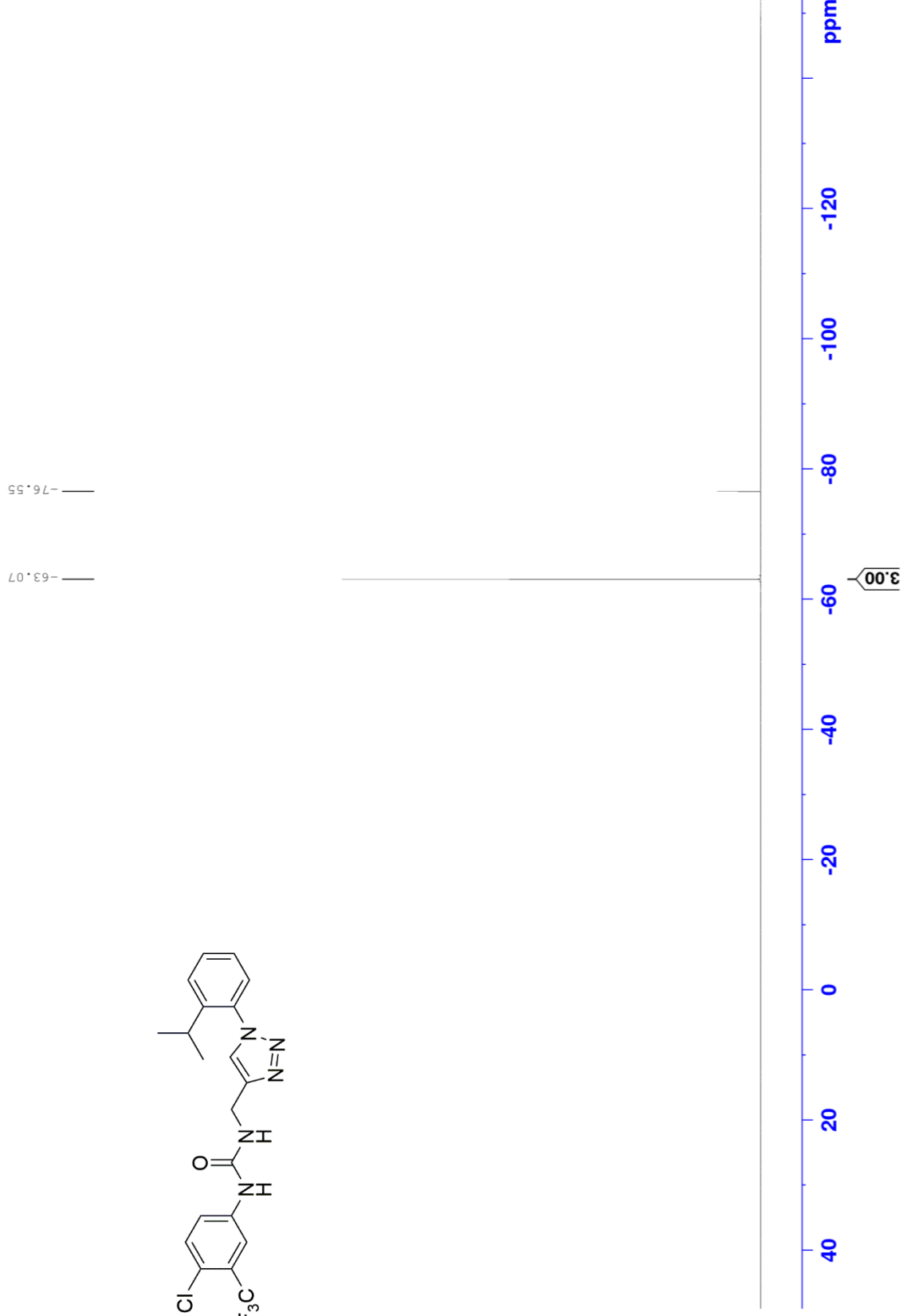
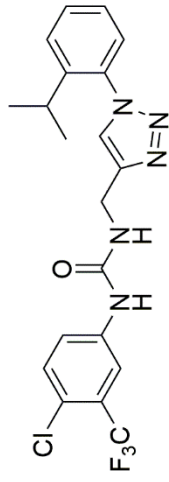
^1H NMR of compound **12i'** (300 MHz, DMSO-d_6)



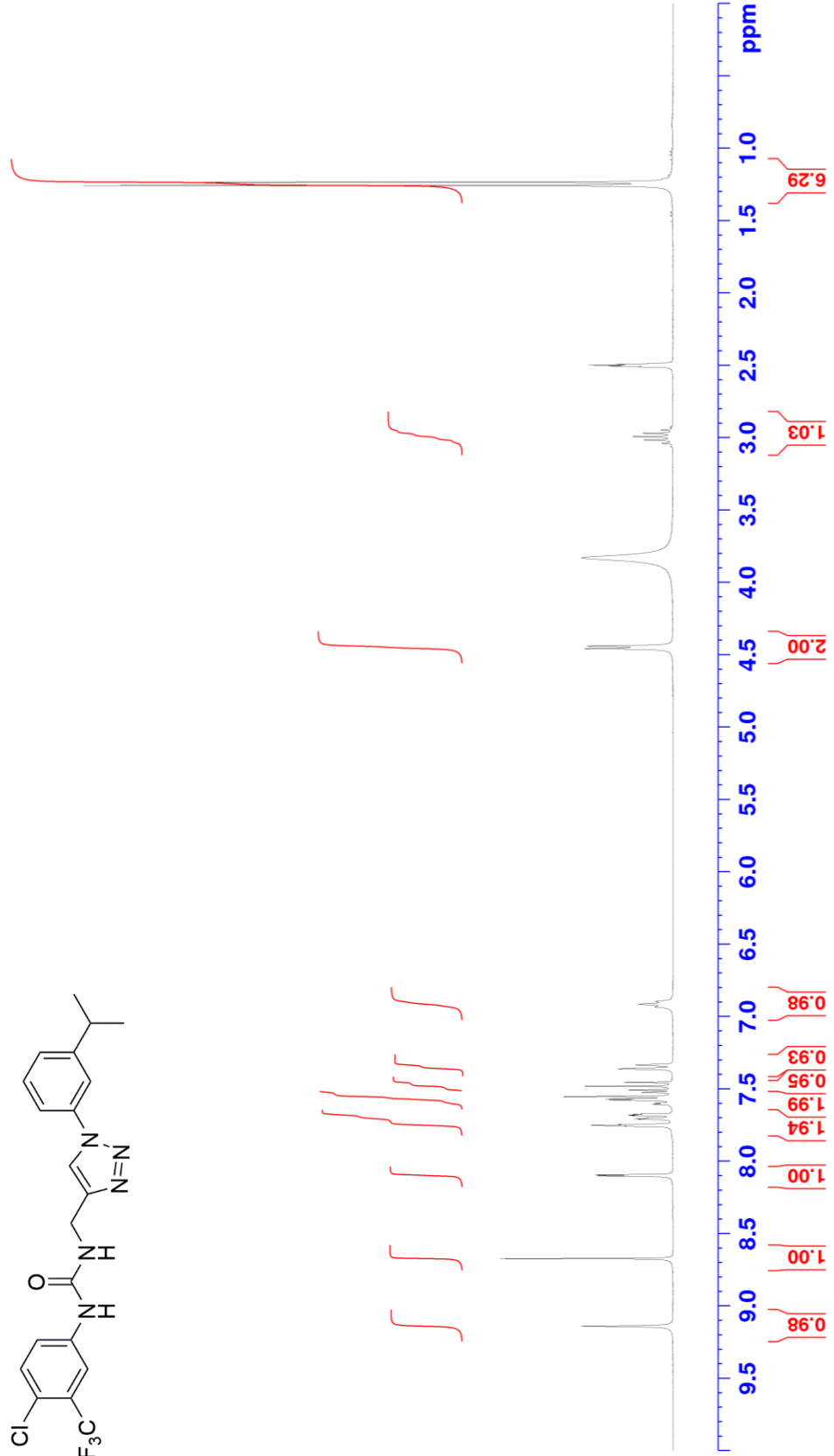
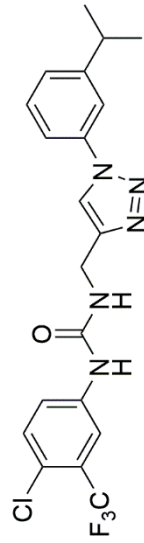
¹³C NMR of compound **12i'** (75 MHz, DMSO-d₆)



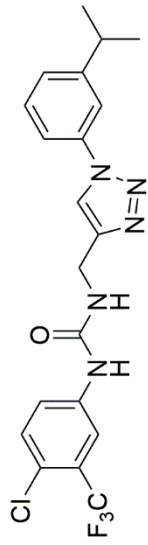
^{19}F NMR of compound **12i'** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



^1H NMR of compound **12j*** (300 MHz, DMSO-d_6)

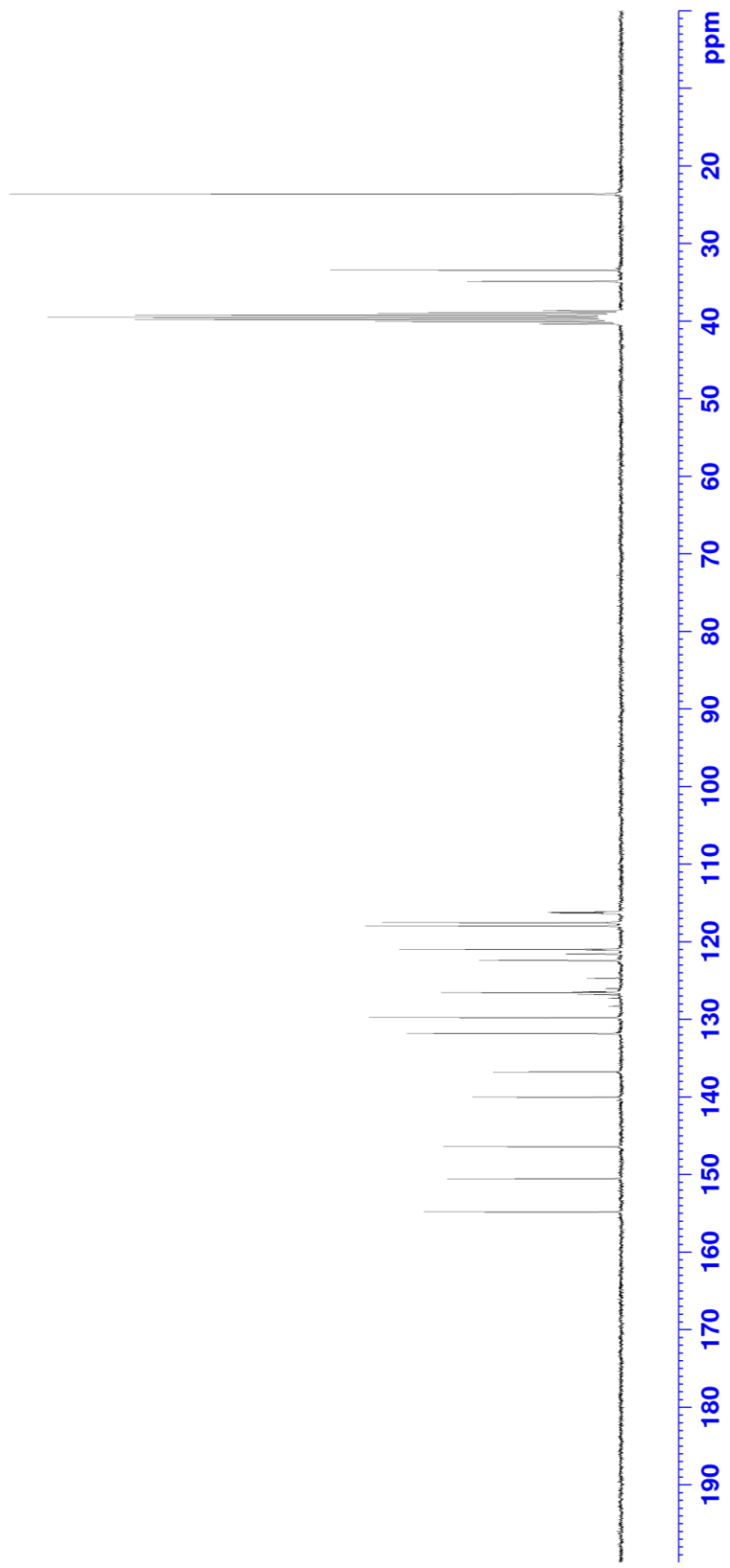


^{13}C NMR of compound **12j'** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

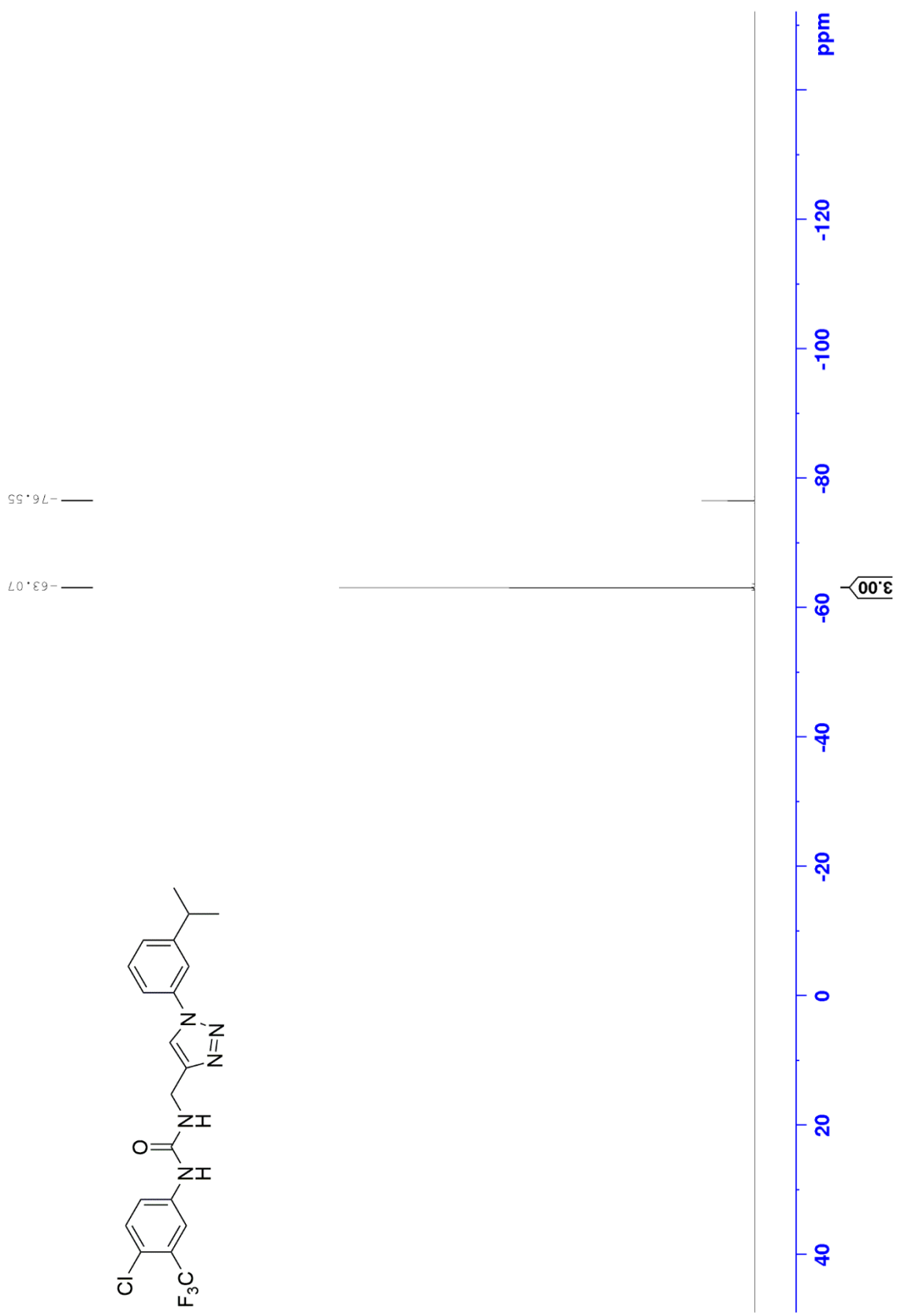
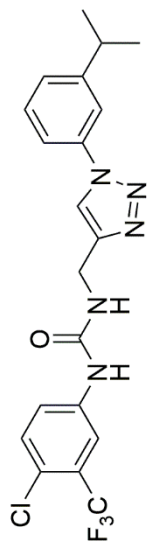


154.82
150.55
146.42
140.03
136.77
131.83
129.76
128.30
127.25
126.84
126.54
126.44
126.04
124.68
122.42
121.58
121.56
121.07
120.98
117.97
117.54
117.45
116.36
116.29
116.21
116.14

