



การสังเคราะห์และทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง HepG2 และ Huh7 ของอนุพันธ์
ของโหราฟีนิบที่มีวงไตรเอโซลแทนที่ตำแหน่งเอริลยูเรียของโหราฟีนิบ

โดย

นางสาวศรินทร์ญา ปาลคเชนทร์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2562

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การสังเคราะห์และทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง HepG2 และ Huh7
ของอนุพันธ์ของโซราฟินิบที่มีวงไตรเอโซลแทนที่ตำแหน่งเอริลยูเรียของโซราฟินิบ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2562

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION TOWARDS HEPG2 AND HUH7 CELL
LINES OF 1,2,3 TRIAZOL-CONTAINING SORAFENIB ANALOGUES: THE
REPLACEMENT OF ARYL UREA OF SORAFENIB



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (CHEMISTRY)
Department of CHEMISTRY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2019
Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ การสังเคราะห์และทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง
HepG2 และ Huh7 ของอนุพันธ์ของโหราฟีนิบที่มีวงไตรเอโซล
แทนที่ตำแหน่งเอริลยูเรียของโหราฟีนิบ

โดย ศรินทร์ญา ปาลคเชนทร์

สาขาวิชา เคมี แผนก ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ ดร. ภาณุพันธ์ ลิ้มปชยาพร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

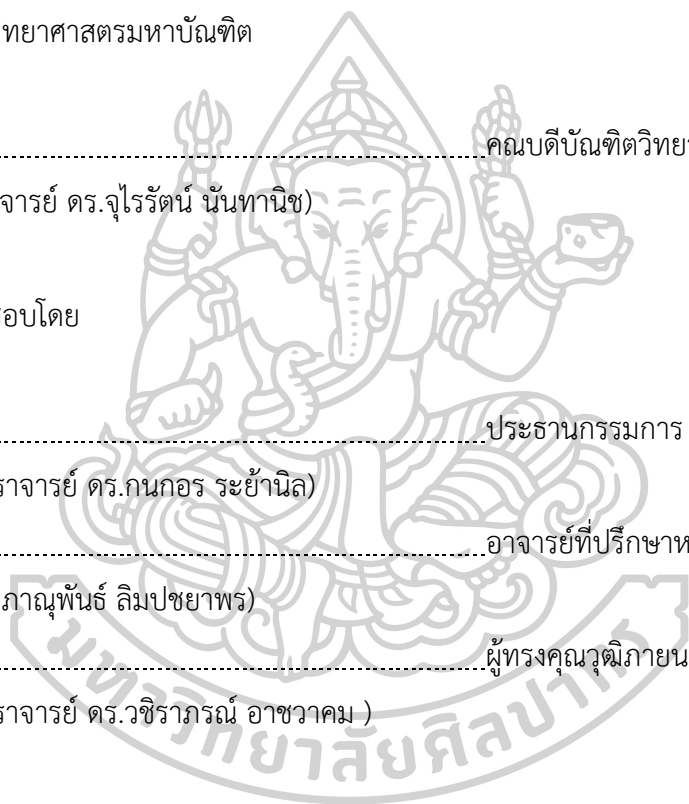
..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกอร ระย้านิล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(อาจารย์ ดร.ภาณุพันธ์ ลิ้มปชยาพร)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วชิราภรณ์ อาชวาคม)



59317204 : เคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต

นางสาว ศรินทร์ญา ปาลคเชนทร์: การสังเคราะห์และทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง HepG2 และ Huh7 ของอนุพันธ์ของโซราฟินิบที่มีวงไตรเอโซลแทนที่ตำแหน่งเอริลยูเรียของโซราฟินิบ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : อาจารย์ ดร. ภาณุพันธ์ ลิ้มปชยาพร

โซราฟินิบเป็นยาตัวแรกที่ได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาให้สามารถใช้ในการรักษามะเร็งตับและมะเร็งไตในระยะลุกลามได้ โดยที่โซราฟินิบมีคุณสมบัติเป็น Multikinase ที่สามารถยับยั้ง enzyme และ receptor ได้หลายชนิด แต่อย่างไรก็ตามเป็นยาที่มีความสามารถในการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดต่ำส่งผลให้เกิดผลข้างเคียงจากการใช้ยา นอกจากนี้โซราฟินิบยังมีหมู่ยูเรียเป็นองค์ประกอบที่สามารถเกิดการรวมตัวกันเองภายในโมเลกุลและจับกับโปรตีนภายในน้ำเลือดได้ ทำให้ประสิทธิภาพของยาลดลง ในงานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ของโซราฟินิบที่มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับได้ดี โดยโมเลกุลในกลุ่มนี้ได้ทำการแทนที่หมู่ยูเรียซึ่งเป็นหมู่ที่ทำหน้าที่สำคัญในการออกฤทธิ์ทางยาด้วย 1,2,3-triazole จากผลการทดลองพบว่าโมเลกุลในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีความจำเพาะเจาะจงกับเซลล์มะเร็งตับชนิด Huh7 มากกว่า HepG2 และเมื่อ Hydrophobicity ของหมู่แทนที่เพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับเพิ่มมากขึ้นด้วย นอกจากนี้การมีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง *para* เป็นหมู่แทนที่ที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งอื่นๆ และการเพิ่มจำนวนของหมู่แทนที่ไม่สามารถเพิ่มความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับได้ โมเลกุลที่ดีที่สุดในกลุ่มนี้คือโมเลกุล 11f (R = 4-*tert*-butyl) แต่อย่างไรก็ตามยังมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับชนิด Huh7 ได้น้อยกว่าโซราฟินิบประมาณ 2 เท่า (sorafenib: $IC_{50} = 2.93 \mu M$, 11f: $IC_{50} = 5.67 \mu M$) นอกจากนี้โมเลกุลดังกล่าวยังมีความสามารถในการยับยั้ง cell migration และ cell proliferative อีกด้วย

59317204 : Major (CHEMISTRY)

MISS SARINYA PALAKHACHANE : SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION TOWARDS HEPG2 AND HUH7 CELL LINES OF 1,2,3 TRIAZOL-CONTAINING SORAFENIB ANALOGUES: THE REPLACEMENT OF ARYL UREA OF SORAFENIB THESIS ADVISOR : PANUPUN LIMPACHAYAPORN, Ph.D.

Sorafenib (1) is the first drug which was approved to treat advanced liver cancer which is cause of death and advanced renal cancer patient. The multikinase properties and low bioavailabilities of sorafenib were showed unwanted side effects. Moreover, sorafenib is containing urea part, usually aggregated with itself and other plasma proteins. Herein, we reported a new series of sorafenib analogues as highly potent anti-Hepatocellular Carcinoma activities inhibitors. The new series was challenged our group to replace urea position of sorafenib which is a pharmacophore by 1,2,3-triazole. Obviously, most of the synthetic compounds selective with Huh7 instead of HepG2 and increasing of hydrophobicity of phenoxy substituents are also enhancing the potency of each inhibitor. The relation between substituent position and activities showed that *para*-substituted exhibited superior inhibitory activities compared with *ortho*- and *meta*-position. The multiple substituents were unaffected to the cytotoxicity among the various difluoro-substituents. The most powerful inhibitors of this series is 11f (R = 4-*tert*-butyl), display less potency than sorafenib about two folds (sorafenib: $IC_{50} = 2.93 \mu\text{M}$, 11f: $IC_{50} = 5.67 \mu\text{M}$). The candidate molecule exhibited anti-cell migration and anti-cell proliferative activity are inclined in the same way as increased compound concentration.

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณอาจารย์ ดร. ภาณุพันธ์ ลิ้มปชยาพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา แนวความคิด คำแนะนำที่เป็นประโยชน์แก่ข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนการตรวจสอบ และแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในรายงานฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ ด้วยความดูแลเอาใจใส่อย่างดียิ่งตลอดการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ นพ.พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์, อาจารย์ ดร. ณัฐยานี ช่วยเพ็ญ และนางสาวยุวภรณ์ เกตุแก้ว ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านโรคตับอักเสบและมะเร็งตับ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง HepG2 และ Huh7 รวมถึงให้คำปรึกษาในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ให้คำปรึกษาและแนะแนวทางในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วชิราภรณ์ อาชวาคม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ให้เกียรติเป็นผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ และขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกอร ระย้านิล ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) และทุนสนับสนุนการวิจัยสำหรับบัณฑิต พสวท. แรกบรรจุ ปีงบประมาณ 2558 ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณอาจารย์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในด้านสารเคมี และอุปกรณ์ต่าง ๆ รวมถึงเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR) ที่ใช้ในการวิจัย

นอกจากนี้ ขอขอบคุณครอบครัวของข้าพเจ้าที่สนับสนุนและให้กำลังใจในการเรียน การใช้ชีวิต ตลอดจนการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ศรินทร์ญา ปาลคเชนทร์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 มะเร็งตับ (Hepatocellular Caceroma : HCC)	1
1.2 โซราฟีนิบ (Sorafenib).....	3
1.3 ความสำคัญของ 1,2,3-Triazole.....	4
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	5
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 มะเร็ง (cancer) และการกลายพันธุ์.....	6
2.2 เซลล์มะเร็งตับ (Human liver cancer cell lines).....	6
2.3 BAY 43-9006 (Sorafenib).....	7
2.4 กลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งของโซราฟีนิบ	10
2.5 Sorafenib derivatives	11
2.5.1 การศึกษาและเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่ตำแหน่งที่ Picolinamide.....	12
2.5.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง Benzene core structure	20
2.5.3 การศึกษาและดัดแปลงบริเวณตำแหน่ง Aryl Urea	21
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	25

3.1 การออกแบบโครงสร้างอนุพันธ์ของโซราฟีนิบที่มีหมู่ 1,2,3-triazole แทนที่ตำแหน่ง Aryl urea.....	25
3.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของโซราฟีนิบที่มีหมู่ 1,2,3-triazole แทนที่ตำแหน่ง Aryl urea	26
3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activities) และการศึกษาความสัมพันธ์ของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพเชิงโครงสร้าง (Structure-Activity relationships, SARs)	30
3.4 การศึกษา Molecular docking.....	34
3.5 การทดสอบความเป็นพิษของสารที่สังเคราะห์ได้ (Toxicity experimentation)	36
3.6 การทดสอบ Cell Migration	37
3.7 การทดสอบ Anti-Proliferative activity	39
บทที่ 4 วิธีการทดลอง	41
4.1 General	41
4.2 Experimental	42
4.2.1 Cytotoxicity testing using MTT assay	42
4.2.2 Toxicity experimental.....	42
4.2.3 Wound healing assay	42
4.2.4 BrdU cell proliferative activity assay.....	43
4.3 Chemistry	44
4.3.1 Preparation of 4-chloro- <i>N</i> -methyl picolinamide (1e)	44
4.3.2 General procedure for propargyl derivatives (1b-30b).....	45
4.3.3 General procedure for click reaction.....	60
4.3.4 General procedure for inhibitor formation	80
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	107
รายการอ้างอิง	110
ประวัติผู้เขียน.....	117

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ Kinase target ชนิดต่างๆ จากการศึกษ แบบ In vitro	7
ตารางที่ 2 แสดงโครงสร้างของแสดงโครงสร้างของ Bis-aryl urea derivatives.....	13
ตารางที่ 3 แสดงหมู่แทนที่ชนิดต่าง ๆ ของอนุพันธ์ไซราฟิโนบ	16
ตารางที่ 4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ไซราฟิโนบ.....	18
ตารางที่ 5 (ต่อ) แสดงโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ไซราฟิโนบ	19
ตารางที่ 6 แสดงค่า IC50 ของ Lenvatinib, Tivozanib และ Regorafenib ต่อ Receptor tyrosine kinase ชนิดต่างๆ	21
ตารางที่ 7 แสดงร้อยละผลผลิตของอนุพันธ์ไซราฟิโนบแต่ละชนิดในแต่ละขั้นตอน	28
ตารางที่ 8 (ต่อ) แสดงร้อยละผลผลิตของอนุพันธ์ไซราฟิโนบแต่ละชนิดในแต่ละขั้นตอน	29
ตารางที่ 9 ตารางแสดงผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และ Huh7 ของอนุพันธ์ของไซราฟิโนบที่แทนที่ตำแหน่ง Aryl Urea ด้วยหมู่ 1,2,3-triazole (1f-13f) เพื่อ ศึกษาผลของการมีหมู่แทนที่และผลของตำแหน่งของหมู่แทนที่ต่อความสามารถในการยับยั้ง เซลล์มะเร็ง	31
ตารางที่ 10 ตารางแสดงผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และ Huh7 ของอนุพันธ์ของไซราฟิโนบที่แทนที่ตำแหน่ง Aryl Urea ด้วยหมู่ 1,2,3-triazole (14f-22f, 30f) เพื่อศึกษาผลของชนิดของหมู่แทนที่ต่อความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ	33
ตารางที่ 11 ตารางแสดงผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (Anti- Hepatocellular carcinoma) ชนิด HepG2 และ Huh7 ของอนุพันธ์ของไซราฟิโนบที่แทนที่ตำแหน่ง Aryl Urea ด้วยหมู่ 1,2,3-triazole (23f-29f) เพื่อศึกษาผลของตำแหน่งและการเพิ่มขึ้นของ Fluorine atom ต่อความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ	34
ตารางที่ 12 แสดง Binding energies, amino acid residues และ hydrogen bond lengths ของ ไซราฟิโนบและ 11f บริเวณ binding site ของ B-RAF	35