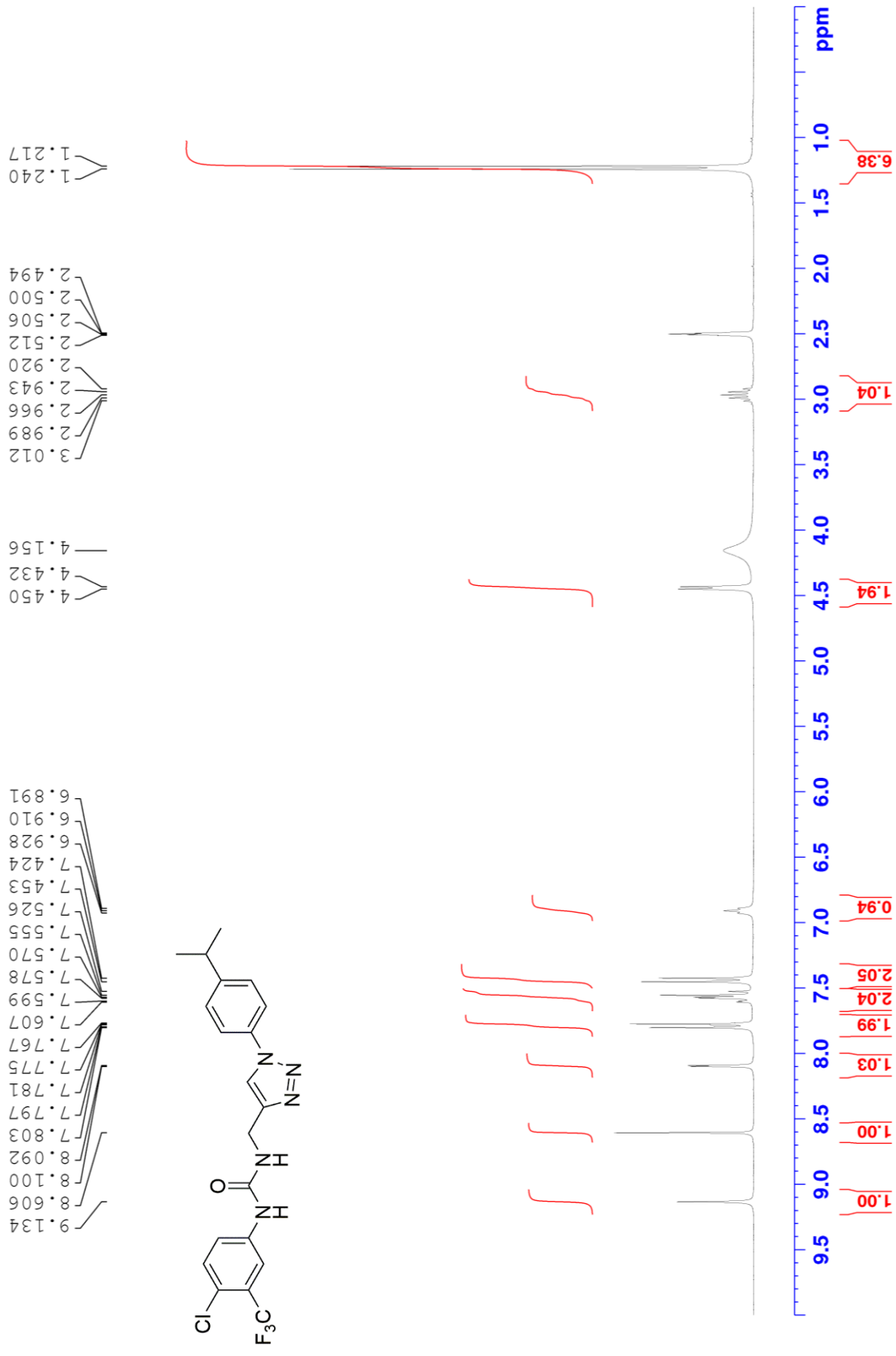
40.34
40.06
39.79
39.51
39.23
38.95
38.67
34.87
33.43
23.61



^{19}F NMR of compound **12j'** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



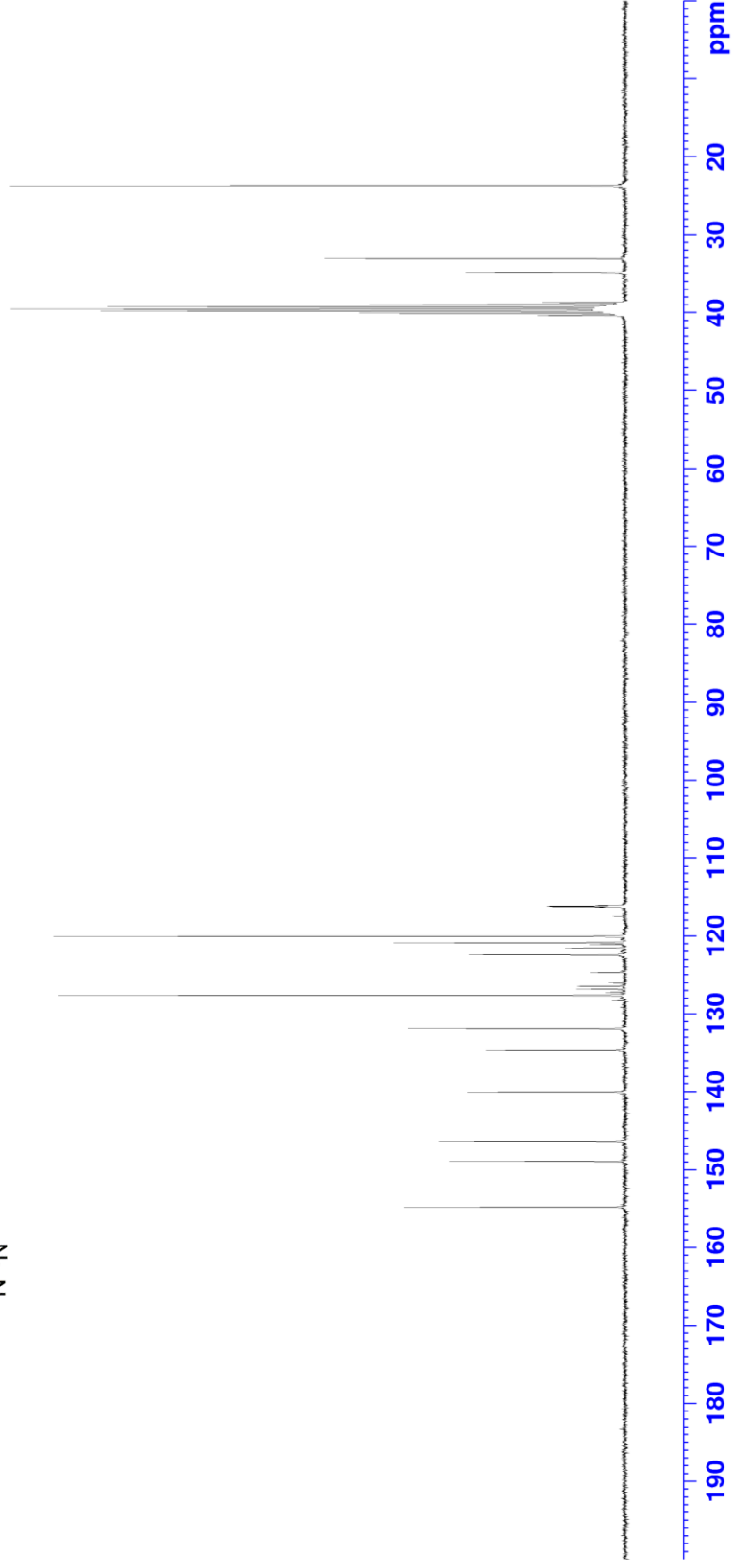
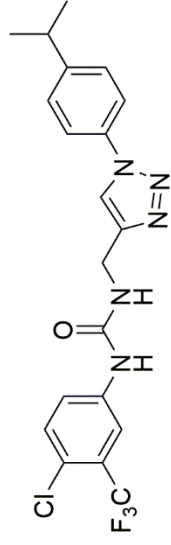
^1H NMR of compound **12k'** (300 MHz, DMSO-d_6)



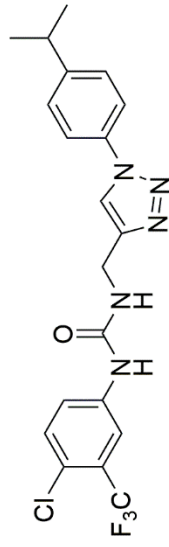
¹³C NMR of compound 12k* (75 MHz, DMSO-d₆)

154.83
148.95
146.37
140.05
134.71
131.85
128.31
127.62
127.25
126.85
126.44
126.04
124.70
122.42
121.57
121.55
121.08
120.86
120.05
117.46
116.36
116.28
116.21
116.13

40.34
40.06
39.79
39.51
39.23
38.95
38.67
34.88
33.08
23.69

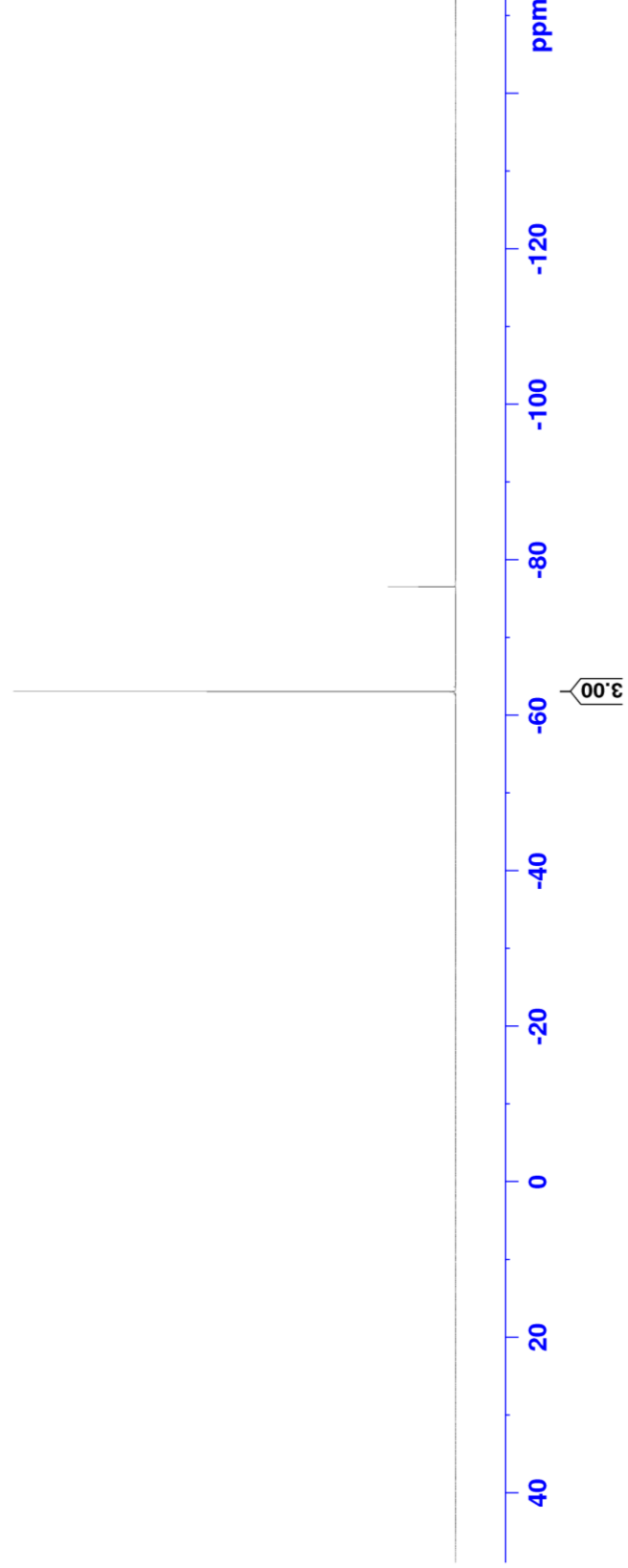


^{19}F NMR of compound **12k'** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

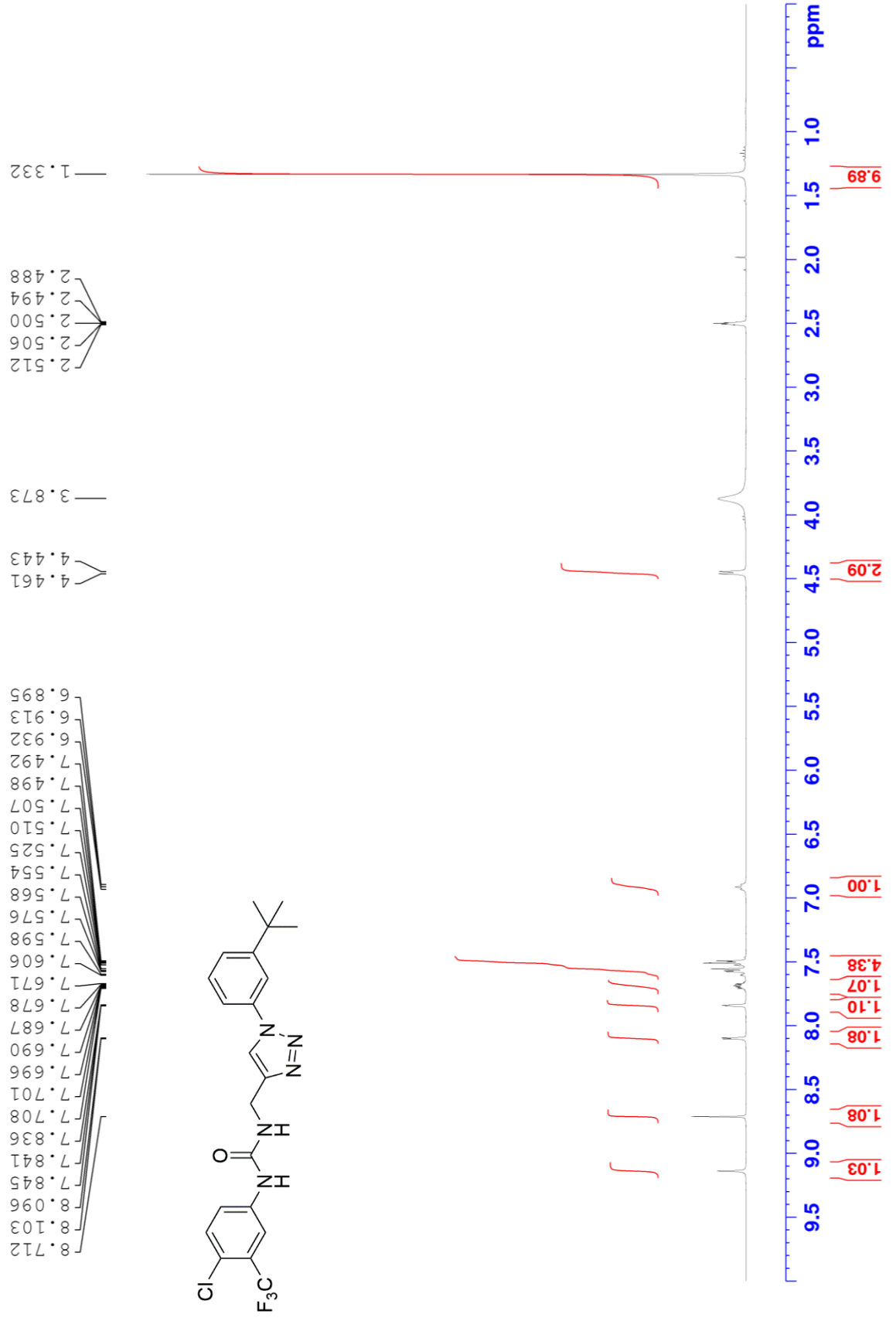


— -76.55

— -63.06

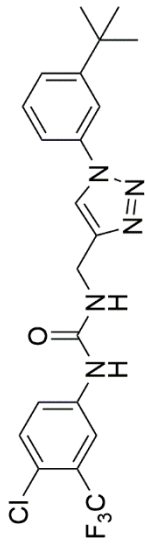


¹H NMR of compound **12l'** (300 MHz, DMSO-d₆)

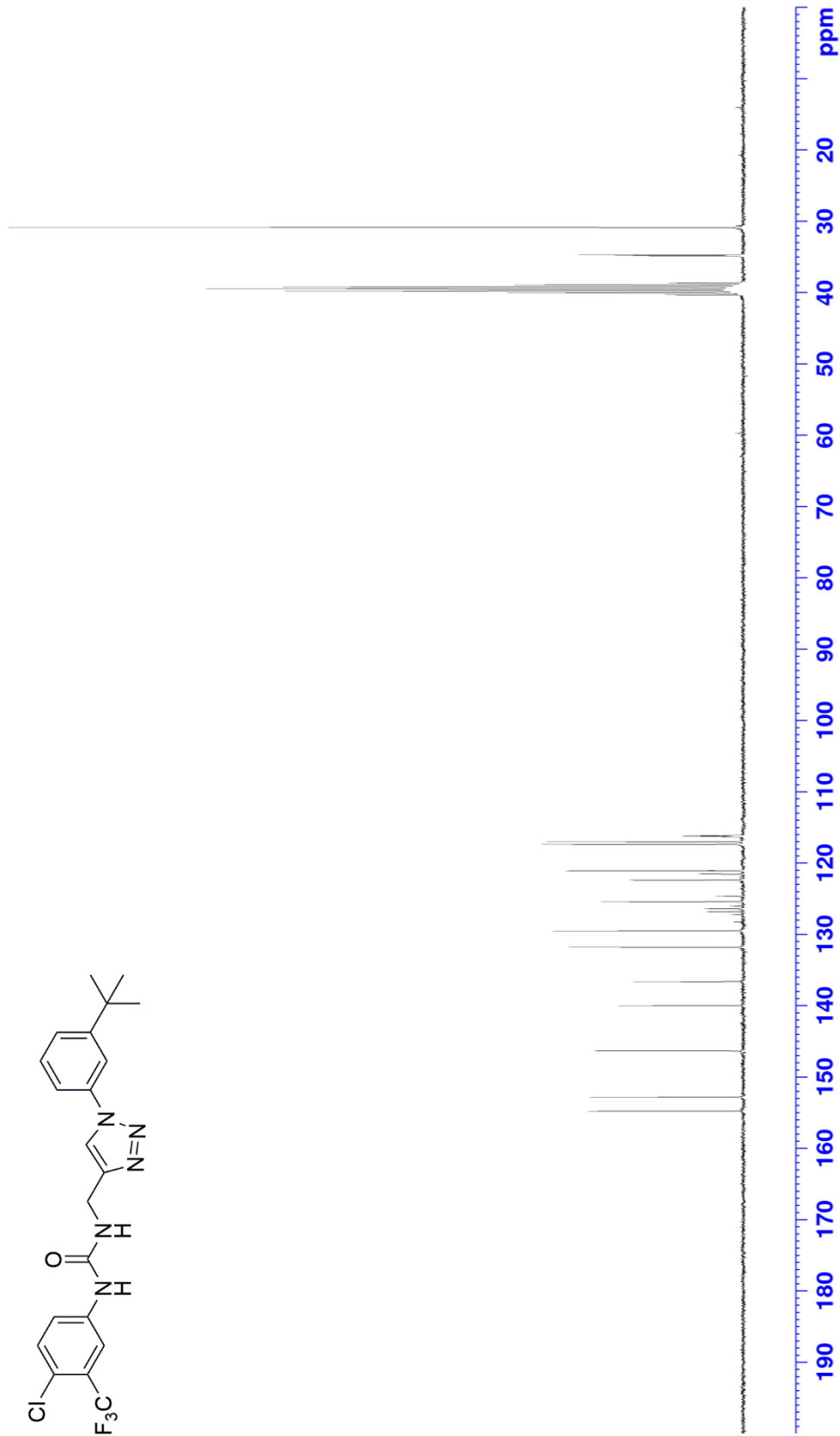


^{13}C NMR of compound **12l'** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

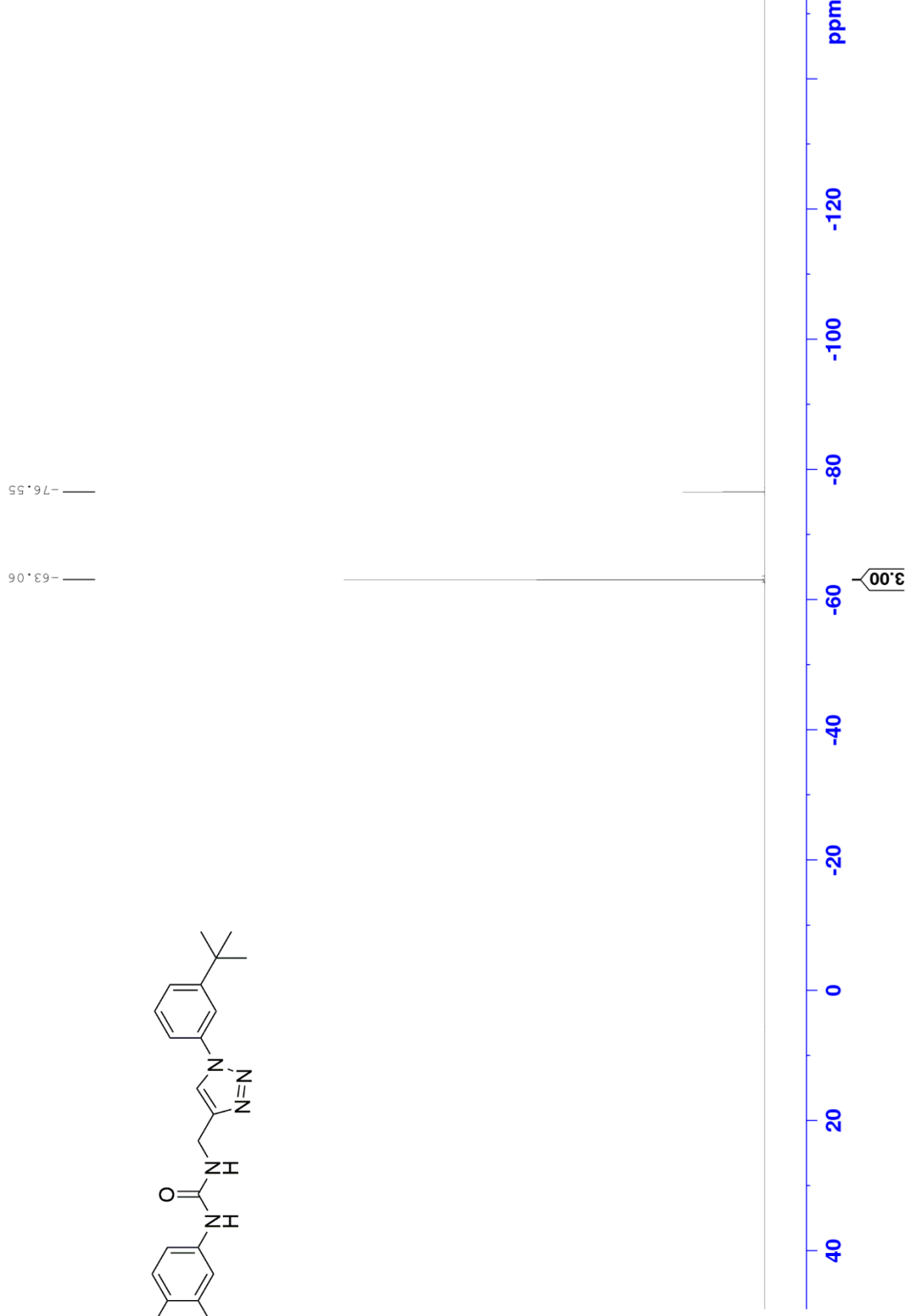
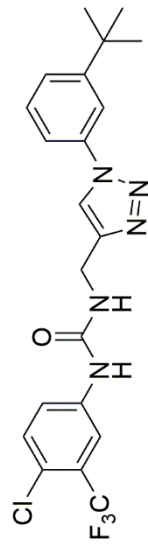
154.80
152.84
146.36
140.02
136.63
131.83
129.52
128.29
127.24
126.83
126.43
126.02
125.44
124.67
122.40
121.56
121.54
121.11
121.06
117.39
117.03
116.35
116.27
116.20
116.12



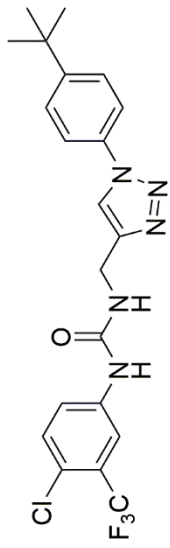
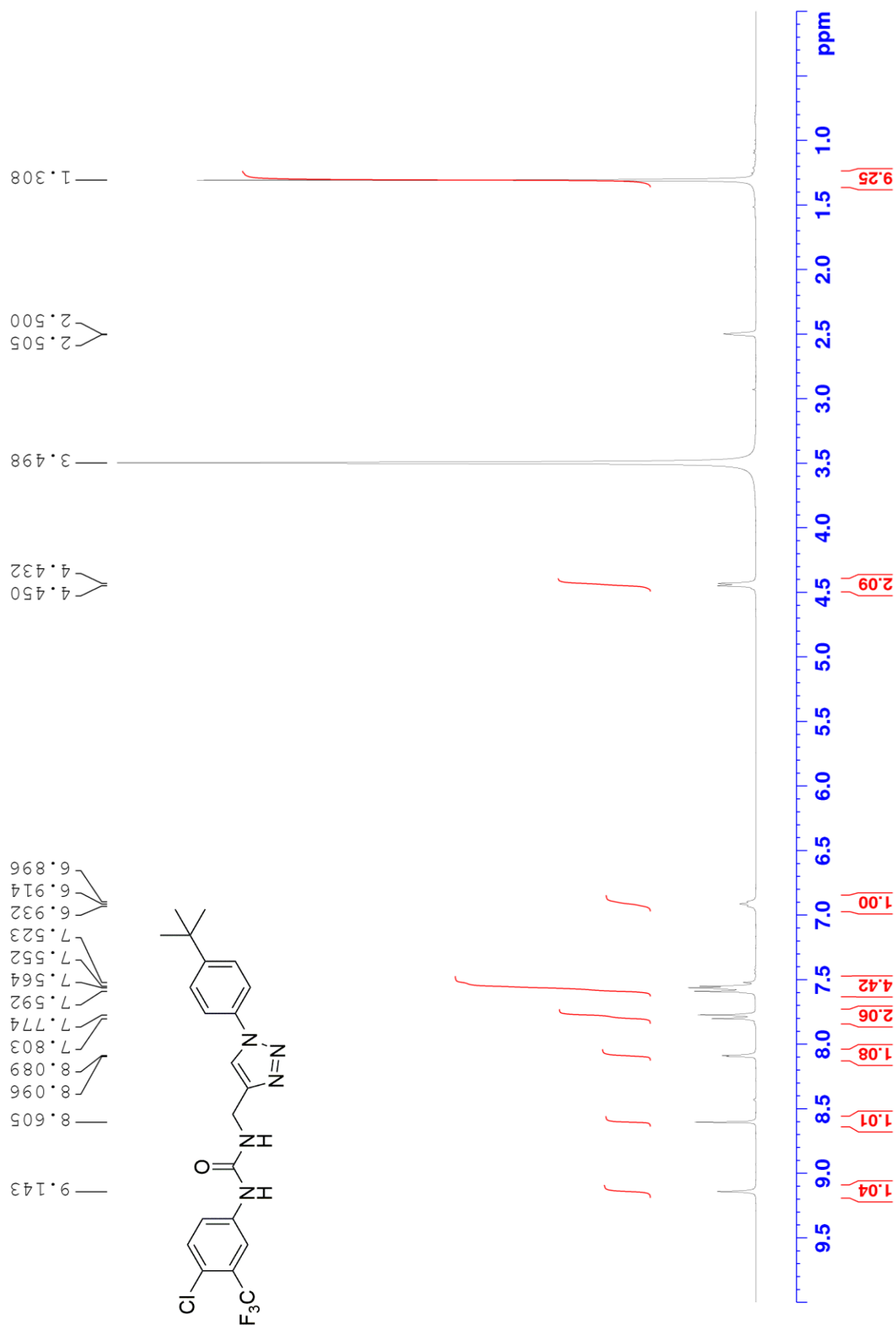
40.34
39.78
40.06
39.50
39.23
38.95
38.67
34.85
34.74
34.74
30.90



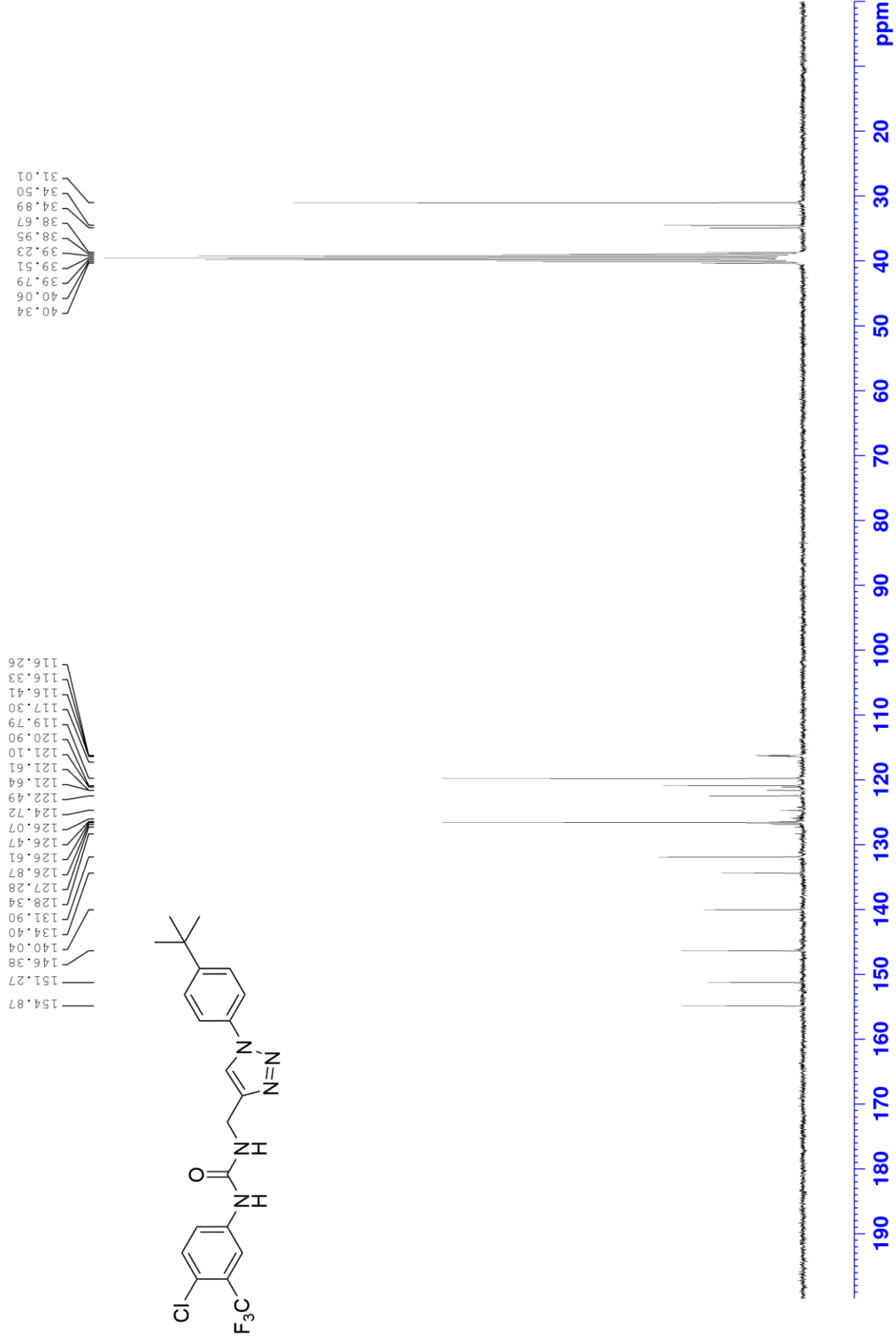
^{19}F NMR of compound **12l'** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



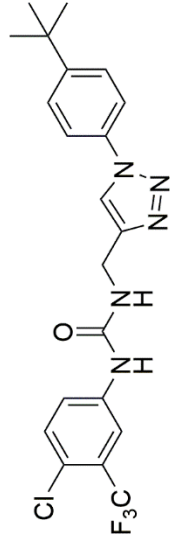
^1H NMR of compound **12m'** (300 MHz, DMSO-d_6)



^{13}C NMR of compound **12m'** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

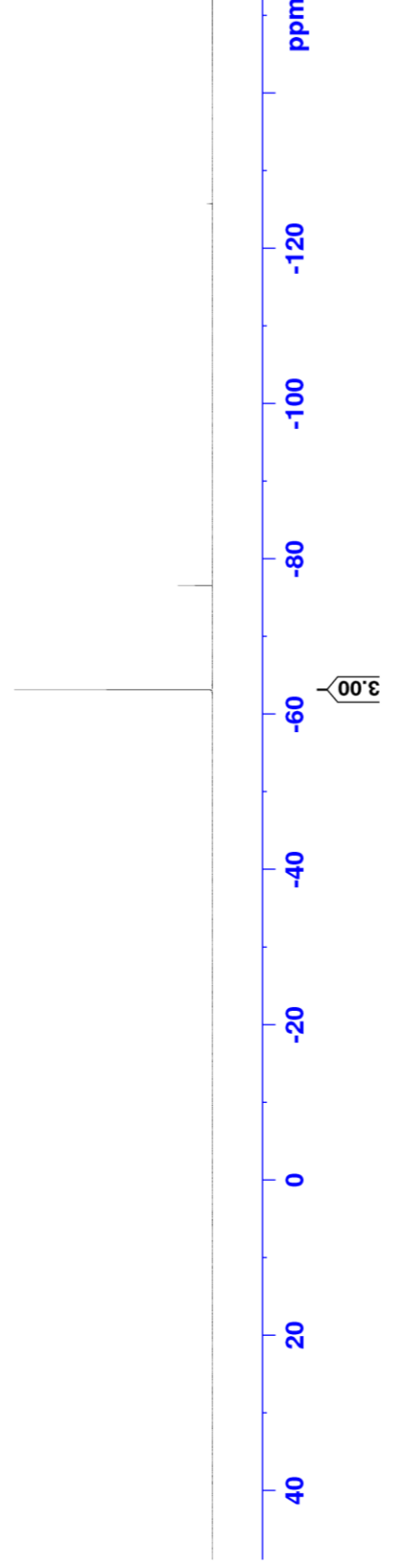


^{19}F NMR of compound **12m'** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

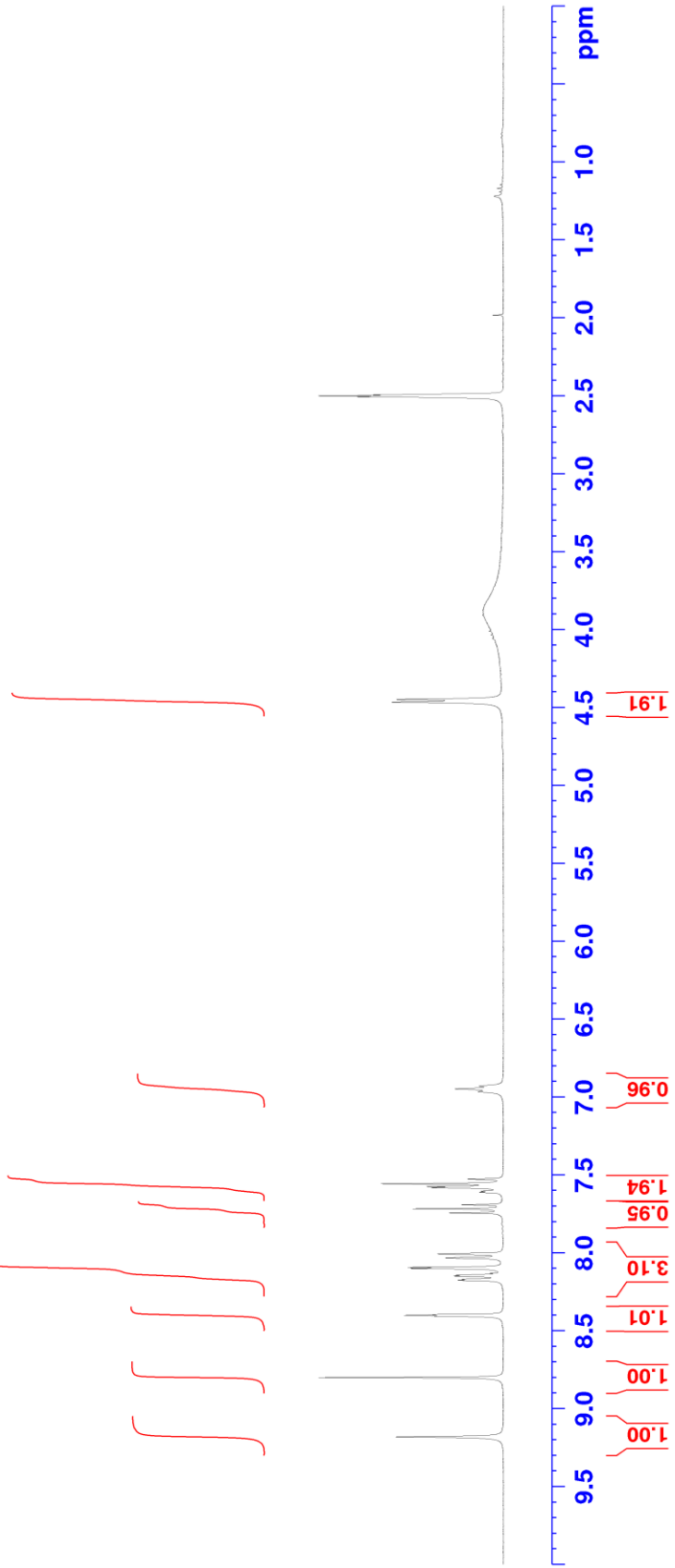
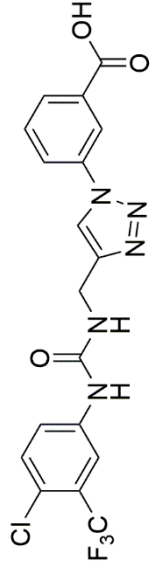
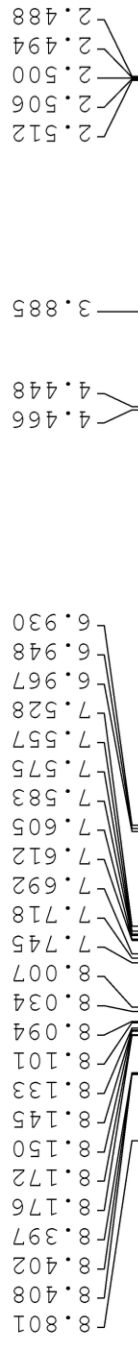