ตารางที่ 13 แสดงค่า IC₅₀ ของ Sorafenib และโมเลกุล 11f ที่ใช้ในการคำนวณหาค่า Selectivity Index (SI)..... 36

ตารางที่ 14 แสดงค่า Tissue Repair Percentage ของการทดสอบ Cell migration ของโซราฟีนิบ เปรียบเทียบกับ 11f โดยวิธี Wound Healing assay โดยใช้เซลล์มะเร็งตับชนิด Huh7..... 38

ตารางที่ 15 แสดง Cell Proliferation percentage ของโซราฟีนิบที่ความเข้มข้น 3 μ M เปรียบเทียบกับ 11f ที่ความเข้มข้น 3, 6 และ 12 μ M ที่เวลา 0-48 ชั่วโมง 40



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แผนภาพแสดงจำนวนร้อยละของการเสียชีวิตของประชากรโลกด้วยโรคมะเร็งในภูมิภาคต่างๆ จากรายงานผลการสำรวจขององค์การอนามัยโลก ในปี 2018.....	1
ภาพที่ 2 แผนภาพแสดงร้อยละการเสียชีวิตของประชากรโลกจากมะเร็งชนิดต่างๆ จากรายงานผลการสำรวจขององค์การอนามัยโลก ในปี 2018	2
ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของยาโซราฟินิบ	3
ภาพที่ 4 ภาพแสดงการทำงานของโซราฟินิบ	4
ภาพที่ 5 แสดงโครงสร้างที่เกิดจากการตกผลึกระหว่างของโซราฟินิบและB-Raf.....	8
ภาพที่ 6 ภาพแสดงอันตรกิริยาระหว่าง VEGFR-2 กับโซราฟินิบ.....	9
ภาพที่ 7 การยับยั้งการทำงานของ VEGFR โดย Bevacizumab.....	10
ภาพที่ 8 ภาพแสดงโครงสร้างในแต่ละส่วนของโซราฟินิบ.....	11
ภาพที่ 9 แสดงโครงสร้างของ Bis-aryl urea derivatives และโมเลกุลที่ฤทธิ์ในการยับยั้ง MDA-MB-231 และ SMMC-7721 ดีที่สุดของสารกลุ่มนี้.....	12
ภาพที่ 10 แสดงโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ของโซราฟินิบที่ประกอบด้วย indazole และ azaindazole	14
ภาพที่ 11 แสดงการออกแบบโมเลกุล Sorafenib derivatives ที่เกิดจากการรวมกันของ thieno[3,2-d]pyridine nuclei และ Diaryl semicarbazone scaffolds.....	15
ภาพที่ 12 แสดง Sorafenib derivatives ที่มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุดในกลุ่มของการรวมกันระหว่าง thieno[3,2-d]pyridine nuclei และ Diaryl semicarbazone scaffolds	17
ภาพที่ 13 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Sorafenib derivatives ที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้าง 3 ตำแหน่ง คือ Diaryl urea, phenoxy ring และ N-methyl picolinamide	18
ภาพที่ 14 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Sorafenib derivatives ที่ทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง 3 ตำแหน่ง	20

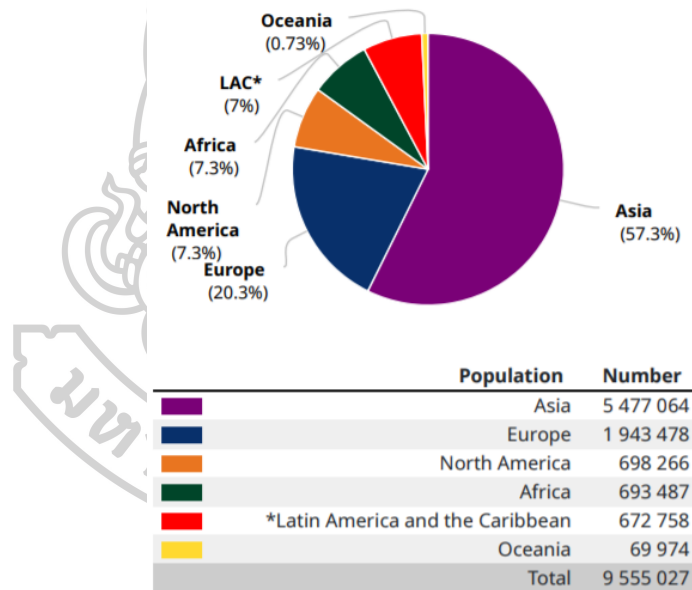
ภาพที่ 15 ภาพแสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Levantinib, Tivozanib	21
ภาพที่ 16 โครงสร้างทางเคมีของ Sorafenib derivatives ที่เปลี่ยนแปลงหมู่ Urea เป็น 4,5-dihydro-1H-pyrazole, 4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carbothioamide และโครงสร้างที่มีฤทธิ์ที่ดีที่สุด (15)	23
ภาพที่ 17 แสดงโครงสร้างของสารต่างๆ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และมีวง 1,2,3-triazole.....	24
ภาพที่ 18 โครงสร้างทางเคมีของยาโซราฟินิบเปรียบเทียบกับอนุพันธ์ของโซราฟินิบที่ออกแบบ	26
ภาพที่ 19 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์อนุพันธ์โซราฟินิบที่แทนที่หมู่ Aryl Urea ด้วย 1,2,3 triazole ที่เชื่อมต่อกับ Substituted phenoxy (1f-30f).....	27
ภาพที่ 20 แสดงวิธีการสังเคราะห์ 4-azidophenol (1c).....	29
ภาพที่ 21 แสดงวิธีการสังเคราะห์ 4-chloro-N-methyl picolinamide (1e).....	30
ภาพที่ 22 แสดงการเปรียบเทียบตำแหน่งของการเข้าไปเกิด Interaction ของโซราฟินิบที่มาจาก co-crystallization (สีน้ำเงิน) และ Redocking (สีเหลือง) บริเวณ Binding site	35
ภาพที่ 23 แสดงการเกิด Hydrogen bond ของอนุพันธ์โซราฟินิบ 11f.....	36
ภาพที่ 24 แสดงผลของโซราฟินิบที่ความเข้มข้น 3 μ M และสารหมายเลข 11f ที่ความเข้มข้น 3, 6 และ 12 μ M ต่อ Tissue Repair percentage เปรียบเทียบกับ Control ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง.....	38
ภาพที่ 25 กราฟแสดง Tissue Repair percentage ที่เวลาที่เปลี่ยนแปลงไปของโซราฟินิบที่ความเข้มข้น 3 μ M, 11f 3 μ M, 11f 6 μ M และ 11f 12 μ M	39
ภาพที่ 26 กราฟแสดงผลการทดสอบการยับยั้ง cell proliferation ของโซราฟินิบที่ความเข้มข้น 3 μ M เปรียบเทียบกับ 11f ที่ความเข้มข้น 3, 6 และ 12 μ M ที่เวลา 0-48 ชั่วโมง.....	40

บทที่ 1

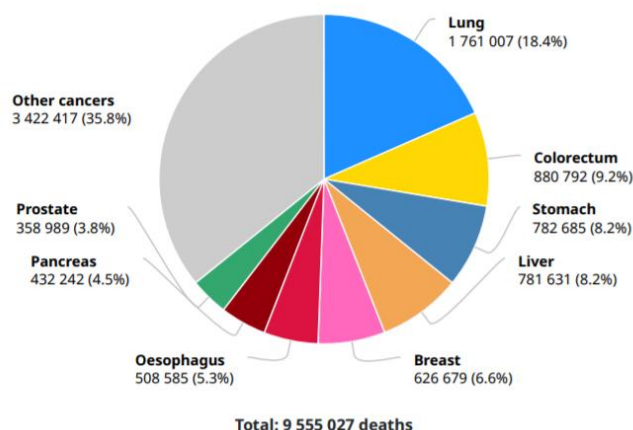
บทนำ

1.1 มะเร็งตับ (Hepatocellular Cacinoma : HCC)

มะเร็ง (Cancer) เป็นโรคร้ายที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของมนุษย์เป็นอันดับที่สองของโลก^{1, 2} โดยเฉพาะอย่างยิ่งประชากรในภูมิภาคเอเชีย^{3, 4} (ภาพ 1.1) โดยที่มะเร็งตับเป็นหนึ่งในสาเหตุการเสียชีวิตของประชากรโลก ในปี 2018 ได้มีผลการสำรวจขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) พบว่ามะเร็งที่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตสามอันดับแรกของโลก คือ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ และมะเร็งตับ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพ 1.2 นอกจากนี้มะเร็งตับยังเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตเป็นอันดับที่สองในเพศชาย และอันดับที่หกในเพศหญิง¹



ภาพที่ 1 แผนภาพแสดงจำนวนร้อยละของการเสียชีวิตของประชากรโลกด้วยโรคมะเร็งในภูมิภาคต่างๆ จากรายงานผลการสำรวจขององค์การอนามัยโลก ในปี 2018



ภาพที่ 2 แผนภาพแสดงร้อยละการเสียชีวิตของประชากรโลกจากมะเร็งชนิดต่างๆ จากรายงานผลการสำรวจขององค์การอนามัยโลก ในปี 2018

จากรายงานผลการสำรวจต่างๆ พบว่า มะเร็งตับเป็นโรคร้ายที่เป็นปัญหาสำคัญต่อประชากรโลกเป็นอย่างมาก โดยพฤติกรรมต่างๆ ของประชากรที่เป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งตับมีดังนี้ การมีค่า BMI (Body Mass Index) สูง⁵ รับประทานผักและผลไม้⁶ ออกกำลังกาย⁶ การสูบบุหรี่หรือการดื่มแอลกอฮอล์^{7, 8} นอกจากนี้ยังเกิดขึ้นได้ในผู้เป็นโรคตับแข็งและผู้ติดเชื้อไวรัส hepatitis B และ C อีกด้วย⁹

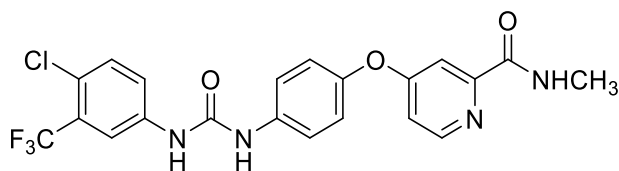
มะเร็งตับ เกิดจากการแสดงออกที่ผิดปกติของโปรตีนที่ทำหน้าที่ต่างๆ ภายในเซลล์ (overexpression และ under-expression)¹⁰ เช่น Vascular Endothelial Factor Receptor (VEGFR),¹¹ RAS และ RAF mutation¹² รวมไปถึงการทำงานที่ผิดปกติของ MAP kinase pathways¹³ โดยโปรตีนดังกล่าวข้างต้น มีความเกี่ยวข้องกันกับการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell growth) การขยายตัวของเซลล์ (cell proliferation) และการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis)¹⁴ โดยที่ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะถูกวินิจฉัยพบว่าป่วยเป็นโรคมะเร็งตับในระยะลุกลามและระยะแพร่กระจายทำให้ผู้ป่วยทรุดตัวลงอย่างรวดเร็ว¹⁵⁻¹⁷ โดยระยะนี้เป็นระยะที่สามารถรักษาให้หายได้ยากหรือรักษาไม่ได้เลย¹⁸

ในช่วงคริสต์ศักราชที่ 19 วิธีการรักษามะเร็งที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ การผ่าตัด (surgery) โดยวิธีนี้สามารถใช้ในการรักษาได้เพียงผู้ที่ป่วยเป็นมะเร็งในระยะเริ่มต้น แต่ไม่สามารถใช้ในการรักษาผู้ป่วยในระยะแพร่กระจายได้ นอกจากนี้การปลูกถ่ายอวัยวะ (transplantation) และการใช้เคมีบำบัด (chemotherapy) ก็ยังเป็นทางเลือกในการรักษาโรคมะเร็งตับอีกด้วย โดยที่การปลูกถ่ายอวัยวะ (transplantation) จะสามารถทำได้เมื่อมีอวัยวะให้ปลูกถ่ายเท่านั้น ส่วนในกรณีที่รักษาโดย