— -63.15

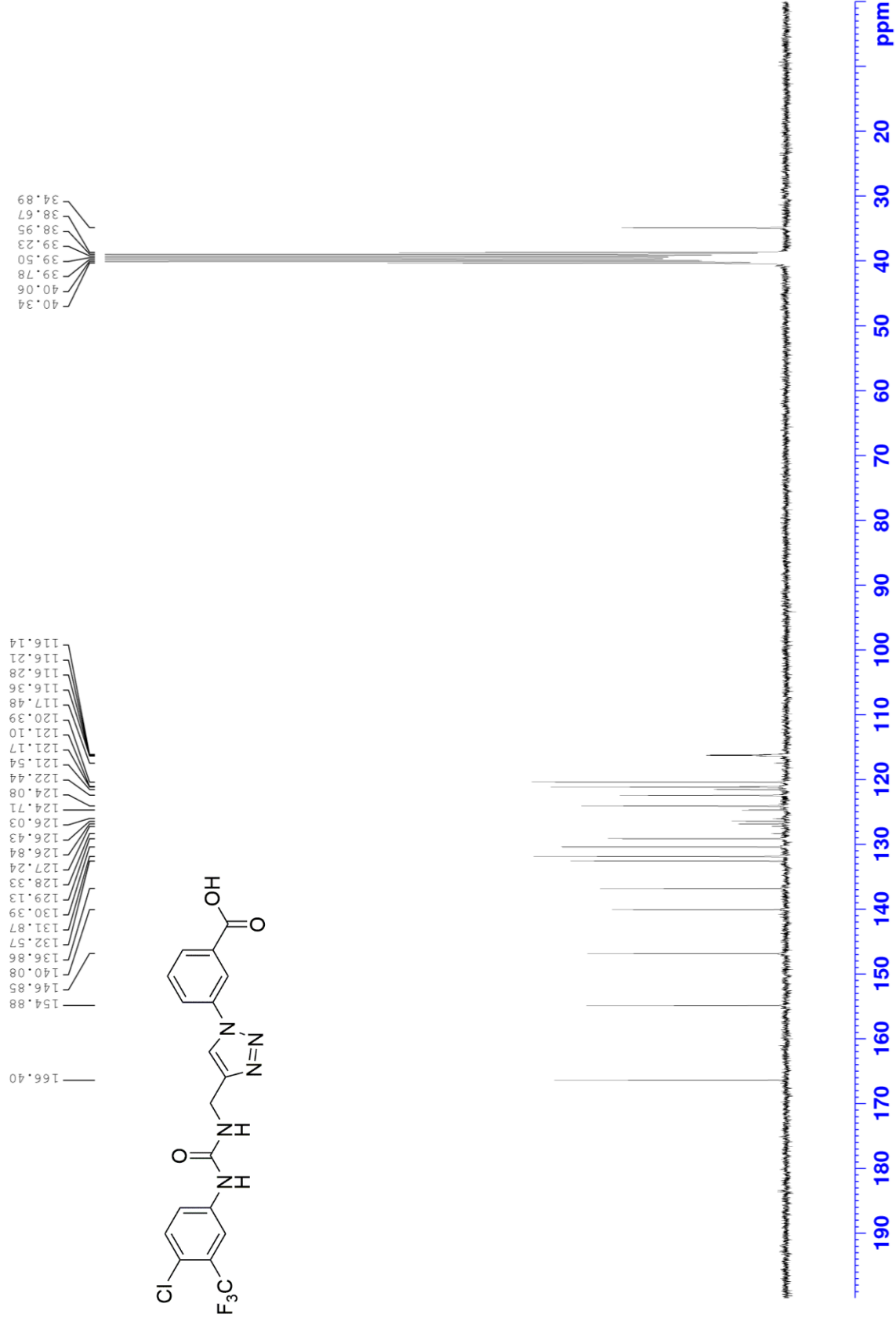
— -76.55



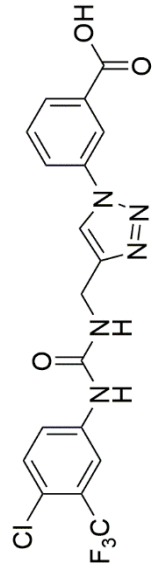
^1H NMR of compound **12n'** (300 MHz, DMSO-d_6)



^{13}C NMR of compound **12n'** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



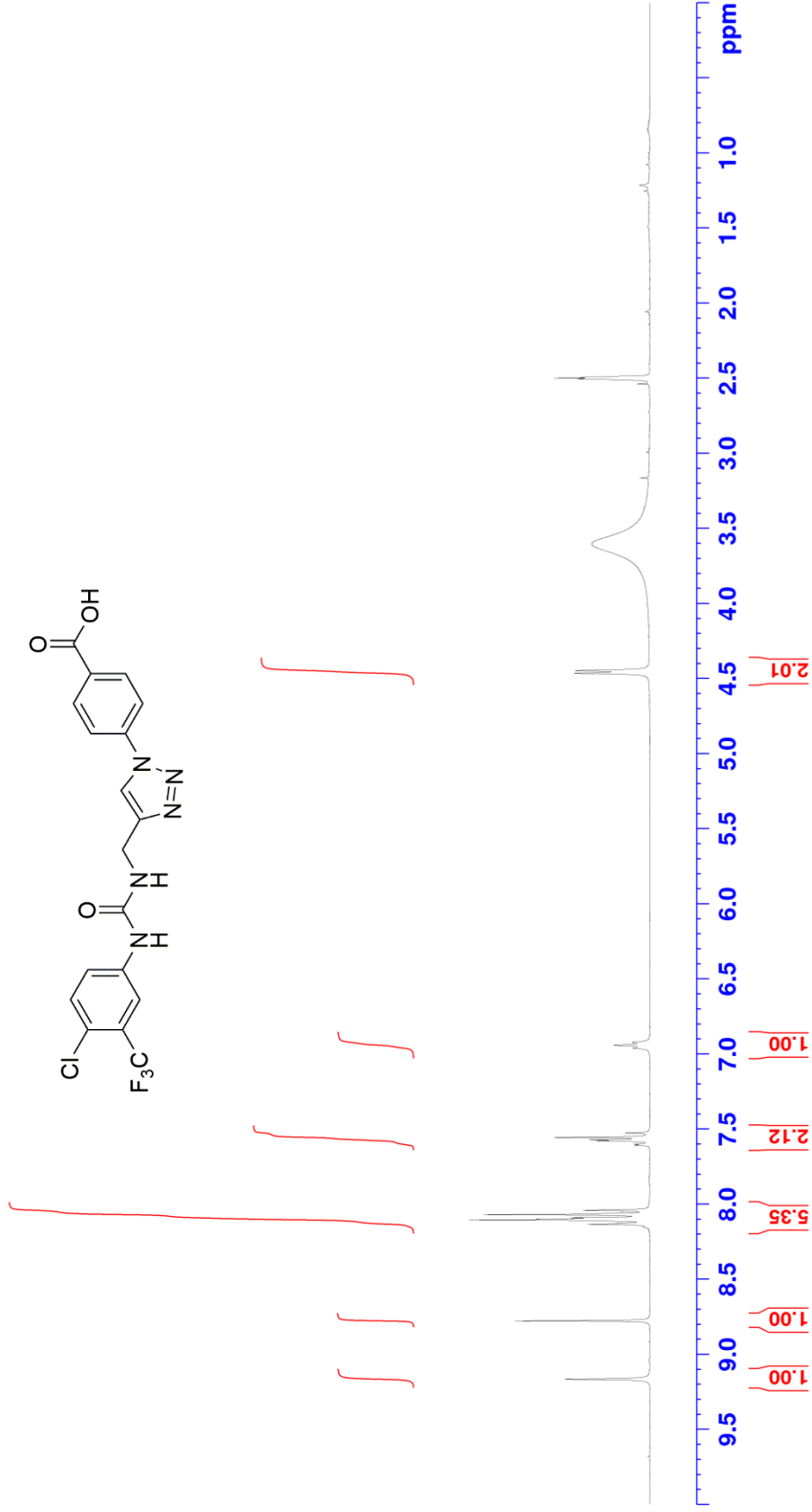
^{19}F NMR of compound **12n'** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



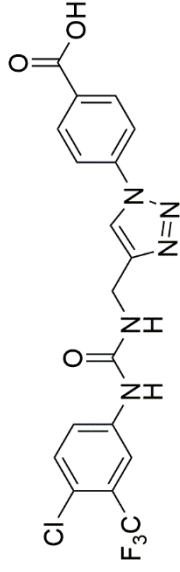
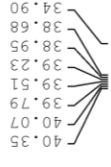
— -76.55
— -63.42



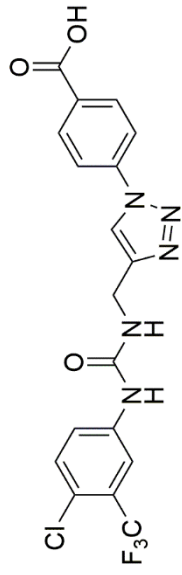
^1H NMR of compound **12o'** (300 MHz, DMSO-d_6)



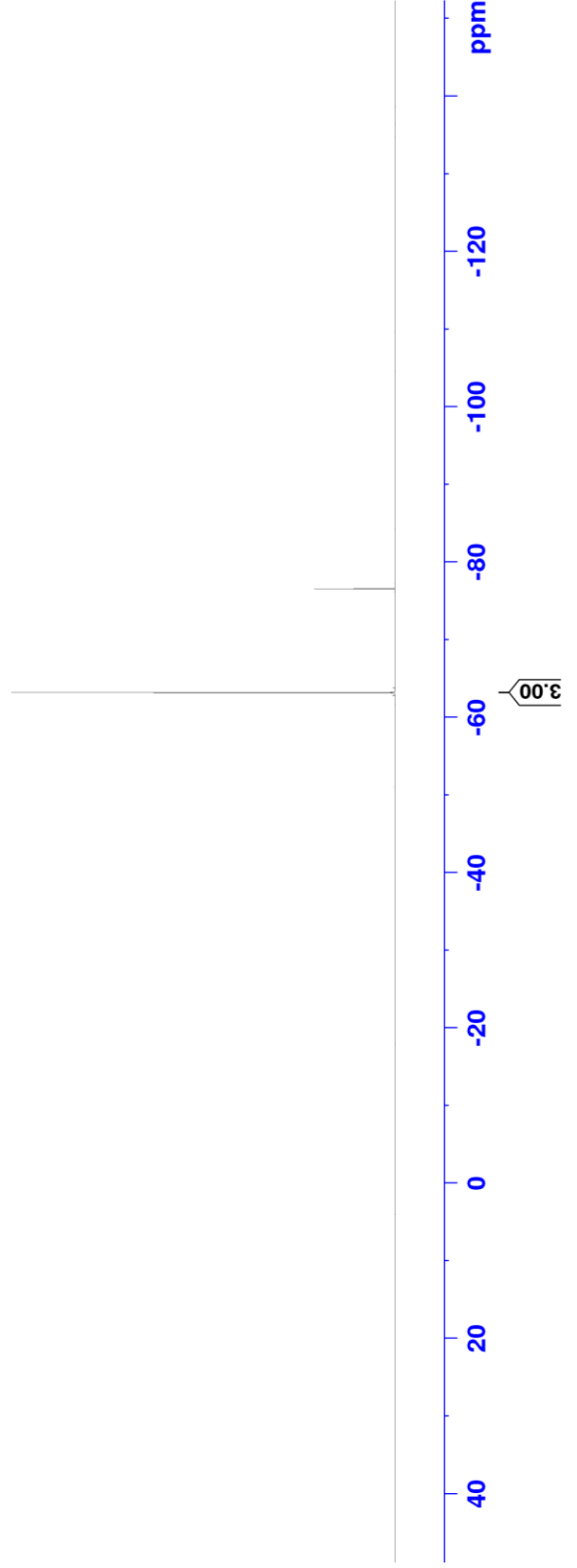
¹³C NMR of compound **12o'** (75 MHz, DMSO-d₆)



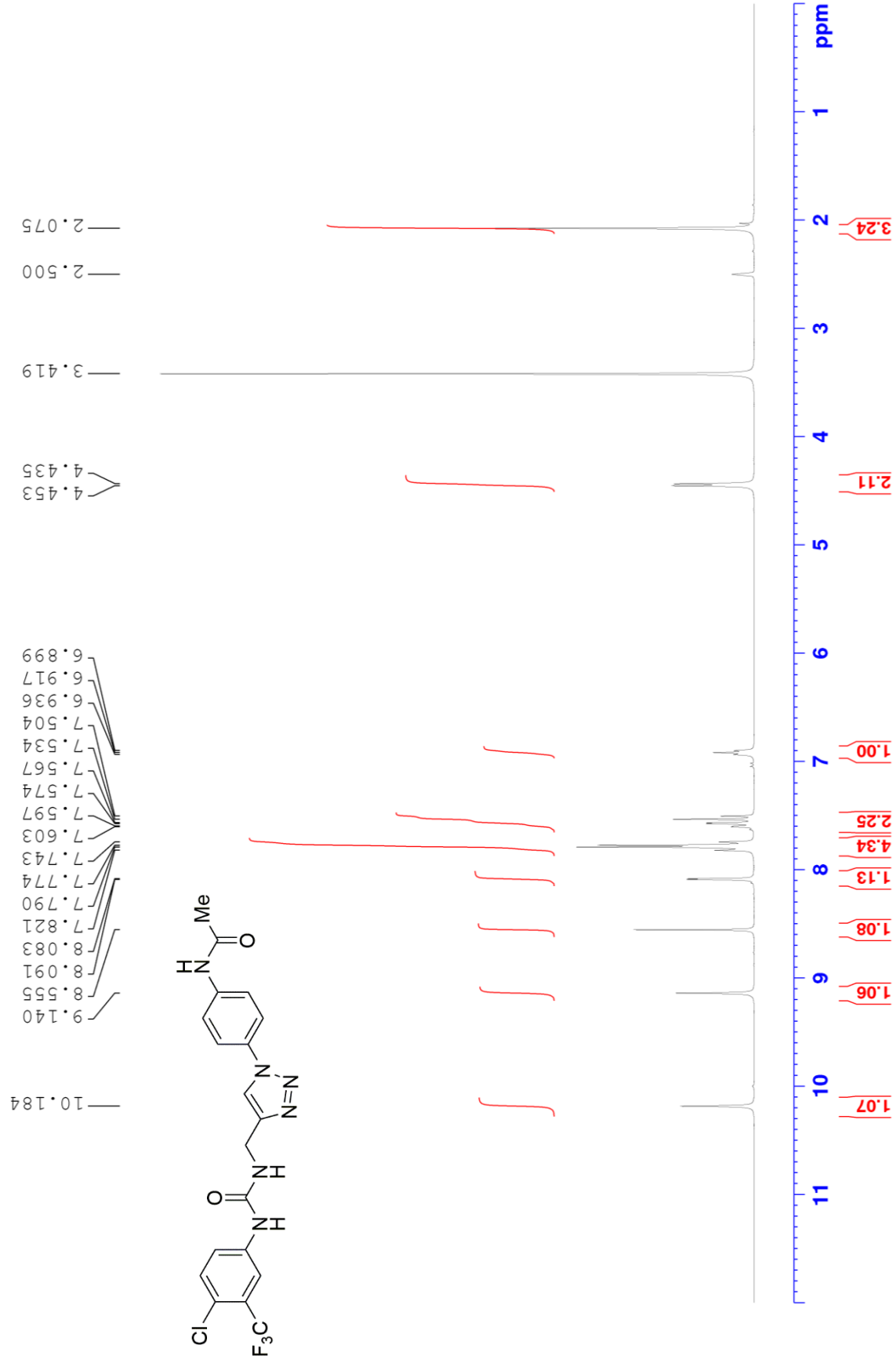
^{19}F NMR of compound **12o'** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