ใช้เคมีบำบัด (chemotherapy) นั้นสามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้จริง แต่ในขณะเดียวกันยังสามารถทำลายเซลล์ปกติด้วย นอกจากนี้ยังไม่สามารถใช้ในการรักษา Solid tumor ได้อีกด้วย¹³ หลังจากนั้นได้มีการค้นพบการใช้ยาที่ออกฤทธิ์เฉพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง (targeted therapy)¹⁹ ซึ่งคุณสมบัติของยาในอุดมคติคือมีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งและสามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้²⁰ โดยที่การเลือกใช้ยาแต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับระยะของมะเร็งและสุขภาพของผู้ป่วย ซึ่งยาที่ใช้ในการรักษา มะเร็งตับในระยะลุกลามและแพร่กระจายคือโซราฟีนิบ (Sorafenib)¹⁹

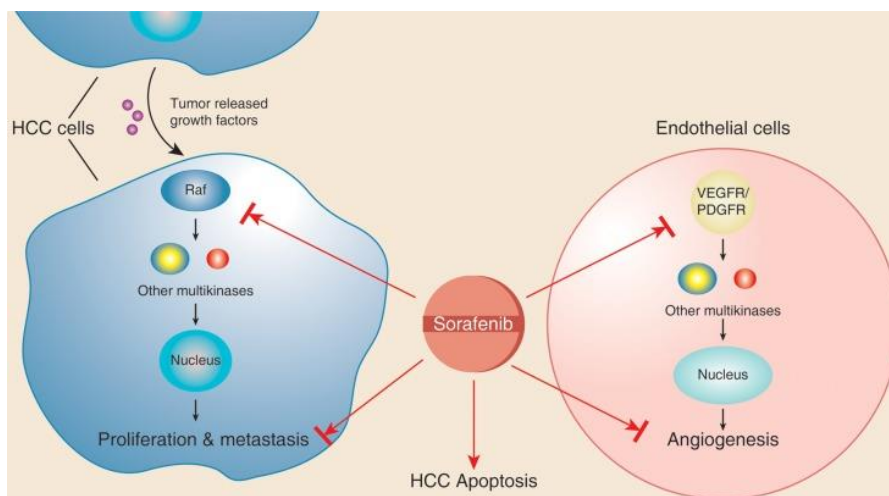
1.2 โซราฟีนิบ (Sorafenib)

โซราฟีนิบ (ภาพ 1.3) เป็นยาชนิดแรกที่ได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration of the United States of America, FDA) ในปี 2005 ให้สามารถใช้ในการรักษามะเร็งตับ (liver cancer or hepatocellular carcinoma: HCC) มะเร็งไต (renal cancer) และมะเร็งไทรอยด์ (thyroid cancer) ในระยะลุกลามและระยะแพร่กระจายได้¹⁹ โดยที่โซราฟีนิบมีคุณสมบัติเป็น Multi-kinase inhibitor ที่สามารถยับยั้ง Kinase enzyme ได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (anti-angiogenesis)¹⁴ ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญในการดำรงชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็ง โดยกลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับของโซราฟีนิบคือ ยับยั้งการเกิด Auto-phosphorylation ของ Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR) และ Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR) ที่เกี่ยวข้องกับ การสร้างหลอดเลือดใหม่ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้ง Raf kinase รวมไปถึง MAP kinase pathways ซึ่งส่งผลให้สามารถยับยั้งการขยายตัว (cell proliferation) และแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งตับ (cell migration)^{21, 22} ได้ อีกทั้งยังกระตุ้นอัตราการตายของเซลล์มะเร็งตับ (apoptosis) ได้อีกด้วย¹³ โดยการยับยั้งดังกล่าวแสดงในภาพ 1.4



Sorafenib(1)

ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของยาโซราฟีนิบ



ภาพที่ 4 ภาพแสดงการทำงานของโซราฟินิบ

แต่อย่างไรก็ตาม โซราฟินิบยังเป็นยาที่มีความสามารถในการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดต่ำ (38-49%)²³ ทำให้ต้องใช้ยาในการรักษาปริมาณมาก²⁴ ส่งผลให้เกิดผลข้างเคียงตามรายงานขององค์การอาหารและยา เช่น ความดันโลหิตสูง โรคผิวหนัง มีผื่นเกิดขึ้นบริเวณมือและเท้า ท้องเสีย อ่อนเพลีย และในบางรายอาจเกิดกล้ามเนื้อหัวใจตาย และเสียชีวิตได้²⁵ นอกจากนี้ยาคชนิดนี้ยังไม่สามารถรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งระดับให้หายขาดได้ เป็นเพียงการยืดอายุของผู้ป่วยออกไปเป็นเวลาไม่เกิน 8 เดือน¹³ รวมไปถึงโซราฟินิบมีราคาสูงทำให้ผู้ป่วยบางรายไม่สามารถเข้าถึงการรักษานี้ได้^{13, 26, 27}

1.3 ความสำคัญของ 1,2,3-Triazole

สารประกอบเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic compounds) เป็นสารประกอบที่มีบทบาทสำคัญในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทางเภสัชวิทยา โดยที่ 1,2,3-triazole เป็นสารประกอบ Heterocyclic ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และทางยาหลายชนิด เช่น antiinflammatory activity, antitubercular activity, anticancer activity, antileishmanial activity, antimicrobial activity, antiviral activity และ antibacterial activity²⁸ นอกจากนี้ยังมีความเสถียรต่อกระบวนการ Metabolism ในร่างกายอีกด้วย²⁹

จากปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นประกอบกับความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทางเภสัชศาสตร์ของ 1,2,3-triazole²⁸ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการพัฒนาโมเลกุลยารักษาโรคมะเร็งระดับให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับได้ดียิ่งขึ้น โดยในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการออกแบบวิธีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของโซราฟินิบโดยการนำโมเลกุล 1,2,3-triazole เข้ามาเป็นส่วนหนึ่ง

ของโมเลกุล เพื่อให้มีประสิทธิภาพทางในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับและมีสมบัติทางเภสัชศาสตร์ (Pharmacokinetics) ที่เปลี่ยนแปลงไป อีกทั้งยังหวังว่าจะสามารถลดผลข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยาได้อีกด้วย โดยทำการออกแบบ สังเคราะห์ และทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับ พร้อมทั้งศึกษาความสัมพันธ์เชิงโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (structure-activity relationship) โดยทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 และ Huh7 การศึกษา Molecular docking รวมไปถึงทำการทดสอบ cell migration และ anticell proliferation เพื่อเป็นการยืนยันการยับยั้งเซลล์มะเร็งอีกด้วย

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบโซราฟินิบที่แทนที่ aryl urea ด้วย 1,2,3-triazole ที่เชื่อมต่อกับวงแหวนเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ชนิดต่างๆ (substituted benzene) ที่มีแนวโน้มในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 และ Huh7 ได้
2. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 และ Huh7 และศึกษาความสัมพันธ์เชิงโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (structure-activity relationship) ของสารที่สังเคราะห์ขึ้น
3. ศึกษา cell migration และ anti-cell proliferation ของสารดังกล่าว รวมไปถึงทดสอบความเป็นพิษของเซลล์เปรียบเทียบกับยาโซราฟินิบ
4. ศึกษาอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างสารที่สังเคราะห์ได้กับเอนไซม์ด้วย การศึกษาโมเลกุลลาร์ดักกิ่ง เพื่อทำความเข้าใจและเป็นข้อมูลในการพัฒนาเป็นยาต่อไป

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะเร็ง (cancer) และการกลายพันธุ์

เซลล์มะเร็ง คือเซลล์ที่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนที่ผิดปกติ ไม่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ได้ รวมถึงสามารถลุกลามและแพร่กระจายไปตั้งรกรากใหม่ที่อวัยวะอื่น ๆ ได้อีกด้วย เรียกว่า Malignant tumor โดยที่มะเร็งสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ คือ ระยะเนื้องอก (tumor) ระยะขยายขนาด (benign) ระยะลุกลาม (malignant) และระยะแพร่กระจาย (metastasis) ตามลำดับ¹⁸ โดยระยะที่หนึ่งและสองนั้น เป็นระยะที่ตรวจพบได้ยากแต่สามารถรักษาให้หายได้ แต่อย่างไรก็ตามในประชากรส่วนใหญ่มักตรวจพบในระยะที่สามและสี่ซึ่งเป็นระยะที่รักษาได้ยากหรือไม่สามารถรักษาได้¹⁸ กระบวนการที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคมะเร็ง การเกิดมะเร็งในมนุษย์สามารถเกิดขึ้นได้หลายเส้นทางด้วยกัน อาจเกิดจากความผิดปกติของยีน Receptor หรือโปรตีนตัวใดตัวหนึ่งที่ทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งเซลล์ หรือการตายของเซลล์ โดยส่วนใหญ่การเกิดมะเร็งจะเกิดผ่านความผิดปกติในการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ โดยผ่าน Receptor Tyrosine Kinase (RTK) ซึ่งเป็น Enzyme-linked Membrane Receptors และ MAPK cascade¹³ โดยที่ Receptors, enzymes หรือ targets สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งได้แก่ Tyrosine kinase signaling ชนิดต่างๆ เช่น Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR), Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), Raf kinase, c-KIT และ RET เป็นต้น^{13, 21, 22, 30} หากสามารถยับยั้งการทำงานของ Receptors, enzymes หรือ targets ต่างๆ ที่ผิดปกติเหล่านี้ได้ ก็จะสามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งได้

2.2 เซลล์มะเร็งตับ (Human liver cancer cell lines)

เซลล์มะเร็งตับมีหลายชนิดโดยแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่มา และความผิดปกติที่แตกต่างกัน ในงานวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งตับนิยมใช้เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และ Huh7 ซึ่งแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน คือ

HepG2 เป็นเซลล์ที่สามารถ differentiate ไปเป็น Hepatocyte ได้ดี เป็น cell line ที่ได้มาจากผู้ป่วยมะเร็งตับชายผิวขาวที่มีอายุ 15 ปี ประกอบด้วย chromosome 55 คู่ โดยเซลล์ชนิดนี้มักผลิต plasma protein เช่น transferrin fibrinogen, plasminogen และ albumin ซึ่งกระตุ้นการทำงานของ Growth hormone ได้³¹

Huh7 เป็นเซลล์ที่สามารถ differentiate ไปเป็น Hepatocyte ได้ดี เป็น cell line ที่ได้มาจากผู้ป่วยมะเร็งตับชาย ที่มีอายุ 57 ปี ชาวญี่ปุ่น ในปี 1982 โดยที่ Huh7 เป็น immortal cell line ที่เกิด point mutation ที่ยีน p53 มักใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับ kinase inhibitors³²

2.3 BAY 43-9006 (Sorafenib)

BAY 43-9006 ได้ถูกค้นพบว่าเป็นโมเลกุลที่สามารถยับยั้งการทำงานของ Raf kinase โดยคุณ Bayer และ Onyx ในปี 1995 โดยใช้เทคนิค high-throughput screening จากโมเลกุลทั้งหมด 200,000 โมเลกุล²² ซึ่งต่อมาถูกเรียกว่า Sorafenib การค้นพบนี้เป็นจุดเริ่มต้นที่ทำให้นักวิจัยหลายๆ กลุ่มสนใจในการศึกษาและพัฒนาคุณสมบัติของโมเลกุลดังกล่าว

ในปี 2001-2004 Scott M. Wilhelm และคณะได้ทำการนำโมเลกุลดังกล่าวมาทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่ามีความสามารถในการยับยั้ง Raf1-kinase มีค่า $IC_{50} = 6$ nM อีกทั้งยังสามารถยับยั้ง Kinase enzyme อื่นๆได้ เช่น wild-type B-Raf, oncogene B-raf^{V600E}, VEGFR1 2 และ 3 รวมไปถึง PDGFR β และ FGFR1 อีกด้วย ดังตารางที่ 1²²

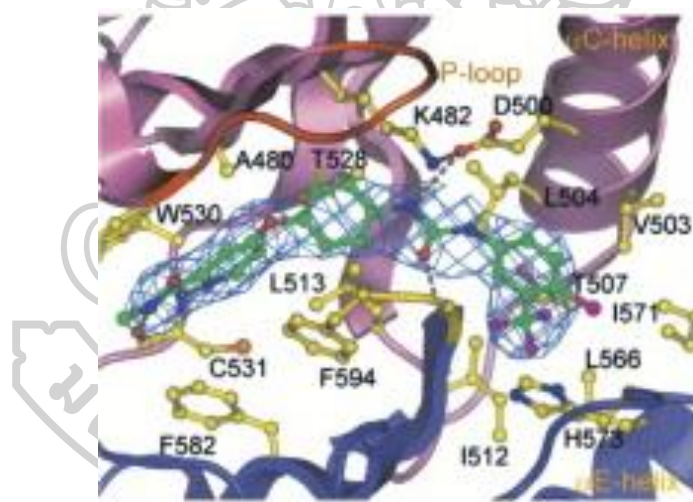
ตารางที่ 1 แสดงความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ Kinase target ชนิดต่างๆ จากการศึกษา

แบบ *In vitro*

Kinase target	<i>In vitro</i> IC ₅₀
Raf-1	6
Wild-type B-Raf	25
Oncogenic B-Raf ^{V600E}	38
VEGFR1	26
VEGFR2	90
Murine VEGFR3	20
Murine PDGFR β	57
Flt-3	33
P38	38
c-Kit	68
FGFR1	580

นอกจากนี้ Paul T.C. Wan และคณะ ได้ทำการศึกษา X-ray crystallography ระหว่าง B-Raf และ โคราฟิโนบ เพื่อศึกษา interaction ของโคราฟิโนบ โดยจากการศึกษาพบว่ามีแรงกระทำระหว่างเอนไซม์ (Enzyme) กับตัวยับยั้ง (inhibitor)^{21, 33} ดังนี้ (ภาพที่ 5)

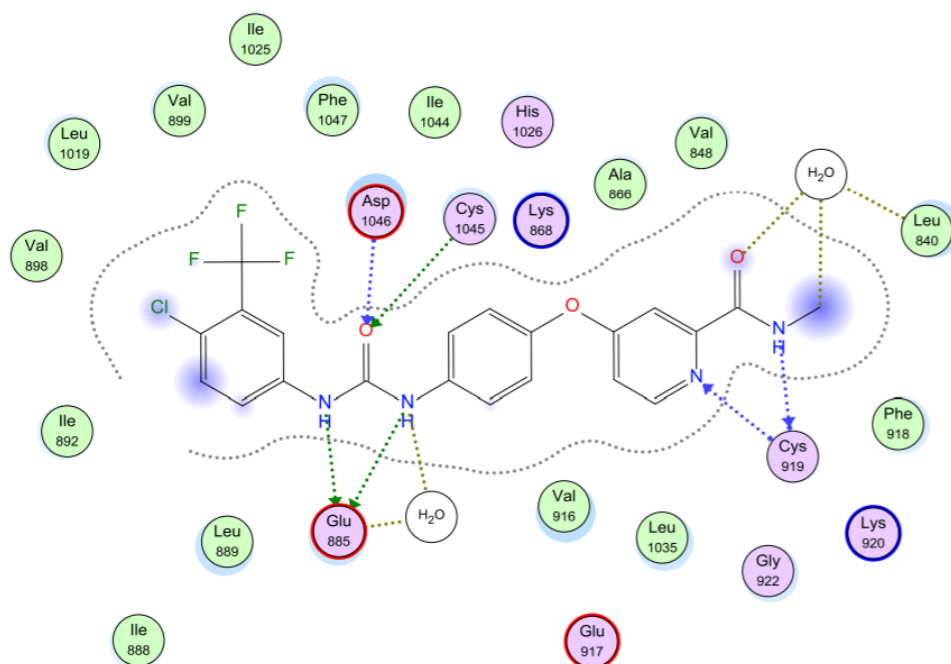
1. หมู่ยูเรียของตัวยับยั้งเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโปรตีน 2 พันธะ โดยที่ไนโตรเจนอะตอมเกิดกับหมู่คาร์บอกซิเลตแขนงข้างของ Glu500 และ ตำแหน่งคาร์บอนิลเกิดกับไนโตรเจนสายหลักของ Asp593
2. ไนโตรเจนอะตอมบนวงไพริดีนสามารถเพิ่มการดึงดูดกันได้ถึง 5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเบนซีนโดยเกิดอันตรกิริยากับ ATP binding pocket และ นอกจากนี้ยังเกิดสามารถเกิดอันตรกิริยากับวงอะโรมาติกได้อีก 3 วง คือ Trp530, Phe582 และ Phe594
3. ไนโตรเจนอะตอมของ Methyl amide เกิดพันธะไฮโดรเจนกับคาร์บอนิลสายหลักของ Cys351
4. วง Trifluoromethyl phenyl เกิด lipophobic interaction กับ hydrophobic pocket ที่เกิดระหว่าง α C และ α E Helix



ภาพที่ 5 แสดงโครงสร้างที่เกิดจากการตกผลึกระหว่างของโซราฟินิบและB-Raf

จากที่มีการศึกษาและทำการทดสอบคุณสมบัติทางยาต่างๆ ของโซราฟินิบมาเปเวลากว่า 10 ปี จนกระทั่งในปี 2005 องค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกาได้อนุมัติให้โซราฟินิบเป็นยาที่สามารถใช้ในการรักษามะเร็งตับระยะลุกลาม (advanced liver cancer) ในชื่อทางการค้าคือ Nexavar® และได้มีการอนุญาตให้ใช้ยานี้ในการรักษาผู้ป่วยในประเทศอื่นๆ ต่อไป รวมไปถึงทำการทดสอบการนำไปใช้เป็นยาด้านมะเร็งตับระยะลุกลาม (Advanced hepatocellular carcinoma) อีกด้วย^{13, 22, 27}

หลังจากที่โซราฟินิบได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยา ได้มีนักวิจัยให้ความสนใจที่จะทำการศึกษาและพัฒนายาโซราฟินิบมากขึ้น โดยในปี 2012 Peng Wu และคณะ ได้รายงานการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโซราฟินิบกับ VEGFR-2³⁴ ดังแสดง ในภาพที่ 6



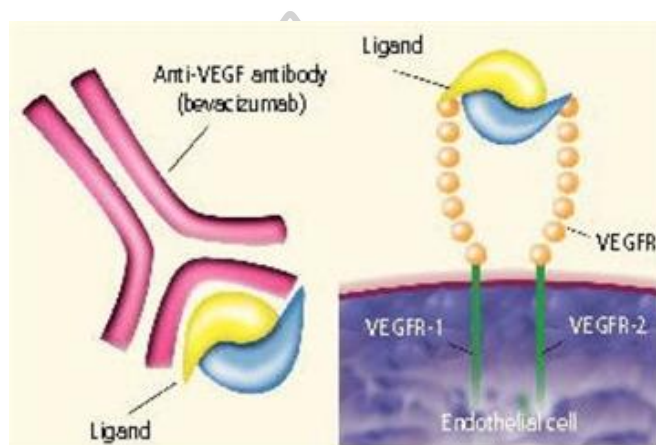
ภาพที่ 6 ภาพแสดงอันตรกิริยาระหว่าง VEGFR-2 กับโซราฟินิบ
จากผลการศึกษาพบว่า โซราฟินิบมี interaction ต่อ VEGFR-2 ดังนี้

1. วง Trifluoromethyl phenyl เกิด Hydrophobic interaction กับ Hydrophobic pocket
2. หมู่ยเรียเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ Glu885 และ Asp1046
3. หมู่ Picolinamide เกิดพันธะไฮโดรเจนกับ Cys919

จากการนำยาโซราฟินิบไปใช้ มีรายงานว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งตับมากขึ้นประมาณ 50% แต่อย่างไรก็ตามยังมีผู้ป่วยบางรายที่ไม่สามารถใช้โซราฟินิบในการรักษามะเร็งตับได้สำเร็จ อาจเนื่องมาจากผลข้างเคียง และข้อจำกัดของโซราฟินิบในการใช้ยาของผู้ป่วยแต่ละคน กรณีที่ผู้ป่วยกลับมาเป็นซ้ำและเคยได้รับการรักษาด้วยยาโซราฟินิบอาจทำให้เกิดการดื้อยาจึงต้องทำการรักษาโดยใช้โซราฟินิบควบคู่ไปกับยาชนิดอื่น ได้แก่ รีโกราฟินิบ (Regorafenib) ซึ่งเป็นยาที่มี pharmacologically potency สูงกว่า โซราฟินิบ³⁵⁻³⁷

2.4 กลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งของโซราฟินิบ

จากการศึกษากลไกการยับยั้งมะเร็งของ Multi-kinase inhibitors คือ Bevacizumab, sunitinib และ Sorafenib พบว่ามีกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน โดยที่ Bevacizumab ผลิตมาจากเทคโนโลยี Recombinant DNA เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่เป็น Antibody จะทำหน้าที่ในการยับยั้ง หรือบล็อกโมเลกุลสัญญาณ (Signal molecule) หรือลิแกนด์ (Ligand) ของ VEGF (Receptor tyrosine kinase) ที่ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลสัญญาณสำหรับการสร้างหลอดเลือดใหม่ทำให้เกิดการถ่ายโอนสัญญาณ (Signal transduction) (ภาพที่ 7)^{38, 39}



ภาพที่ 7 การยับยั้งการทำงานของ VEGFR โดย Bevacizumab

Sunitinib ทำหน้าที่ในการยับยั้ง Downstream signal ของ VEGF โดยการยับยั้งแบบแข่งขัน บริเวณ Catalytic domain ของ VEGF ทำให้ไม่เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ ทั้งนี้ Sunitinib เป็นยาที่มีผลข้างเคียงสูงมาก^{38, 39}

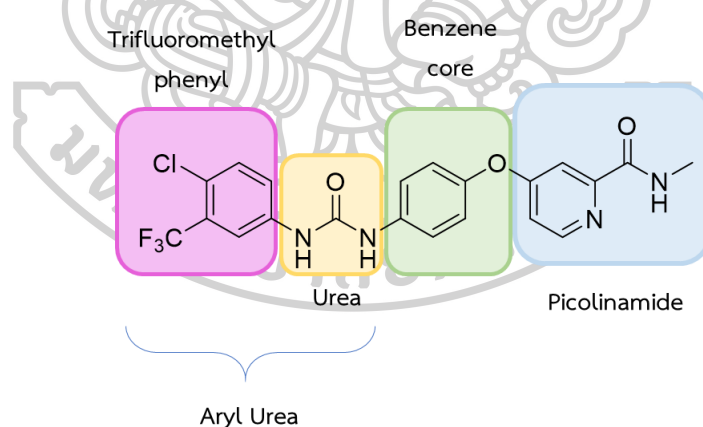
Sorafenib ทำหน้าที่ในการยับยั้งแบบแข่งขันบริเวณ VEGFR เช่นเดียวกับกับ Sunitinib ทำให้ไม่มีการสร้างหลอดเลือดใหม่ และมีผลข้างเคียงที่น้อยกว่า เมื่อเทียบกับผลข้างเคียงจากการใช้ยา Sunitinib เนื่องจาก Sorafenib สามารถยับยั้ง Intracellular kinases CRAF, BARF, mutant-BRAF cell surface kinases KIT, FLT-3, VEGFR-2, VEGFR-3 และ PDGFR β ได้ โดยที่ kinase ต่างๆ เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่ ดังนั้น Sorafenib จึงลดการไหลเวียนเลือดของเนื้องอกได้ ทำให้ลดการเจริญเติบโตของเนื้องอก และยังสามารถยับยั้ง Raf, MEK, ERK pathway ส่งผลควบคุมกระบวนการ Transcription ทำให้ไม่เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่และการขยายตัวของเซลล์ได้อีกด้วย^{38, 39}

อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของยาโซราฟินิบยังไม่เป็นที่น่าพึงพอใจมากนักในแง่ของการดูดซึมสู่กระแสเลือด²³ และผลข้างเคียงอันเนื่องมาจากการใช้ยาก่อนข้างสูงเนื่องจากยาเป็น Multi-kinase Inhibitors ที่สามารถยับยั้ง Enzymes และ Proteins เป็นจำนวนมาก¹³ นอกจากนี้ยังมีราคาแพงทำให้ผู้ป่วยบางกลุ่มไม่สามารถเข้าถึงการรักษาได้ แต่อย่างไรก็ตามแม้จะมีการใช้ยาโซราฟินิบก็ไม่สามารถยืดอายุผู้ป่วยได้นาน¹³

เนื่องจากคุณสมบัติการเป็น Multi-kinase inhibitors ของยาโซราฟินิบและความสามารถในการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดน้อย ซึ่งส่งผลให้เกิดผลข้างเคียงต่างๆ จากการใช้ยาทำให้ในปัจจุบันมีการพัฒนาอนุพันธ์ของโซราฟินิบให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นเพื่อลดปริมาณการใช้ยา ลดผลข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยา และราคาถูกลง เพื่อให้ผู้ป่วยสามารถเข้ารับการรักษาได้ทั่วถึงรวมถึงพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งชนิดอื่นๆ โดยในปัจจุบันนี้ยาโซราฟินิบได้รับการยอมรับให้ใช้รักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งไตและมะเร็งไทรอยด์ได้อีกด้วย

2.5 Sorafenib derivatives

ในปัจจุบันมีนักวิจัยจำนวนมากที่สนใจในการศึกษาออกแบบโมเลกุล สังเคราะห์และทดสอบคุณสมบัติต่างๆ เพื่อพัฒนาคุณสมบัติของอนุพันธ์ของยาโซราฟินิบ