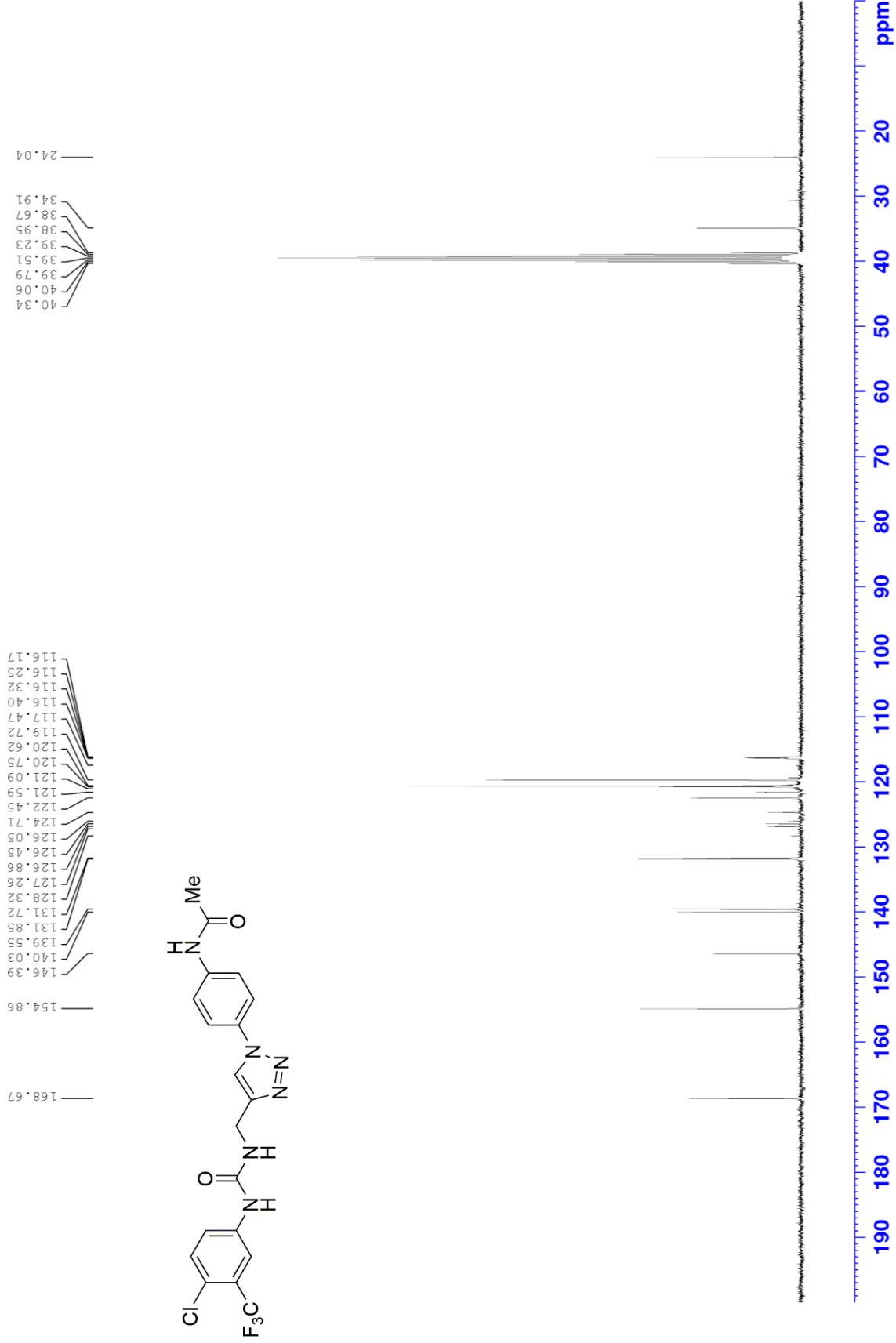
-76.55
-63.17



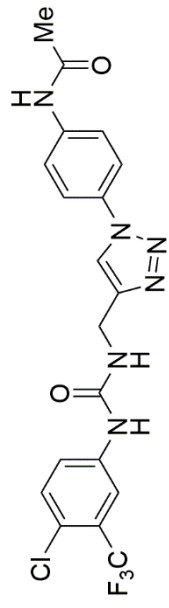
^1H NMR of compound **12p'** (300 MHz, DMSO-d_6)



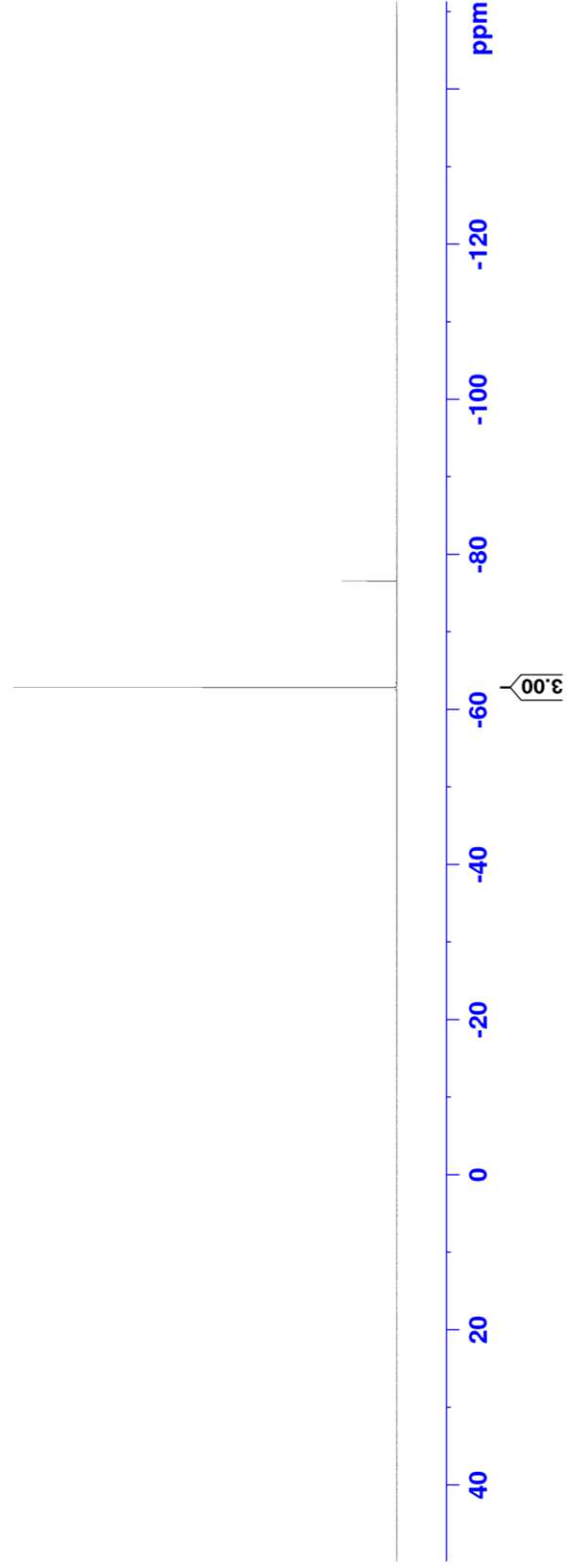
^{13}C NMR of compound **12p'** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



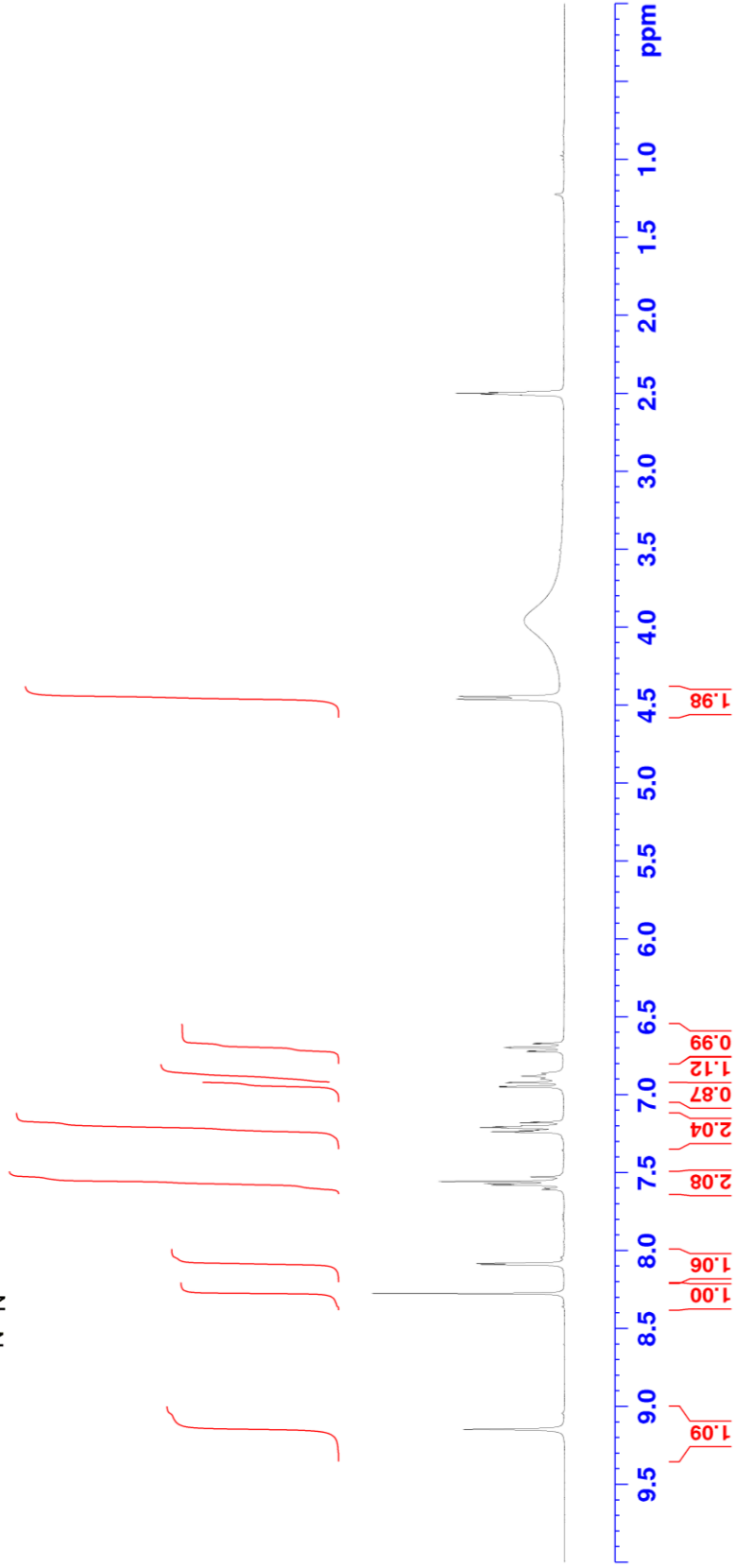
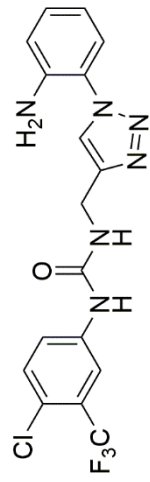
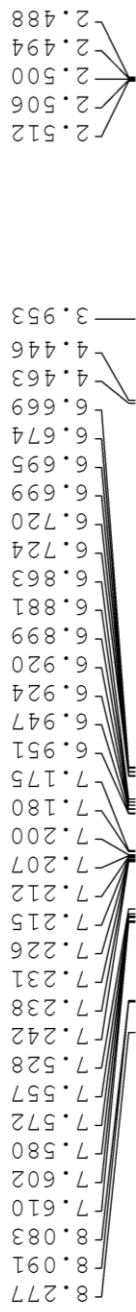
^{19}F NMR of compound **12p** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



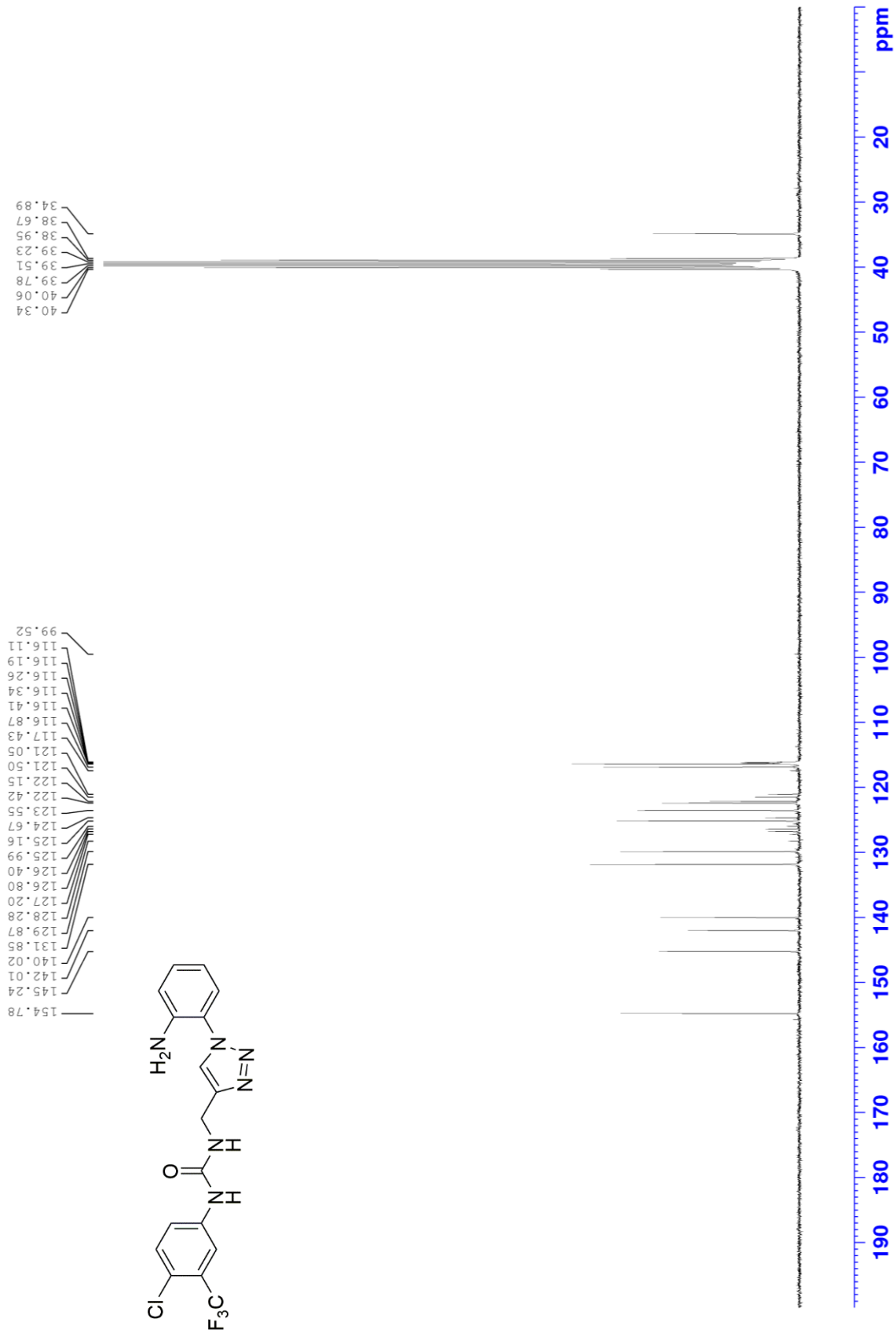
— -76.55
— -62.82



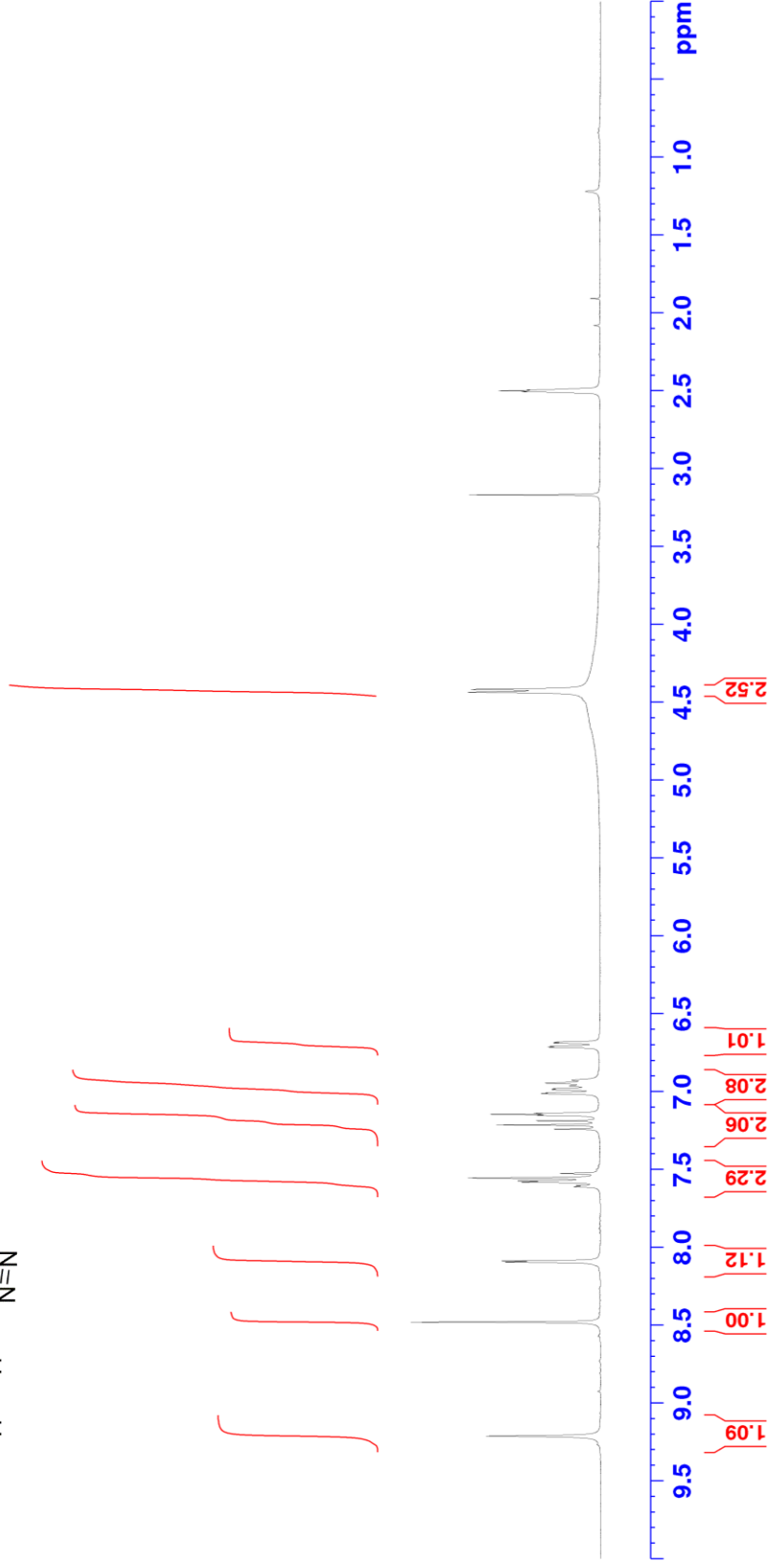
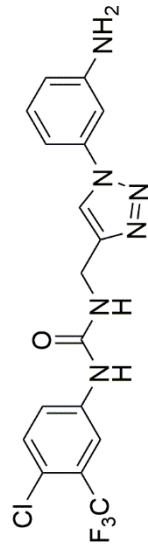
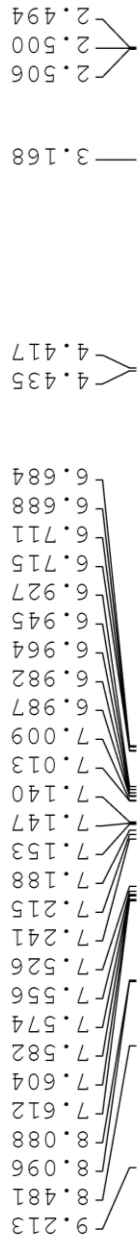
¹H NMR of compound **12q'** (300 MHz, DMSO-d₆)



¹³C NMR of compound **12q'** (75 MHz, DMSO-d₆)

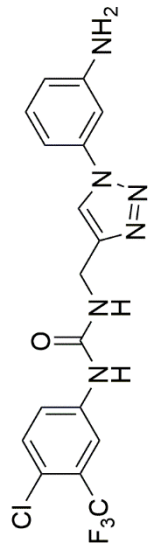


^1H NMR of compound **12r'** (300 MHz, DMSO- d_6)

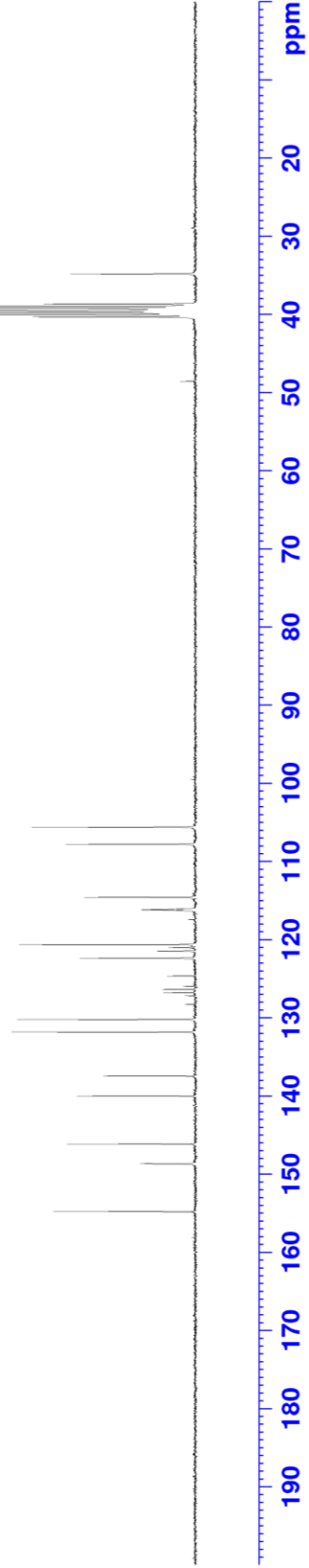


^{13}C NMR of compound **12r'** (75 MHz, DMSO-d_6)

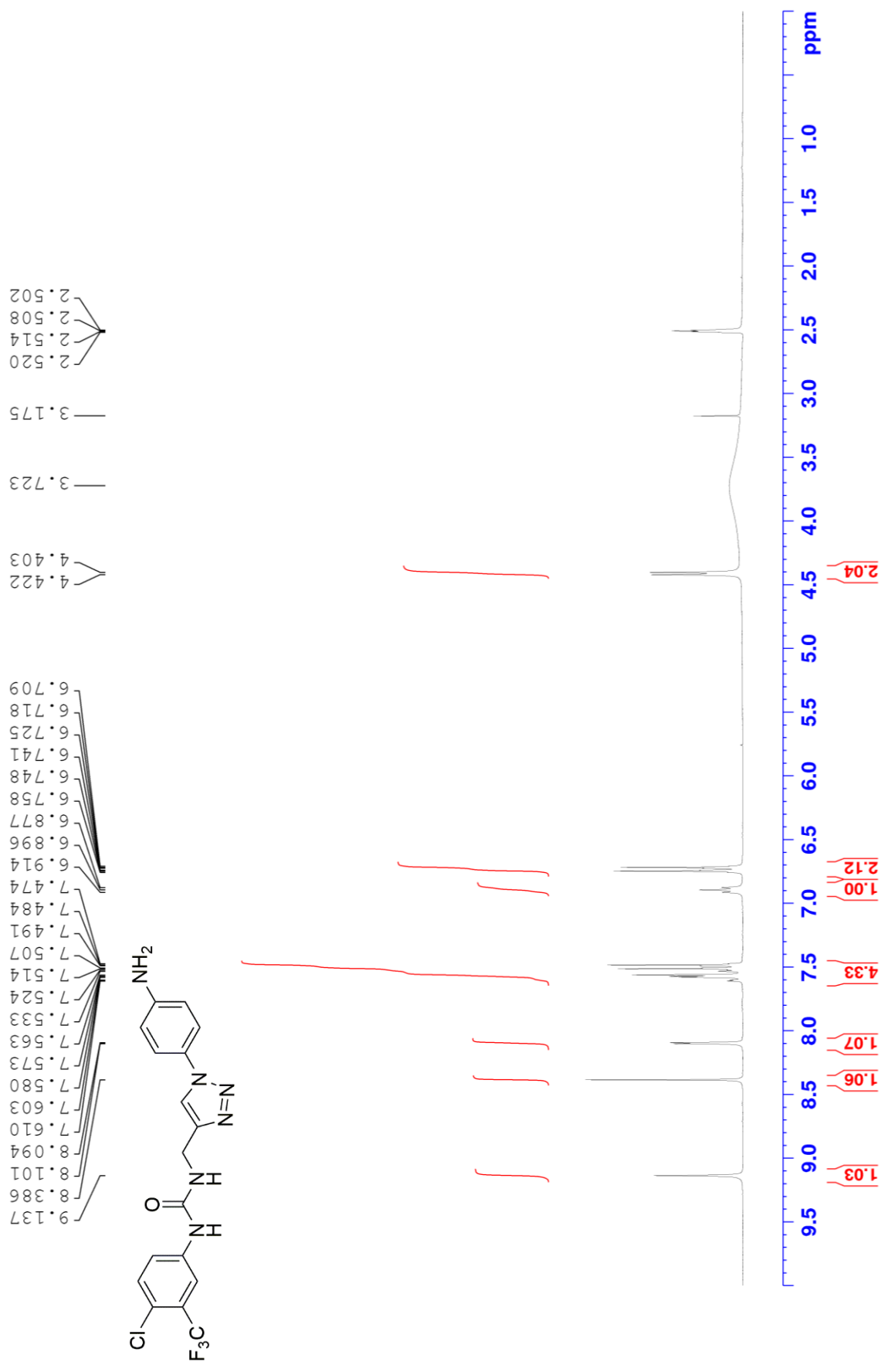
154.83
148.69
146.18
140.04
137.48
131.84
130.23
128.29
127.20
126.80
126.40
125.99
124.67
122.40
121.50
121.05
120.65
117.44
116.31
116.23
116.16
116.08
114.62
107.81
105.63



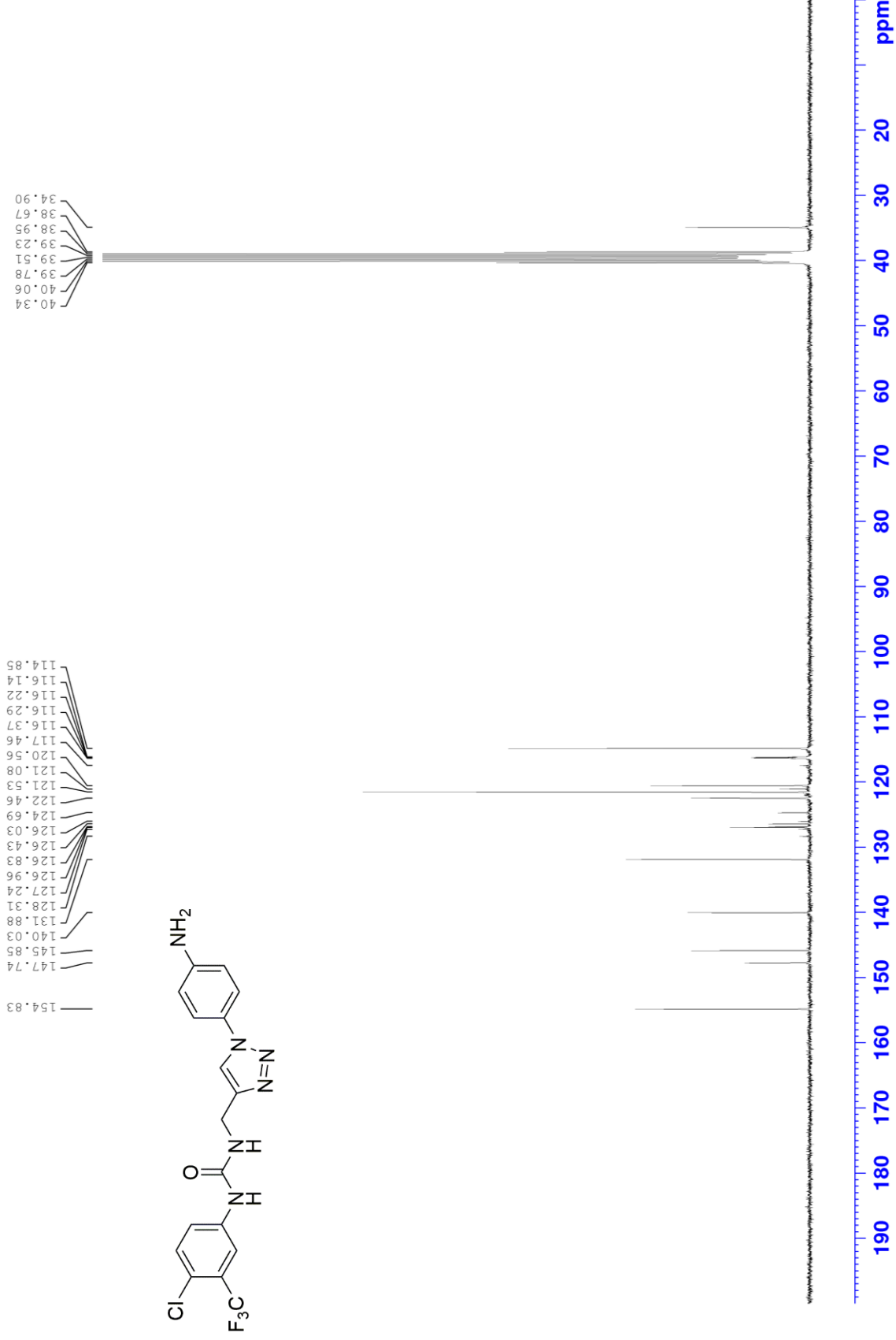
40.35
40.07
39.80
39.52
39.24
38.96
38.68
34.85



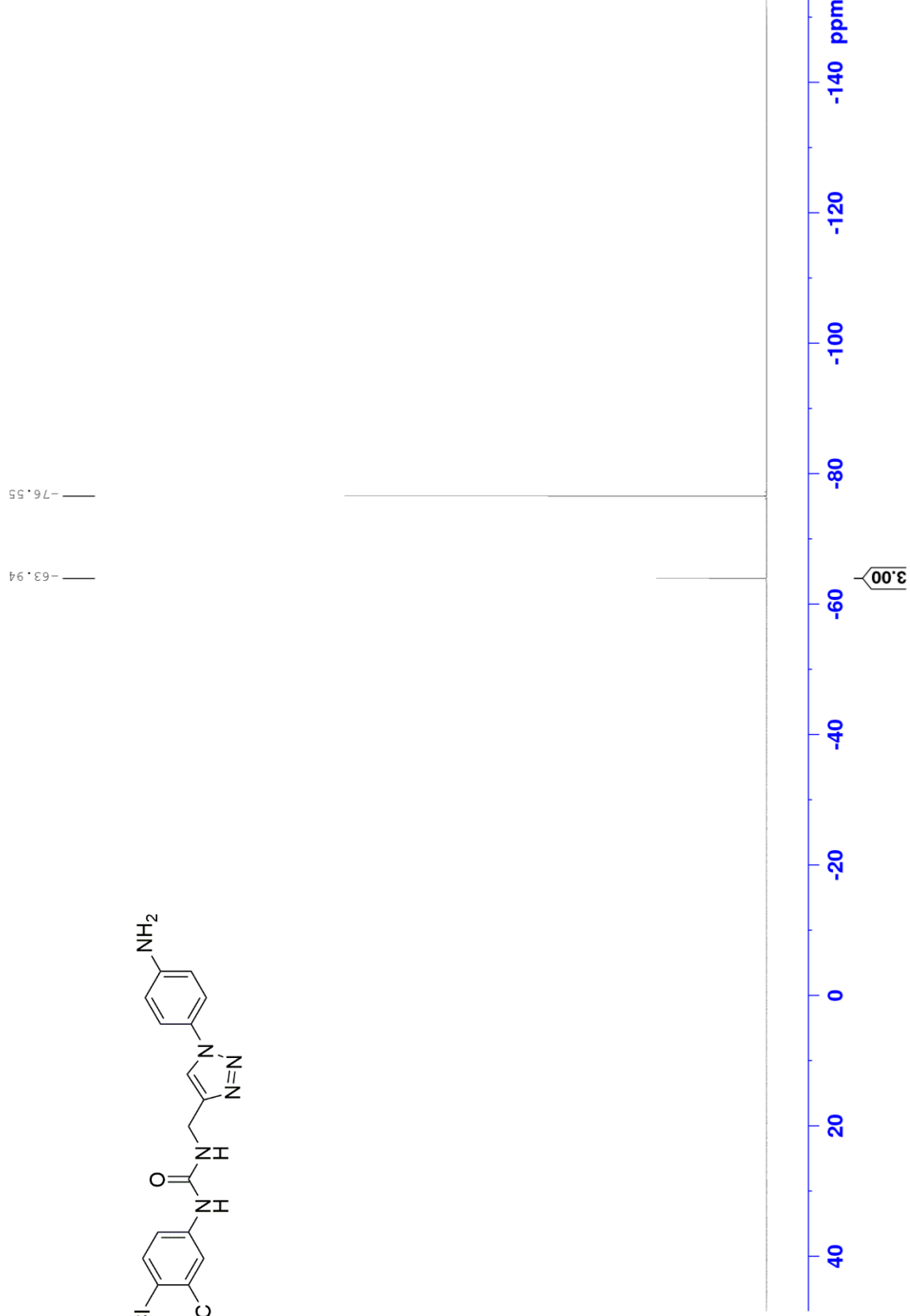
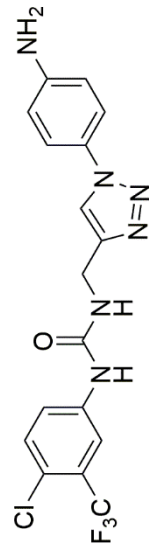
^1H NMR of compound **12s'** (300 MHz, DMSO-d_6)



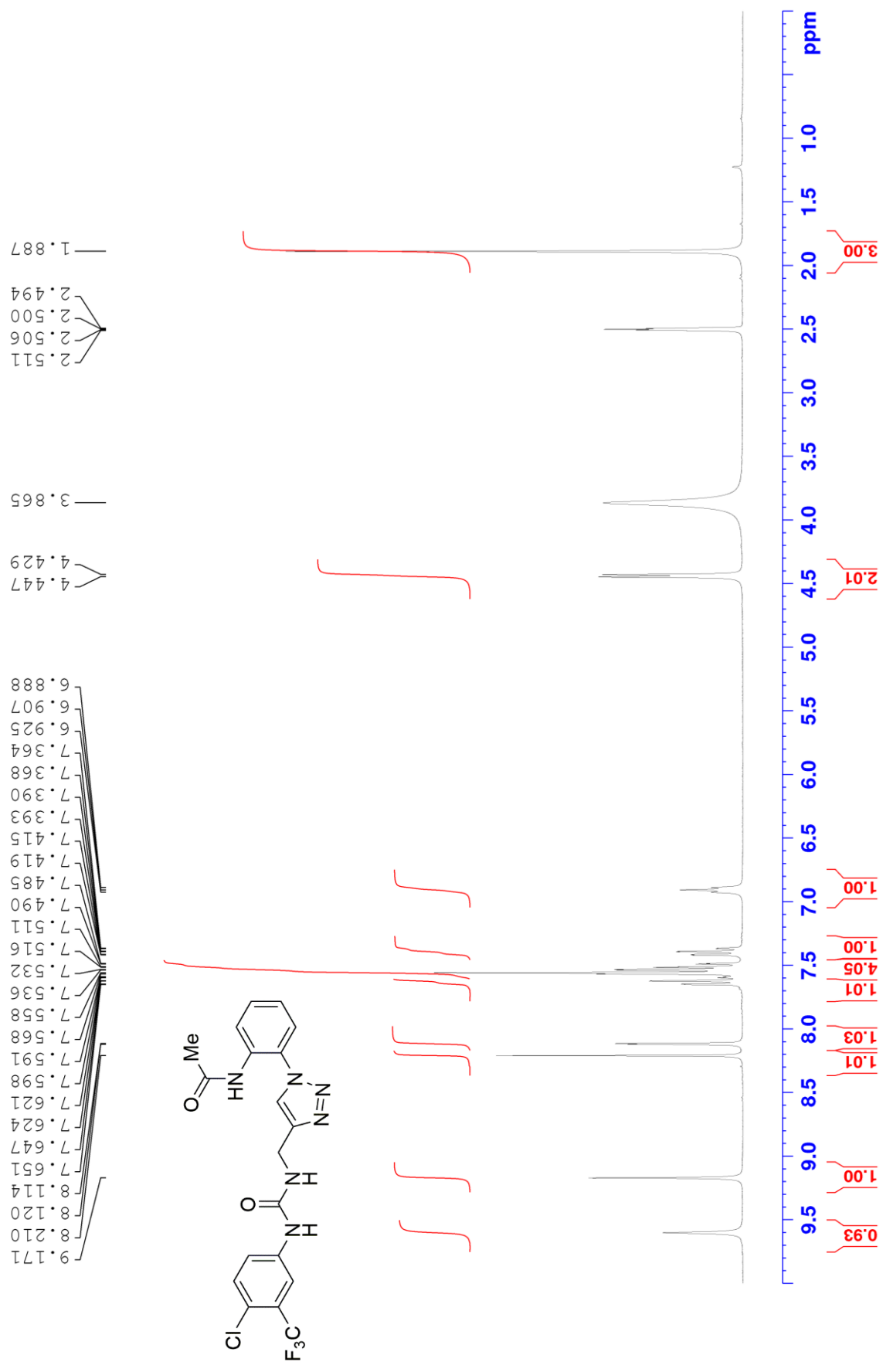
^{13}C NMR of compound **12s**¹ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