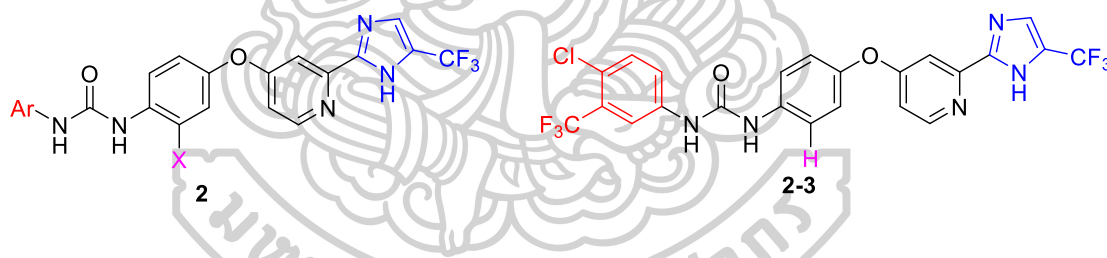


ภาพที่ 8 ภาพแสดงโครงสร้างในแต่ละส่วนของโซราฟินิบ

โครงสร้างทางเคมีของโซราฟินิบประกอบด้วยส่วนที่สำคัญ 3 ส่วนใหญ่ คือ วง Trifluoromethyl phenyl, ยูเรีย ที่รวมกันเรียกว่า Aryl urea นอกจากนี้ยังประกอบด้วย Benzene core และ Picolinamide

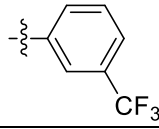
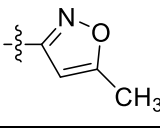
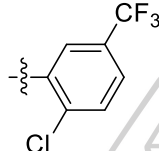
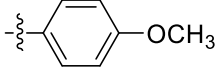
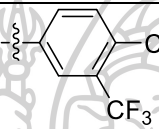
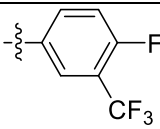
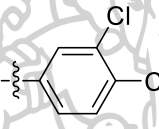
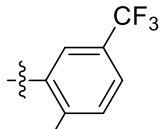
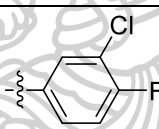
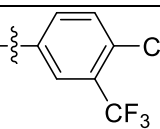
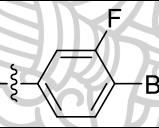
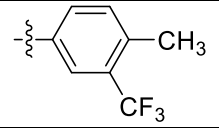

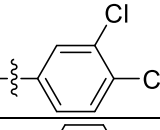
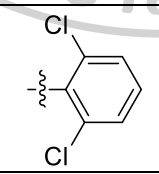
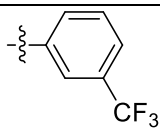
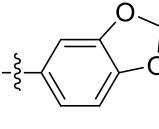
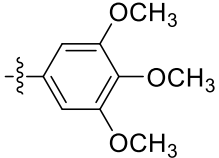
2.5.1 การศึกษาและเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่ตำแหน่งที่ Picolinamide

ในปี 2012 Wenhui Zhan และคณะ⁴⁰ ได้สังเคราะห์ Bis-aryl urea derivatives (**2**) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไซราฟิโนบ โดยทำการศึกษาอนุพันธ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งหมด 3 ตำแหน่ง คือ เปลี่ยนหมู่ amide ของ *N*-methyl picolinamide เป็น Trifluoromethyl imidazole เพิ่ม halogen บนวง Phenoxy และเปลี่ยนแปลงหมู่แทนที่ของหมู่ Aryl ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 9 ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด MDA-MB-231 (เซลล์มะเร็งเต้านม) BGC-823 (เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร) และ SMMC-7721 (เซลล์มะเร็งตับ) และทดสอบการยับยั้งการขยายตัวของเซลล์ (Anti-proliferative activities) รวมไปถึงการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง c-RAF พบว่า โดยส่วนใหญ่สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้ง MDA-MB-231 และ SMMC-7721 ได้ใกล้เคียงหรือมากกว่า BGC-823 และการแทนที่เพียงหมู่ amide ของ *N*-methyl picolinamide ด้วย Trifluoromethyl imidazole มีฤทธิ์สูงกว่าไซราฟิโนบในเซลล์ MDA-MB-231 และ SMMC-7721 ประมาณ 7 เท่า (**3**; $IC_{50} = 1.21$ และ $1.38 \mu M$ ตามลำดับ) และมี Selectivity ที่ดีต่อเซลล์มะเร็งชนิด MDA-MB-231 และ SMMC-7721 จึงเป็นโมเลกุลที่น่าสนใจในการนำไปพัฒนาต่อไป



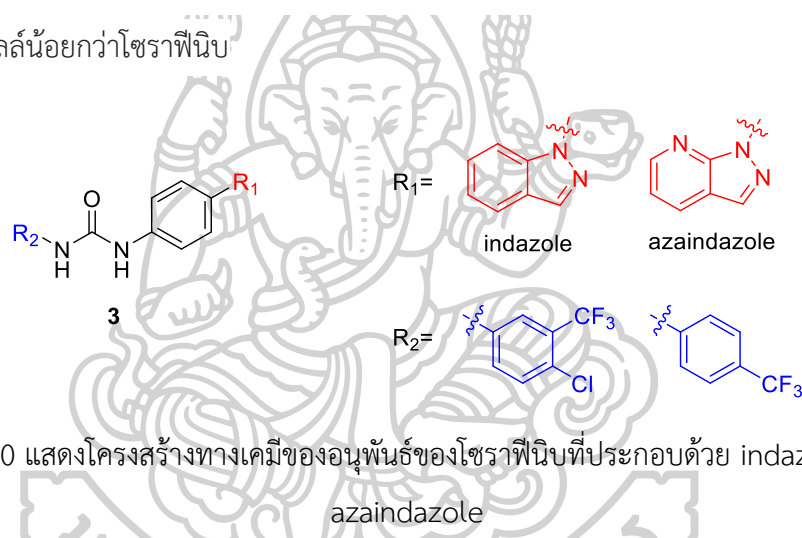
ภาพที่ 9 แสดงโครงสร้างของ Bis-aryl urea derivatives และโมเลกุลที่ฤทธิ์ในการยับยั้ง MDA-MB-231 และ SMMC-7721 ดีที่สุดของสารกลุ่มนี้

ตารางที่ 2 แสดงโครงสร้างของแสดงโครงสร้างของ Bis-aryl urea derivatives

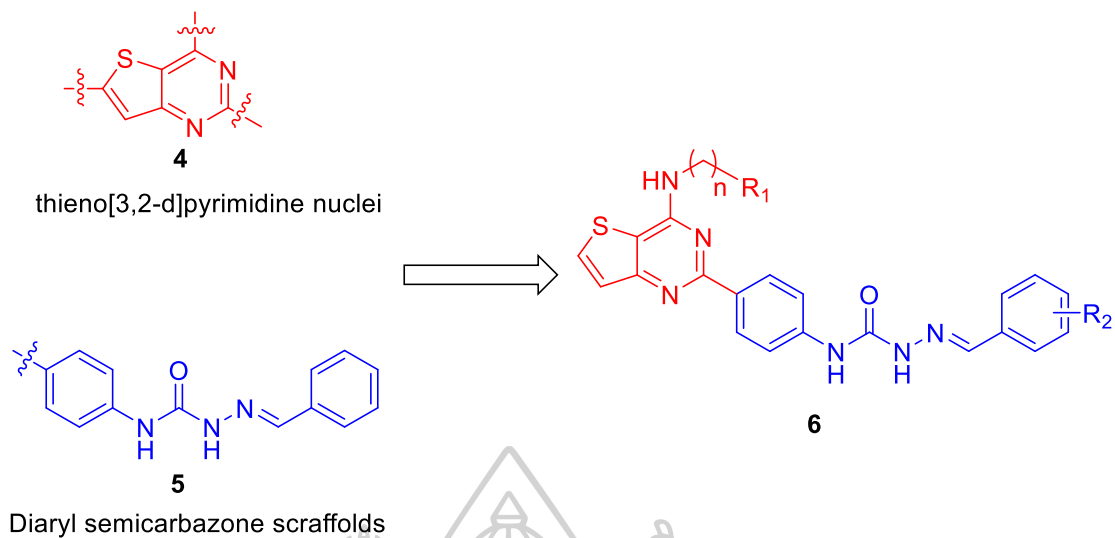
สาร หมายเลข	X	Ar	สาร หมายเลข	X	Ar
2-1	H		2-10	H	
2-2	H		2-11	H	
2-3	H		2-11	Cl	
2-4	H		2-12	Cl	
2-5	H		2-13	Cl	
2-6	H		2-14	Cl	
2-7	H		2-15	Cl	
2-8	H		2-16	Cl	
2-9	H		2-17	Cl	

ต่อมาในปี 2013 Cui-rong Zhao และคณะ⁴¹ ได้ทำการสังเคราะห์โมเลกุลหมายเลข 3 เลียนแบบโซราฟีนิบ โดยทำการเปลี่ยนแปลง 2 ตำแหน่ง กล่าวคือ เปลี่ยนหมู่ *N*-methyl

picolinamide เป็น indazole derivatives หรือ azaindazole derivatives และหมู่แทนที่บน Aryl urea เป็น 4-chloro,3-trifluoromethyl หรือ 4-trifluoromethyl (ภาพ 11) ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ คือ NCI-H460 (เซลล์มะเร็งปอด), A549 (เซลล์มะเร็งปอด), OS-RC-2 (เซลล์มะเร็งไต), HT-29 (เซลล์มะเร็งลำไส้), LOVO (เซลล์มะเร็งลำไส้), HepG2 (เซลล์มะเร็งตับ), Bel-7402 (เซลล์มะเร็งตับ), SGC-7901 (เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร) และ MDA-MB-231 (เซลล์มะเร็งเต้านม) พบว่า indazole ring มีความสำคัญในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ และการมีหมู่แทนที่เป็น trifluoromethyl หรือ halogen ที่ตำแหน่งที่ 4 มีความสำคัญเช่นกัน โดยเฉพาะในเซลล์ NCI-H460, A549, OS-RC-2, Bel-7402 และ MDA-MB-231 แต่อย่างไรก็ตาม สารในกลุ่มนี้มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับน้อยกว่าโซราฟินิบ แต่สารในกลุ่มนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าโซราฟินิบ



ปี 2014 Zijian Liu และคณะ⁴² ได้ทำการสังเคราะห์โมเลกุลที่มีโซราฟินิบเป็นต้นแบบ โดยทำการรวมโครงสร้างสามลักษณะ คือ Biaryl Semicarbazone (6) ที่ได้จากลักษณะของโซราฟินิบ และ PAC-1 ร่วมกับ thieno[3,2-d]pyrimidine nuclei (5) ได้เป็นสารที่ต้องการหมายเลข 6 ดังแสดงในภาพที่ 11

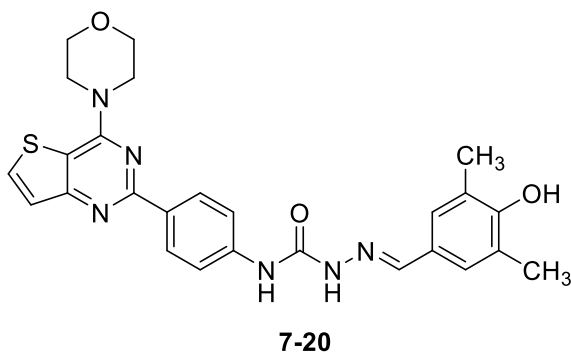


ภาพที่ 11 แสดงการออกแบบโมเลกุล Sorafenib derivatives ที่เกิดจากการรวมกันของ thieno[3,2-d]pyridine nuclei และ Diaryl semicarbazone scaffolds



ตารางที่ 3 แสดงหมู่แทนที่ชนิดต่าง ๆ ของอนุพันธ์โซราฟินิบ

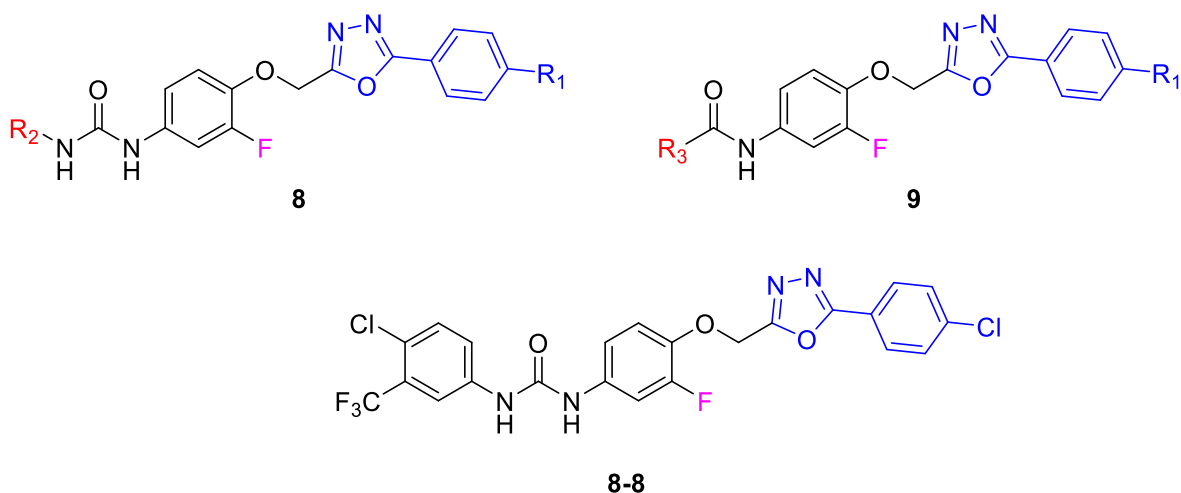
สาร หมายเลข	n	R1	R2
7-1	3	4-morpholine	2,4-Cl
7-2	3	4-morpholine	2,3-Cl
7-3	3	4-morpholine	4-OH
7-4	3	4-morpholine	3-OH
7-5	3	4-morpholine	3-F,4-OH
7-6	3	4-morpholine	3-Br, 4-OH
7-7	3	4-morpholine	3-OCH ₃ , 4-OH
7-8	3	4-morpholine	3,5-Br, 4-OH
7-9	3	4-morpholine	3,5-CH ₃ , 4-OH
7-10	3	4-morpholine	3,5-OCH ₃ , 4-OH
7-11	0	4-morpholine	2,3-Cl
7-12	0	4-morpholine	4-OH
7-13	0	4-morpholine	3,4-OH
7-14	0	4-morpholine	2,4-OH
7-15	0	4-morpholine	2,3,4-OH
7-16	0	4-morpholine	3-F, 4-OH
7-17	0	4-morpholine	3-Br, 4-OH
7-18	0	4-morpholine	3-OCH ₃ , 4-OH
7-19	0	4-morpholine	3,5-Br, 4-OH
7-20	0	4-morpholine	3,5-CH ₃ , 4-OH
7-21	0	4-morpholine	3,5-OCH ₃ , 4-OH
7-22	2	diethylamino	2,3-Cl
7-23	2	diethylamino	3,4-OH
7-24	2	diethylamino	2,4-OH
7-25	2	diethylamino	2,3,4-OH
7-26	2	diethylamino	3-F, 4-OH
7-27	2	diethylamino	3,5-Br, 4-OH
7-28	2	diethylamino	3,5-CH ₃ , 4-OH



ภาพที่ 12 แสดง Sorafenib derivatives ที่มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุดในกลุ่มของการรวมกันระหว่าง thieno[3,2-d]pyridine nuclei และ Diaryl semicarbazone scaffolds จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร **7** ในการต้านเซลล์มะเร็ง H460 (เซลล์มะเร็งปอด), HT-29 (เซลล์มะเร็งลำไส้), MKN-45 (เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร) และ MDA-MB-231 (เซลล์มะเร็งเต้านม) พบว่า การที่มี 4-morpholino group ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของ thieno[3,2-d]pyrimidine ทำให้ความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับโมเลกุลที่มีหมู่แทนที่เป็นสายอะมิโน และการมีหมู่ methoxy ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 หรือหมู่ให้อิเล็กตรอนที่อ่อนที่ตำแหน่ง 3 และ 5 ที่ด้านปลายของ phenyl ring จะมีฤทธิ์เพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 12) โดยโมเลกุลดังกล่าว (**7-20**) มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งสำหรับ H460 และ HT-29 มากกว่าโซราฟินิบ 30.4 และ 92.6 เท่า ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.057, 0.039 μM ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ PI3K α และ mTOR พบว่า มีค่า IC_{50} ต่ำมาก คือ 0.027 μM และ 0.77 μM ตามลำดับ

ในปี 2015 Mahmoud M⁴³ และคณะ ได้ทำการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบโซราฟินิบโดยที่มี 3 ตำแหน่งที่เปลี่ยนแปลงไป คือ Diaryl Urea, phenoxy ring และ *N*-methyl picolinamide (ภาพที่ 13) โดยที่ตำแหน่ง Diaryl Urea ถูกทำการเปลี่ยนแปลงโดยการเปลี่ยนหมู่แทนที่ (8) และเปลี่ยนแปลงจากยูเรียเป็นเอไมด์ที่มีหมู่แทนที่ต่างๆ (9) โดยที่หมู่แทนที่ดังกล่าวเป็นหมู่ Aromatic และ Aliphatic หลังจากนั้นนำสารไปทดสอบเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ 58 cell lines จากเนื้อเยื่อต้นกำเนิดเซลล์มะเร็ง 9 ชนิด ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือด ปอด ลำไส้ใหญ่ ระบบประสาทส่วนกลาง ผิวหนัง รังไข่ ไต ต่อมลูกหมาก และเต้านม โดยทำการสกรีนที่ความเข้มข้น 10 μM จากการทดลองพบว่า สารในกลุ่มที่เป็นยูเรียมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าเอไมด์ และเมื่อเปรียบเทียบหมู่แทนที่ชนิดเดียวกันในส่วนของกลุ่มเอไมด์พบว่าการที่มีหมู่แทนที่เป็น Aromatic มีความสามารถในการ

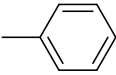
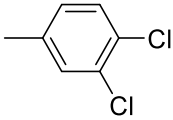
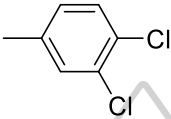
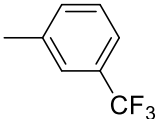
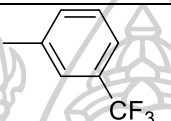
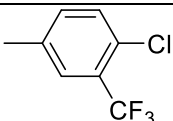
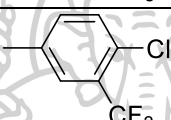
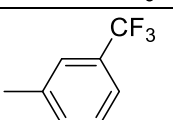
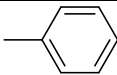

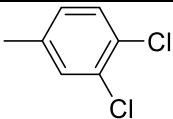
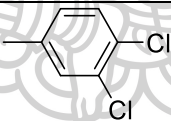
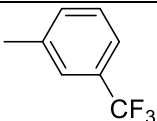
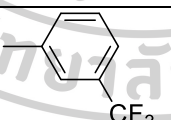
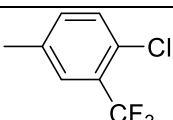
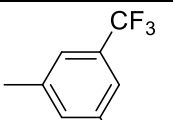
การยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าการมีหมู่แทนที่เป็น Aliphatic โดยเมื่อหมู่แทนที่บน aromatic บริเวณ Diaryl Urea มี lipophilicity สูงขึ้นจะมีฤทธิ์ที่สูงขึ้น เช่น วง trifluoromethyl phenyl หรือ วง chlorophenyl เป็นต้น โมเลกุลที่ดีที่สุดคือที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง 58 ชนิด และมีค่าเฉลี่ยของ ร้อยละการยับยั้งสูงสุดถึง 99.64 % คือ โมเลกุลที่ 10



ภาพที่ 13 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Sorafenib derivatives ที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้าง 3 ตำแหน่ง คือ Diaryl urea, phenoxy ring และ N-methyl picolinamide ตารางที่ 4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์โซราฟินิบ

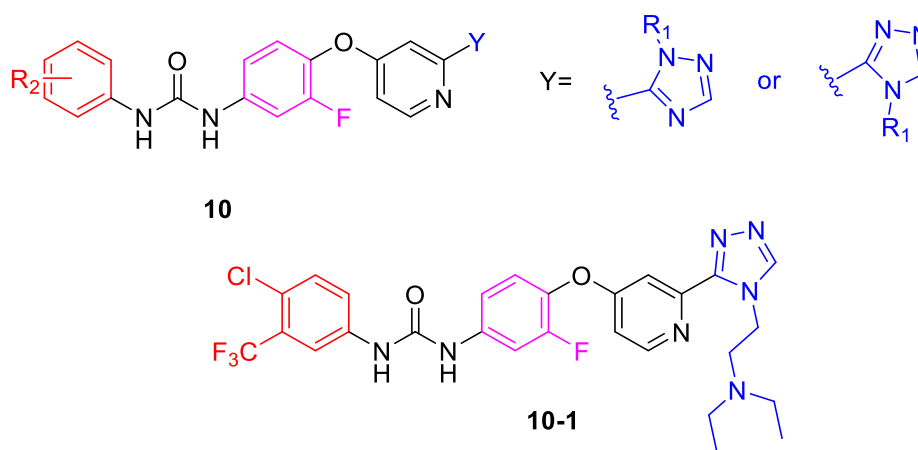
สาร หมายเลข	R1	R2	สาร หมายเลข	R1	R2
8-1	H		9-1	H	
8-2	H		9-2	H	
8-3	H		9-3	H	
8-4	Cl	—Et	9-4	H	

ตารางที่ 5 (ต่อ) แสดงโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์โซราฟีนิบ

สาร หมายเลข	R1	R2	สาร หมายเลข	R1	R2
8-5	Cl		9-5	Cl	
8-6	Cl		9-6	Cl	
8-7	Cl		9-7	Cl	
8-8	Cl		9-8	Cl	
8-9	OMe	—Et	9-9	OMe	
8-10	OMe		9-10	OMe	
8-11	OMe		9-11	OMe	
8-12	OMe		9-12	OMe	
			9-13	OMe	

ในปี 2016 Mingze Qin และคณะ⁴⁴ ได้มีการศึกษาอนุพันธ์ของโซราฟีนิบโดยได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง 3 ตำแหน่ง คือ หมู่แทนที่บน Aryl Urea การเติมฟลูออรีนอะตอม ลงบนวง Phenoxy และการเปลี่ยนตำแหน่ง Picolinamide เป็น 1,2,4-triazole (ภาพที่ 14) ต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพกับ HT-29 (เซลล์มะเร็งลำไส้), H460 (เซลล์มะเร็งปอด) และ

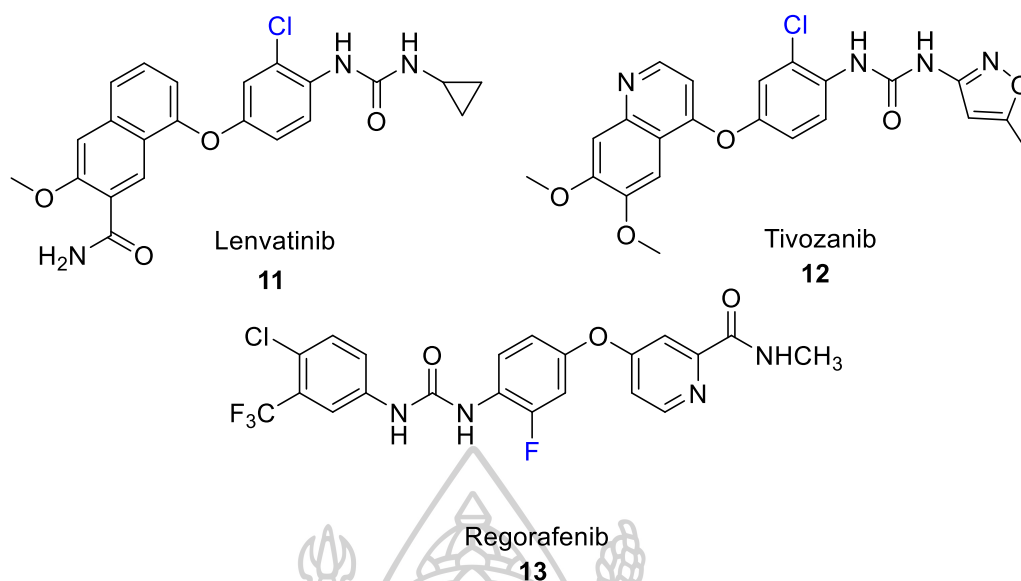
MDA-MB-231 (เซลล์มะเร็งเต้านม) โดยโมเลกุลที่ดีที่สุดคือโมเลกุล **10-1** โดยสารดังกล่าวสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งทุกชนิดได้ดีกว่าโซราฟินิบ (**10-1**; $IC_{50} = 0.90, 0.85, 1.54$ และ $6.73 \mu M$ ตามลำดับ, โซราฟินิบ; $IC_{50} = 3.37, 2.25, 3.08$ และ $8.42 \mu M$ ตามลำดับ) โครงสร้างของสารกลุ่มนี้มีความสามารถในการยับยั้งการขยายตัวของเซลล์ได้ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบโดยใช้เทคนิค Flow cytometry



ภาพที่ 14 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Sorafenib derivatives ที่ทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง 3 ตำแหน่ง

2.5.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง Benzene core structure

มีนักวิจัยส่วนมากที่สนใจในการพัฒนาโครงสร้าง Benzene core ให้มีหมู่แทนที่ชนิดต่างๆ แทนการใช้วง Benzene ที่ไม่มีหมู่แทนที่ โดยจากการศึกษาต่างๆพบว่า Benzene ที่มีหมู่แทนที่เป็นฮาโลเจน (Halogenated benzene) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดี^{15, 45} สามารถยืนยันได้จากยาชนิดต่างๆ ที่ได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา (FDA) เช่น Levantinib (**11**)^{45, 46} และ Tivozanib (**12**)^{45, 47} เป็นยาที่มีส่วนประกอบของโมเลกุลเป็น 2-chlorinated benzene ดังแสดงในภาพที่ 15 นอกจากนี้ยังมี Regorafenib (**13**)^{35, 45} ที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาเพื่อใช้ในการรักษาเซลล์มะเร็งตับในระยะลุกลาม (Advanced Hepatocellular carcinoma) เป็นยาลำดับที่สอง (Second line treatment) รองจาก Sorafenib โดยที่โมเลกุลนี้ประกอบไปด้วย 2-fluorinated benzene และมีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกับ sorafenib เป็นอย่างมากแตกต่างกันเพียงหมู่แทนที่บนวงเบนซีนเท่านั้น โดยโครงสร้างของสารดังกล่าวแสดงในภาพที่ 15 และค่า IC_{50} ในการยับยั้ง Tyrosine kinases ของยาทั้งสามชนิดนี้มีค่าดังแสดงไว้ในตารางที่ 6^{35, 45-47}



ภาพที่ 15 ภาพแสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Lenvatinib, Tivozanib

ตารางที่ 6 แสดงค่า IC₅₀ ของ Lenvatinib, Tivozanib และ Regorafenib ต่อ Receptor tyrosine kinase ชนิดต่างๆ

Receptor Tyrosine Kinase	IC ₅₀ of Lenvatinib	IC ₅₀ of Tivozanib	IC ₅₀ of Regorafenib
VEGFR-1	22	30	13
VEGFR-2	4	6.5	4.2
VEGFR-3	5.2	15	46
PDGFR-β	39	49	22
c-Kit	-	78	7
FGFR-1	-	530	-

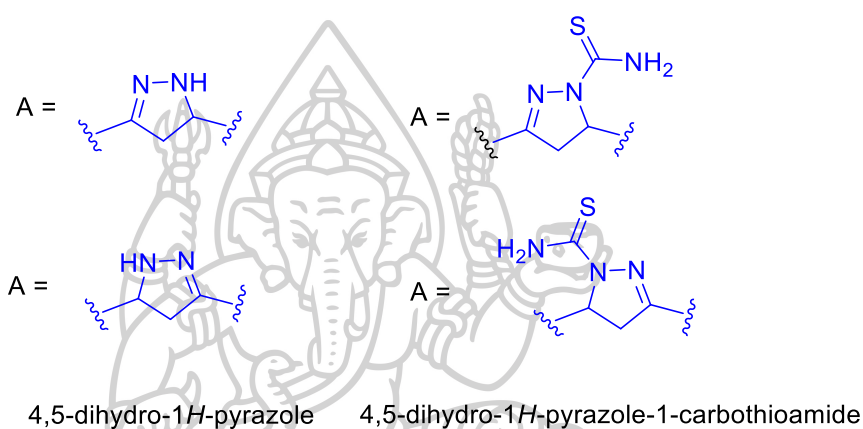
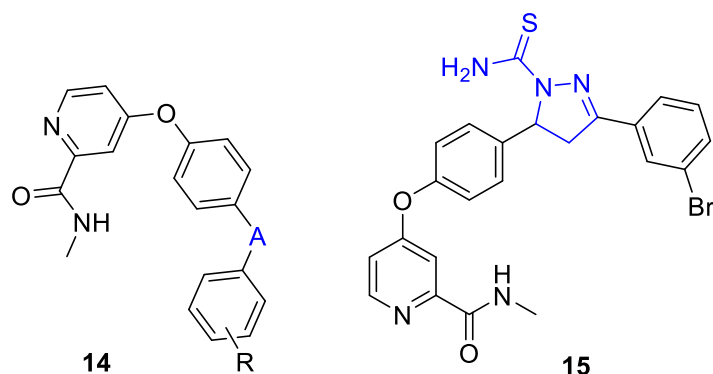
2.5.3 การศึกษาและดัดแปลงบริเวณตำแหน่ง Aryl Urea

เนื่องจากโซราฟินิบมีความสามารถในการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้น้อย โดยเกิดจากการถูก metabolite ในร่างกายที่หมู่ Picolinamide จะเกิด demethylation และเกิด hydroxylation ได้นอกจากนี้ยังเกิด glucuronidation ที่ตำแหน่งยูเรียอีกด้วย นอกจากนี้หมู่ยูเรียยังเป็น Hydrogen bond donor และ Hydrogen bond acceptor ทำให้อาจเกิด interaction กับ plasma protein

ได้ดีก่อนที่จะไปถึง target ได้ ทำให้ในปัจจุบันเริ่มมีผู้วิจัยทำการออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ของ โซราฟินิบโดยทำการแทนที่หมู่ยูเรีย

ในปี 2017 Min Wong และคณะ²⁴ ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของ Sorafenib derivatives โดยทำการเปลี่ยนแปลงหมู่ Urea เป็น 4,5-dihydro-1H-pyrazole ทั้งหมด 4 กลุ่ม คือ 4,5-dihydro-1H-pyrazole (**14**) ที่สลับตำแหน่งของพันธะคู่กัน และ 4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carbothioamide (**15**) ที่สลับตำแหน่งของพันธะคู่เช่นกัน ดังแสดงในภาพ 2.11 และทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็ง 4 ชนิดคือ A549 (เซลล์มะเร็งปอด), HepG2 (เซลล์มะเร็งตับ), MCF-7 (เซลล์มะเร็งเต้านม) และ PC-3 (เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก) รวมไปถึงการทดสอบการยับยั้ง Receptor tyrosine kinase, Kinase enzyme ชนิด VEGFR/KDR ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่, BRAF ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์, CRAF ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์, c-Met ที่เป็น Receptor tyrosine และ Hepatocyte growth factor, EGFR ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ และ Flt-3 ที่เกี่ยวข้องกับการกระบวนการขยายตัวของเซลล์ และ apoptosis พบว่าโมเลกุลส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้เทียบเท่า หรือมากกว่า Sorafenib อย่างน้อย 1 ชนิดเซลล์มะเร็ง และเมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มมากขึ้นอัตราการตายของเซลล์แบบ Apoptosis เพิ่มมากขึ้นด้วย แต่อย่างไรก็ตามความสามารถในการยับยั้ง Receptor tyrosine kinase ของสารดังกล่าว ยังน้อยกว่าโซราฟินิบประมาณ 3 เท่า

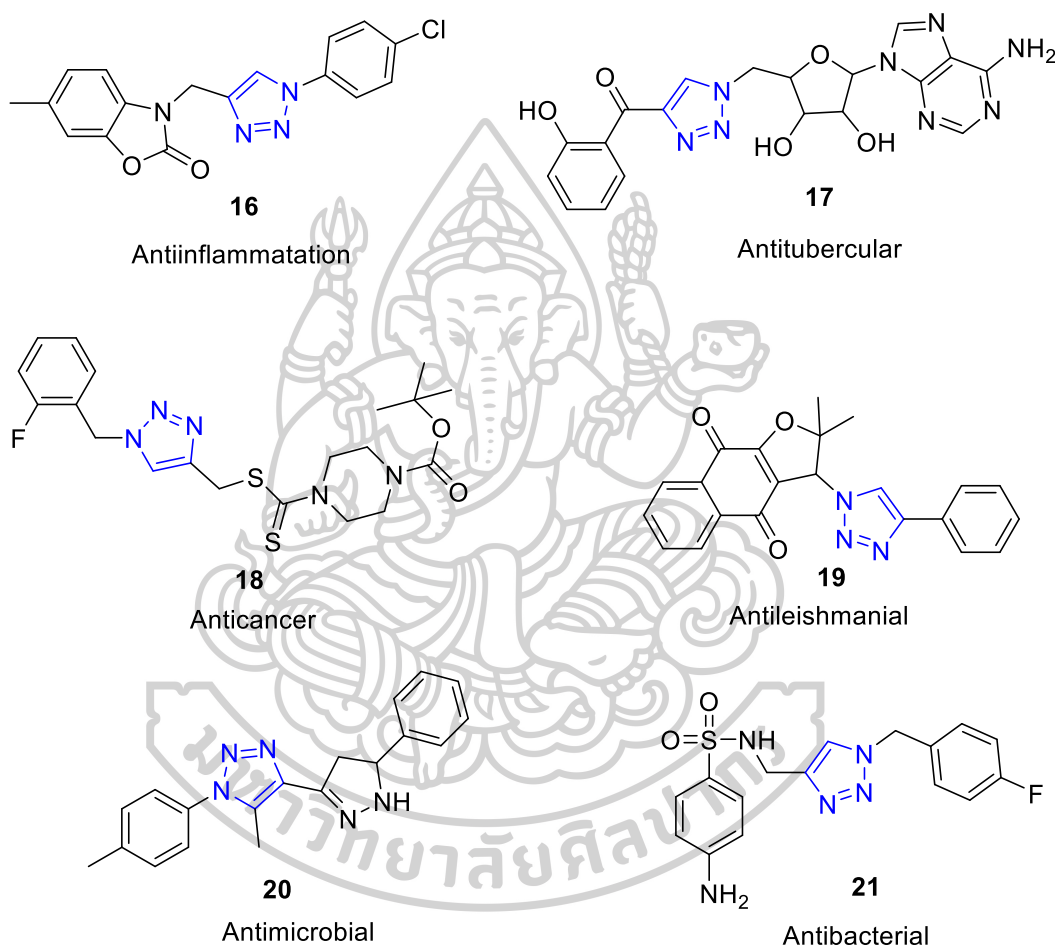




ภาพที่ 16 โครงสร้างทางเคมีของ Sorafenib derivatives ที่เปลี่ยนแปลงหมู่ Urea เป็น 4,5dihydro-1H-pyrazole, 4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carbothioamide และโครงสร้างที่มีฤทธิ์ที่ดีที่สุด (15)

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นทั้งหมดจะเห็นได้ว่า การพัฒนาโมเลกุลโดยส่วนใหญ่จะทำการเติมหรือปรับเปลี่ยนโครงสร้างต่างๆ โดยการเติมเฮเทอโรไซคลิกลงไปในส่วนหนึ่งของโมเลกุล จากคุณสมบัติทางกายภาพของเฮเทอโรไซคลิกที่แตกต่างกันส่งผลต่อประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงของโมเลกุลที่แตกต่างกัน เช่น lipophilicity, polarity และ Solubility รวมไปถึงความสามารถในการเกิดอันตรกิริยากับเป้าหมาย⁴⁸ โดยจากงานวิจัยพบว่ายาตามท้องตลาดส่วนใหญ่มีเฮเทอโรไซคลิกเป็นองค์ประกอบ จากผลการสำรวจยาที่เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก (Small molecule) ที่ขายดีที่สุด 5 อันดับแรกของสหรัฐอเมริกาในปี 2014 พบว่ามียา 4 ใน 5 ชนิด มีเฮเทอโรไซคลิกเป็นองค์ประกอบ⁴⁸ และจากผลการสำรวจพบว่าประมาณ 60% ของยาที่เป็นโมเลกุลขนาดเล็กที่ได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นเฮเทอโรไซคลิกที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ⁴⁹

1,2,3-triazole เป็นเฮเทอโรไซคลิกที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบชนิดหนึ่งประกอบด้วยไนโตรเจนจำนวน 3 อะตอม มีความสำคัญในด้านเภสัชวิทยา คือ Antiinflammatory activity (16), Antitubercular activity (17), Anticancer activity (18), Antileishmanial activity (19), Antimicrobial activity (20), Antiviral activity (21) และ Antibacterial activity (22)²⁸ นอกจากนี้ยังมีความเสถียรต่อกระบวนการ Metabolism ในร่างกาย²⁹ ดังแสดงในภาพที่ 17



ภาพที่ 17 แสดงโครงสร้างของสารต่างๆ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และมีวง 1,2,3-triazole

ในงานวิจัยนี้ได้ออกแบบอนุพันธ์ของโซราฟินิบที่มี 1,2,3-triazole แทนที่ที่หมู่ยูเรีย และมีหมู่แทนที่บน เอริลที่ที่แตกต่างกัน โดยยังคงส่วนที่เป็น phenoxy และ picolinamide ไว้ ซึ่งโครงสร้างของโซราฟินิบและโมเลกุลที่ออกแบบมีลักษณะใกล้เคียงกัน คาดว่าน่าจะสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ โดยนำโมเลกุลที่สังเคราะห์ที่ได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับ โดยทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 และ Huh7 ทดสอบความเป็นพิษของสารโดยใช้เซลล์ HEK 239 ทำการศึกษา Molecular Docking และทดสอบการยับยั้ง Cell Migration รวมถึง Cell Proliferation

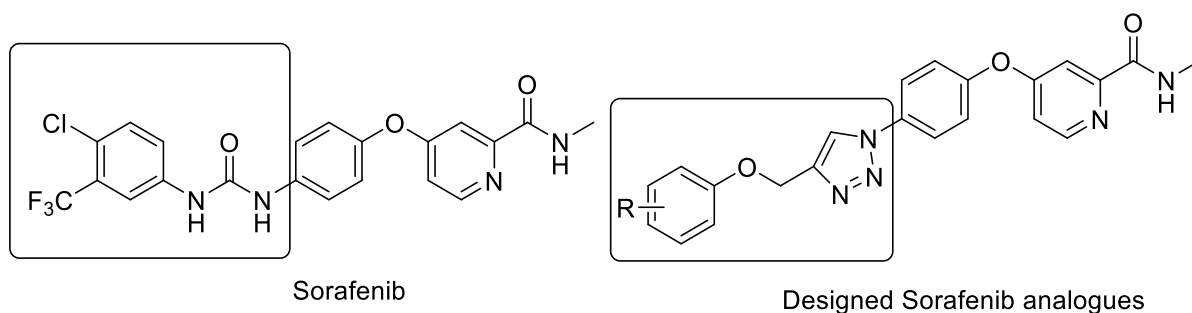
บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การออกแบบโครงสร้างอนุพันธ์ของโซราฟินิบที่มีหมู่ 1,2,3-triazole แทนที่ตำแหน่ง Aryl urea

เนื่องจากโมเลกุลโซราฟินิบนั้นประกอบไปด้วยส่วนที่ทำหน้าที่เป็น Pharmacophore 2 ส่วน คือ Aryl Urea และ Picolinamide^{50, 51} โดยที่ตำแหน่ง Aryl Urea ทำหน้าที่เป็น Hydrogen bond donor และ Hydrogen bond Acceptor ทำให้นักวิจัยส่วนใหญ่มีความสนใจในการออกแบบและพัฒนาอนุพันธ์ของโซราฟินิบโดยที่ยังคงหมู่ Aryl Urea ไว้และทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างที่ตำแหน่งอื่น แต่อย่างไรก็ตาม หมู่ยูเรียสามารถเกิดอันตรกิริยาที่ทำให้เกิดการรวมตัวกันเองของยาที่เรียกว่า Aggregation นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็น Hydrogen bond donor และ Hydrogen bond acceptor ที่ทำให้สามารถเกิดอันตรกิริยากับพลาสมาโปรตีน (Plasma Protein) ได้⁵² โดยที่ลักษณะดังกล่าวอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ยาโซราฟินิบมีค่าการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้น้อย จากเหตุผลข้างต้นทำให้การออกแบบโมเลกุลอนุพันธ์ของโซราฟินิบโดยการแทนที่ Aryl Urea ด้วย 1,2,3-triazole เป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก

ข้อมูลการศึกษา Molecular docking ของ X-ray co-crystallography พบว่า *N*-methyl picolinamide, Benzene และ Aryl Urea สามารถเกิดอันตรกิริยาได้ดีกับ Adenine Pocket และ Hydrophobic Pocket ของ B-Raf และ VEGFR-2 ซึ่งเป็นโปรตีนและ Receptor ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการขยายตัวของเซลล์ (cell-proliferation) และการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis)^{33, 34} นอกจากนี้ โมเลกุล 1,2,3-triazole นั้นยังเป็นส่วนสำคัญในโมเลกุลยาชนิดต่างๆ รวมถึงยารักษา มะเร็งชนิดอื่น ๆ^{53, 54} อีกทั้งยังมีความเสถียรต่อ Metabolism ในร่างกายอีกด้วย²⁹ ดังนั้นการแทนที่ Aryl Urea ด้วย 1,2,3-triazole ที่เชื่อมต่อกับส่วนของโมเลกุลที่เป็น Hydrophobic (ภาพที่ 18) ซึ่งคาดว่าจะสามารถเกิดอันตรกิริยากับ Adenine pocket ได้ นอกจากนี้ 1,2,3-triazole ยังทำหน้าที่เป็น Hydrogen bond acceptor ที่จะจับกับเป้าหมายได้ อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ เซลล์มะเร็งได้

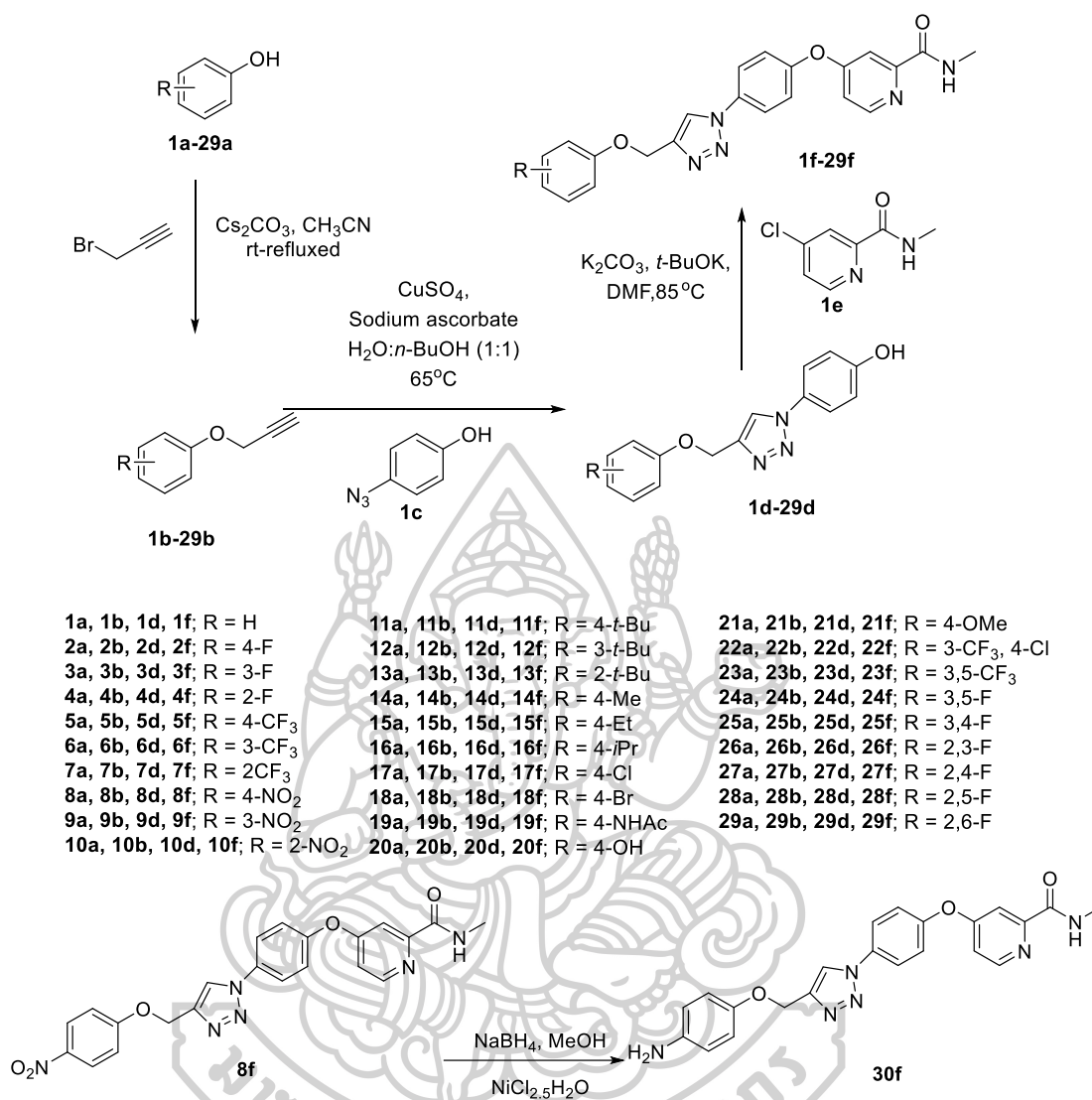


ภาพที่ 18 โครงสร้างทางเคมีของยาโซราเฟนิบเปรียบเทียบกับอนุพันธ์ของโซราเฟนิบที่ออกแบบ

3.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของโซราเฟนิบที่มีหมู่ 1,2,3-triazole แทนที่ตำแหน่ง Aryl urea

กระบวนการในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของโซราเฟนิบที่มีหมู่ 1,2,3-triazole แทนที่ตำแหน่ง Aryl urea สามารถสังเคราะห์ได้ผ่าน 3-4 ขั้นตอนดังแสดงในภาพที่ 19 และร้อยละของผลิตภัณฑ์ของอนุพันธ์แต่ละชนิดในแต่ละขั้นดังแสดงในตารางที่ 7 และ 8 โดยเริ่มทำปฏิกิริยาวิลเลียมสันอีเทอร์ (Williamson ether synthesis) ระหว่างอนุพันธ์ของฟีนอล **1a-29a** (phenol derivatives) กับโพรพาร์กิล โบรไมด์ (propargyl bromide) โดยมีซีเซียมคาร์บอเนต (Cesium carbonate, Cs_2CO_3) เป็นเบส ในตัวทำละลาย acetonitrile จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบอนุพันธ์ของ (prop-2-yn-1-yloxy)benzene **1b-29b** มีหมู่แทนที่ที่แตกต่างกัน โดยมีร้อยละของผลผลิตอยู่ในช่วง 44 ถึง Quantitative yield

หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มา coupling กับ 4-azidophenol (**1c**) ผ่านปฏิกิริยาคลิก (azide-alkyne Huisgen cycloaddition หรือ 1,3-dipolar cycloaddition) ที่มี Copper sulfate (CuSO_4) และ Sodium ascorbate เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลาย 50% *n*-BuOH ในน้ำ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์ของ 4-(4-(phoxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol **1d-29d** คิดเป็นร้อยละ 25-96 และทำการสังเคราะห์ต่อไปเพื่อให้ได้อนุพันธ์ของโซราเฟนิบที่ได้ออกแบบไว้ โดยทำปฏิกิริยาการแทนที่โรมาติกด้วยนิวคลีโอไฟล์ (nucleophilic aromatic substitution) ระหว่างอนุพันธ์ของ 4-(4-(phoxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol **1f-29f** และ 4-chloro-*N*-methyl picolinamide (**1e**) ที่มีเบส Potassium Carbonate (K_2CO_3) และ potassium tertiary butoxide (*t*-BuOK) ในตัวทำละลาย DMSO ได้ผลิตภัณฑ์ 18-83 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 19 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์อนุพันธ์ไพริโซราฟีนที่แทนที่หมู่ Aryl Urea ด้วย 1,2,3 triazole ที่เชื่อมต่อกับ Substituted phenoxy (1f-30f)

นอกจากนี้ โมเลกุล *p*-amino substituted derivative **30f** สามารถสังเคราะห์ได้โดยการทำปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction) โดยใช้ Sodium Borohydride (NaBH₄) และ Methanol ที่มี NiCl₂.5H₂O เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ผลิตภัณฑ์คิดเป็น 77 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 19

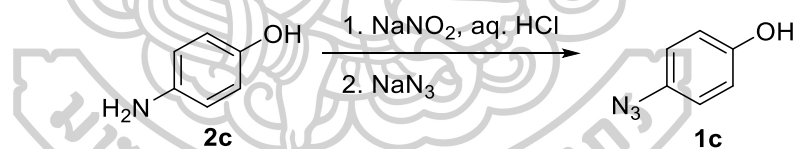
ตารางที่ 7 แสดงร้อยละผลผลิตของอนุพันธ์โซราฟีนิบแต่ละชนิดในแต่ละขั้นตอน

Phenols (a)		Alkynes (b)		1,2,3-Triazoles (d)		Sorafenib analogues (f)	
Compound	R	Compound	yield	Compound	yield	Compound	yield
1a	H	1b	44	1d	62	1f	76
2a	4-F	2b	76	2d	62	2f	35
3a	3-F	3b	97	3d	81	3f	53
4a	2-F	4b	92	4d	57	4f	27
5a	4-CF ₃	5b	quant.	5d	82	5f	42
6a	3-CF ₃	6b	85	6d	39	6f	53
7a	2-CF ₃	7b	98	7d	66	7f	47
8a	4-NO ₂	8b	quant.	8d	63	8f	18
9a	3-NO ₂	9b	97	9d	96	9f	38
10a	2-NO ₂	10b	quant.	10d	80	10f	38
11a	4- <i>t</i> Bu	11b	85	11d	26	11f	44
12a	3- <i>t</i> Bu	12b	96	12d	47	12f	31
13a	2- <i>t</i> Bu	13b	quant.	13d	48	13f	42
14a	4-Me	14b	93	14d	31	14f	77
15a	4-Et	15b	quant.	15d	25	15f	39
16a	4- <i>i</i> Pr	16b	quant.	16d	67	16f	44
17a	4-