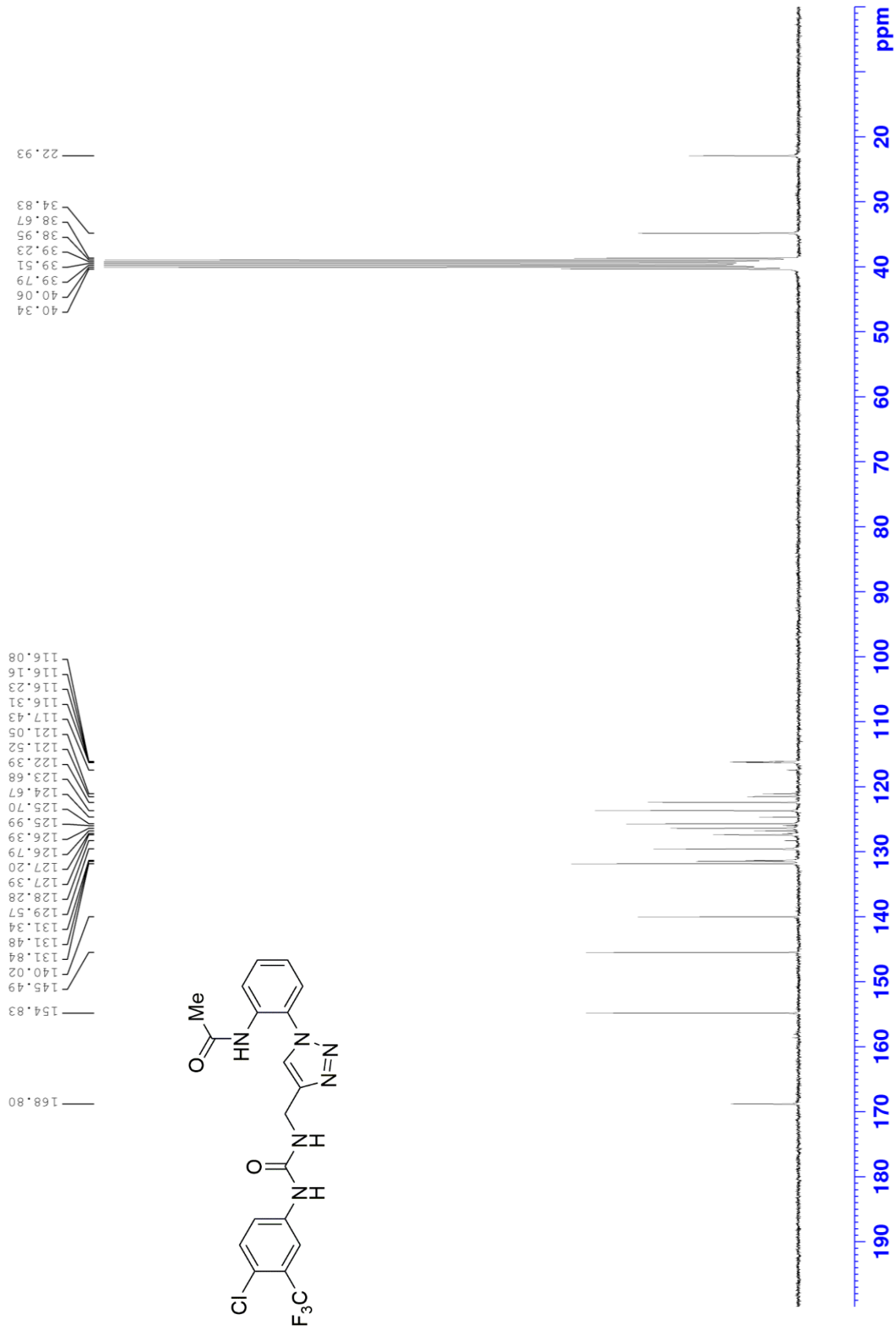
^{19}F NMR of compound **12s'** (282 MHz, DMSO-d_6)



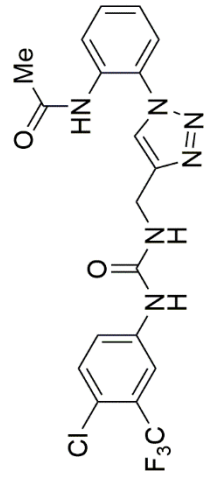
^1H NMR of compound **12t'** (300 MHz, DMSO-d_6)



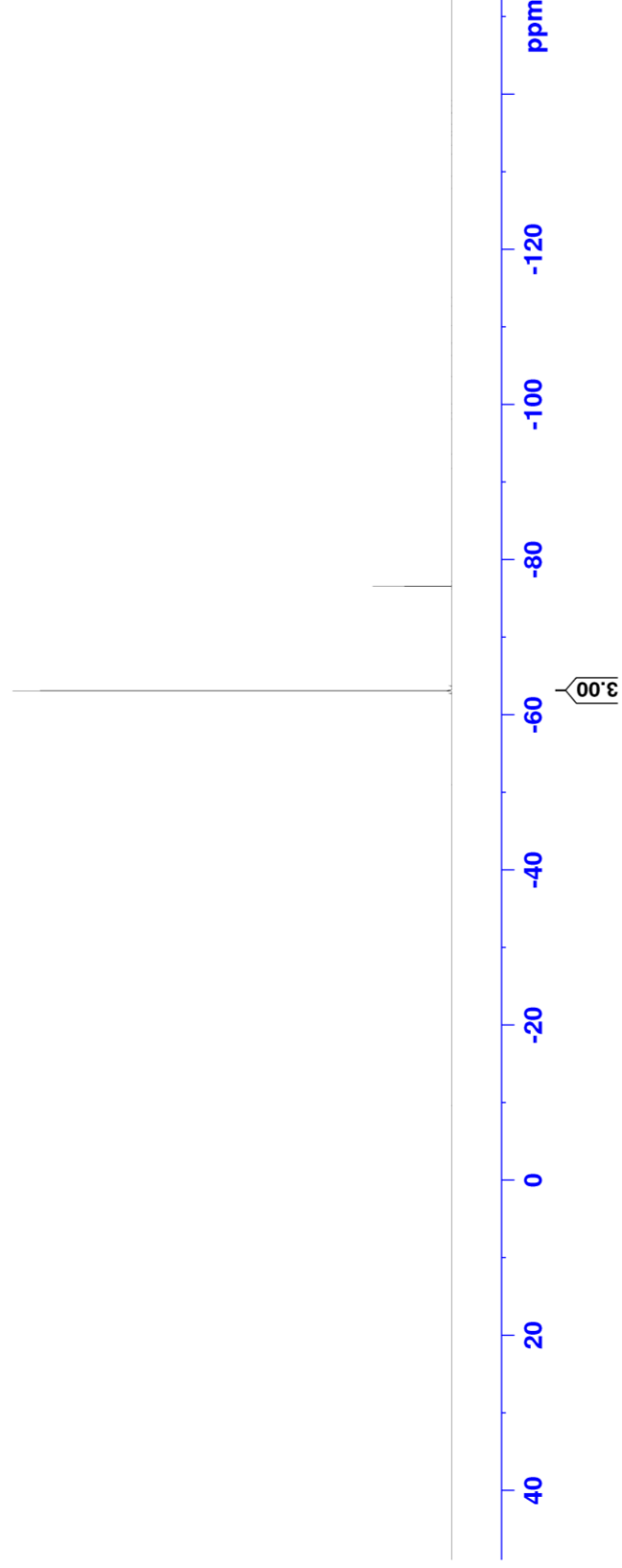
^{13}C NMR of compound **12t** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



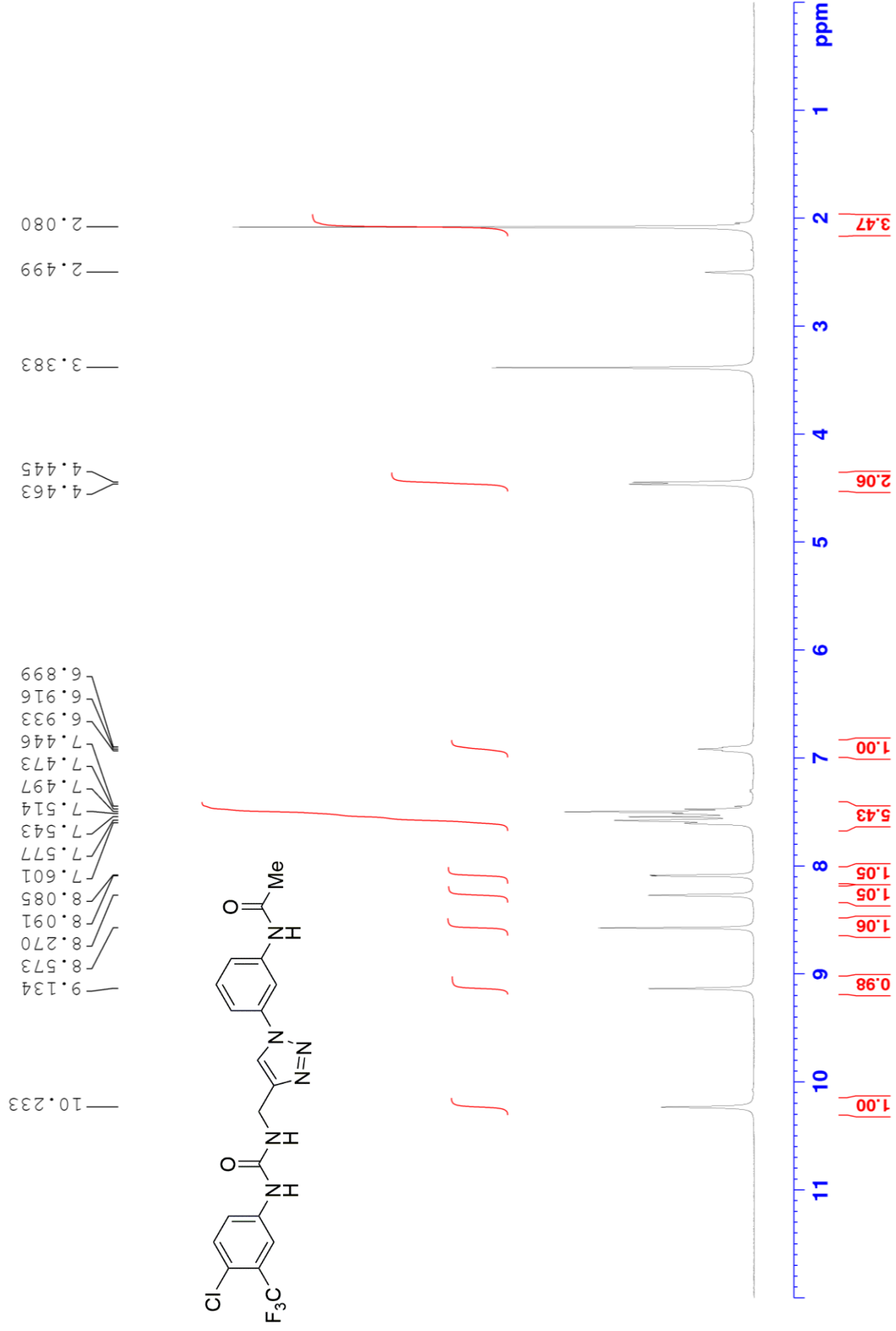
^{19}F NMR of compound **12t'** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



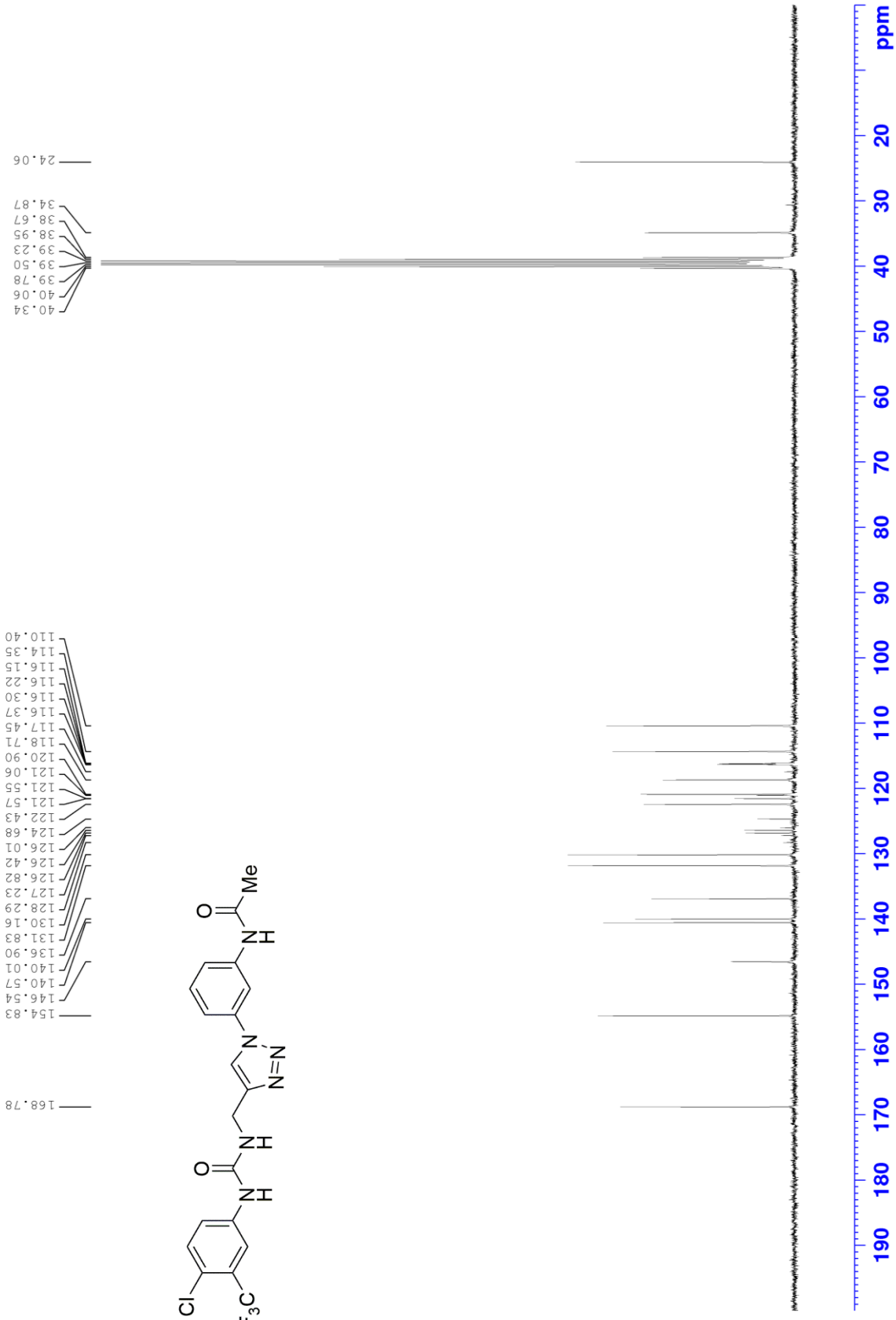
— -76.55
— -63.10



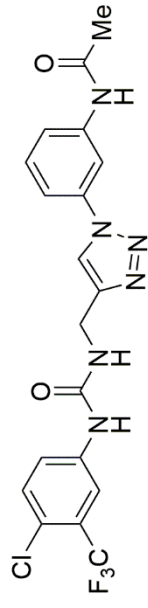
¹H NMR of compound **12u'** (300 MHz, DMSO-d₆)



^{13}C NMR of compound **12u'** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



^{19}F NMR of compound **12u'** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

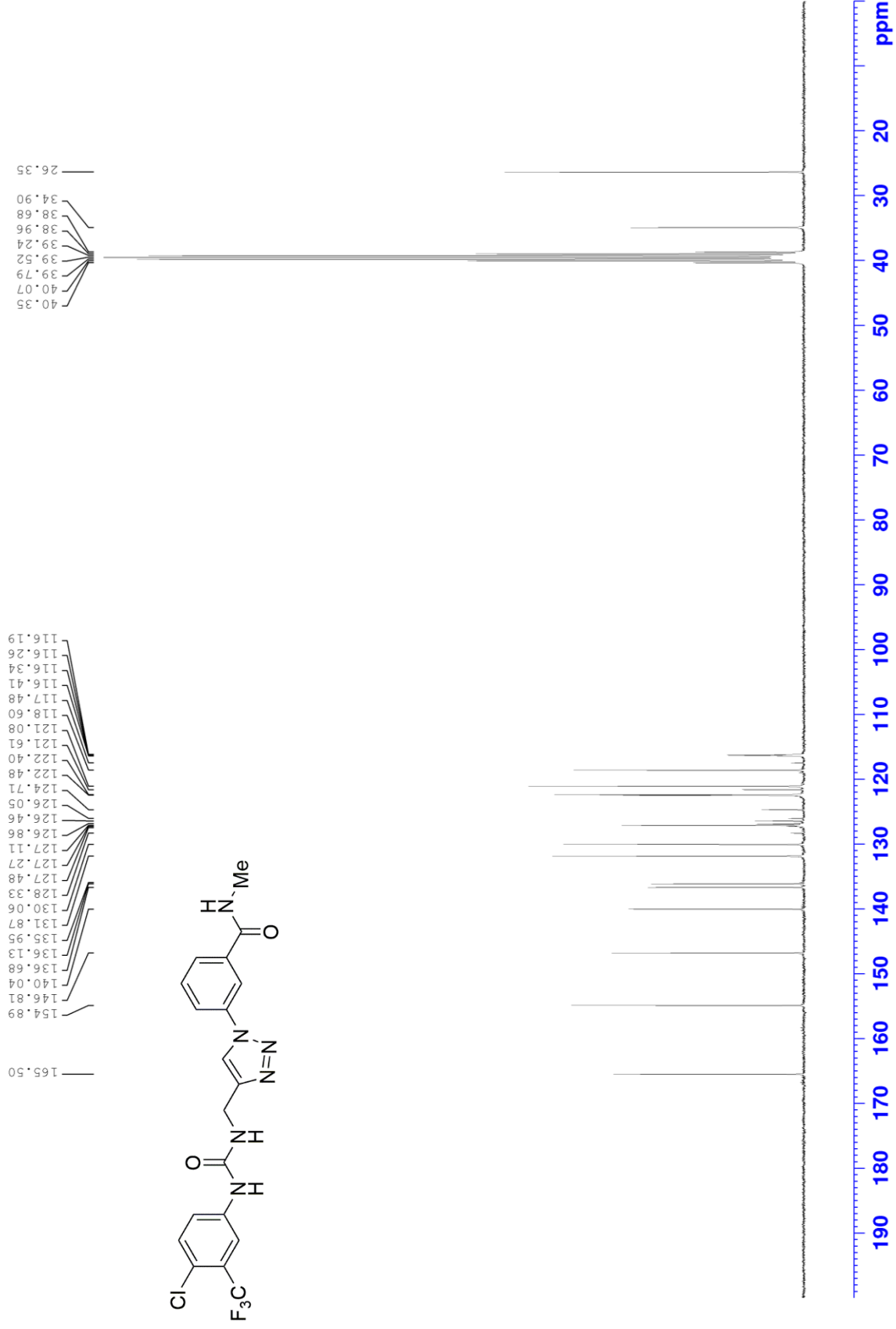


— -62.86

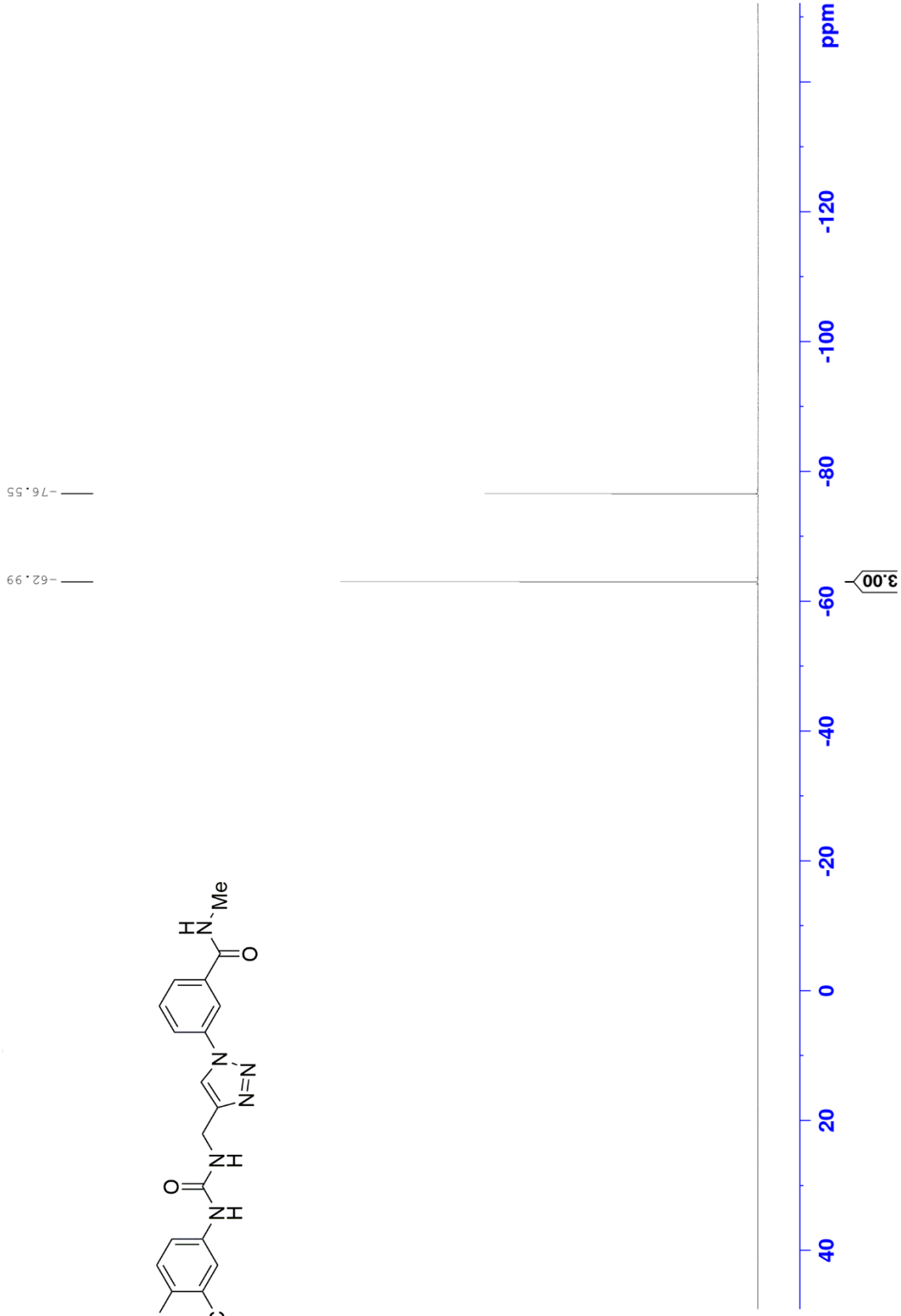
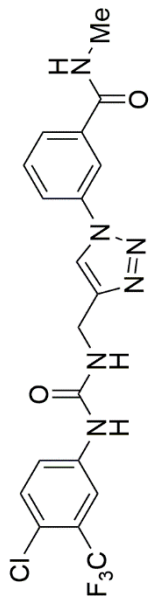
— -76.55



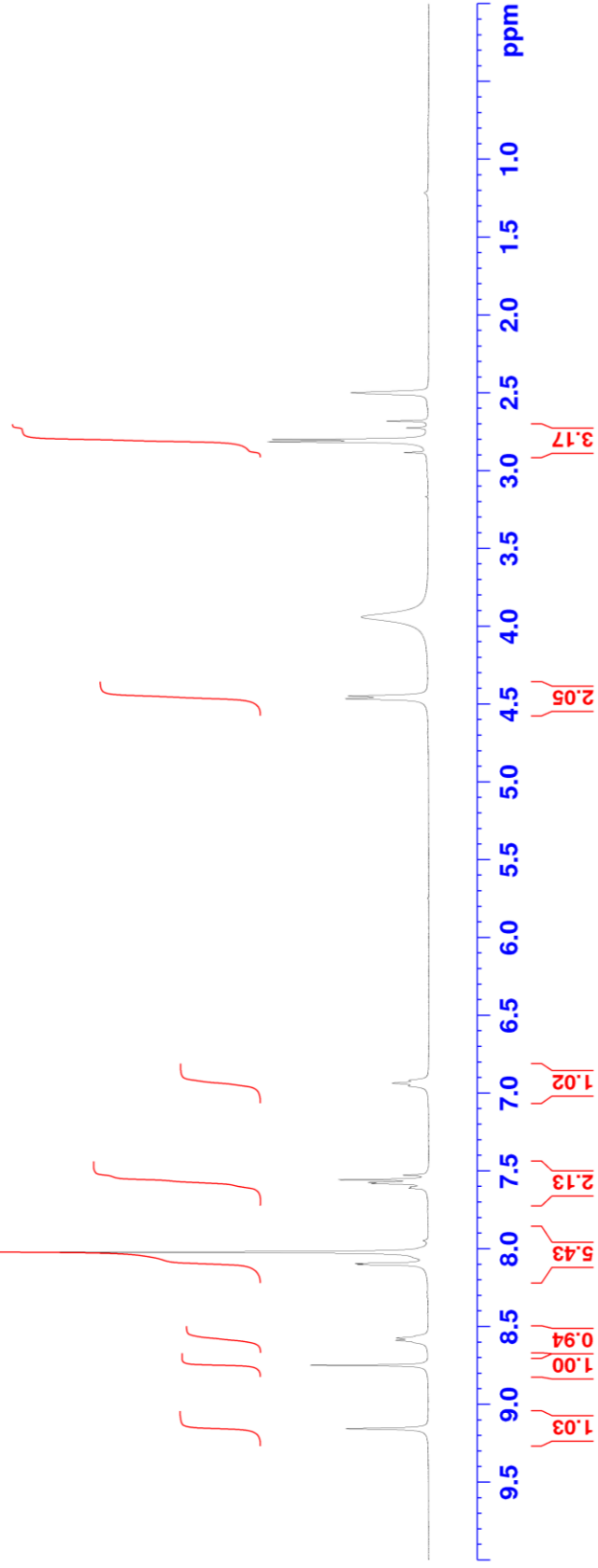
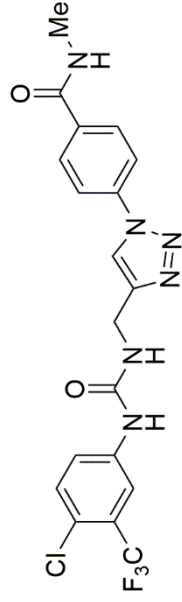
^{13}C NMR of compound **12v** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



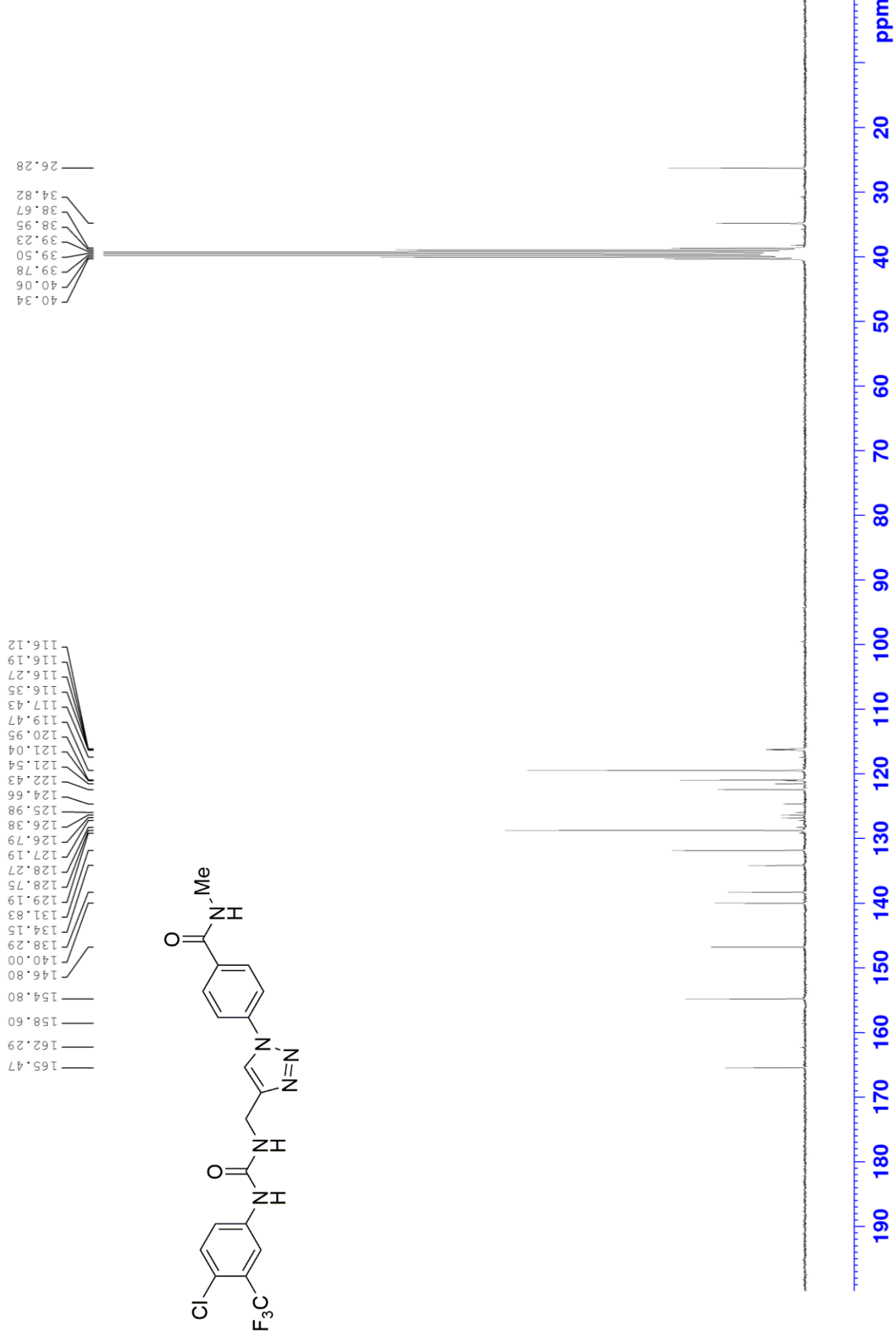
^{19}F NMR of compound **12v** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



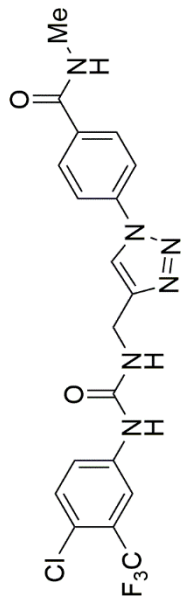
¹H NMR of compound 12w' (300 MHz, DMSO-d₆)



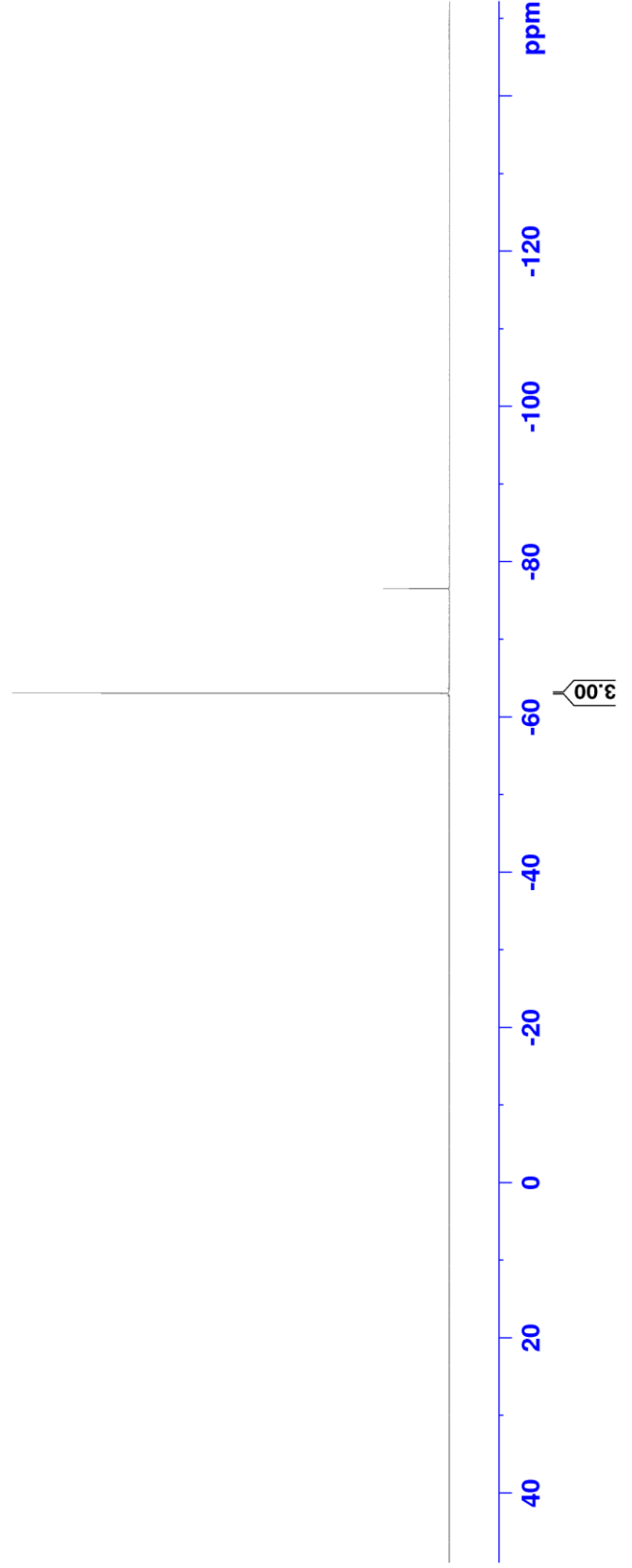
^{13}C NMR of compound **12w'** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



^{19}F NMR of compound **12w'** (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



— -76.55
— -63.08



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	Sittisak Oekchuae
วัน เดือน ปี เกิด	23 June 1995
สถานที่เกิด	Ratchaburi
วุฒิการศึกษา	2014 - 2017 Second Class Honors in Bachelor's Degree of Science in Chemistry, Silpakorn University, Thailand. 2018 - present Master's Degree of Science in Chemistry, Silpakorn University, Thailand.
ที่อยู่ปัจจุบัน	6/9 m.8 Don Krabuang, Banpong, Ratchaburi 70110, Thailand
ผลงานตีพิมพ์	Publication Singpanna, K.; Oekchuae, S.; Jareonkunmetee, K.; Athipornchai, A.; Nuntharatanapong, N.; Opanasopit, P.; Limpachayaporn, P.* Synthesis and Anti-Tyrosinase Activity Evaluation of Fluorinated Chalcone and Phenyl Benzyl Ether Derivatives. Thai Bull. Pharm. Sci. 2020, 15(1), 81-89. Internship and Training Jun 2017 Internship at Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand. Dec 2016 Training in the project “Synthesis of Sorafenib Analogues as Potential Anticancer Agents” at Department of Chemistry, Faculty of the Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand. Jun 2016 Training in the project “Chemical Constituents of Fruits of Ardisia polycephala” at Department of Chemistry, Faculty of the Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand.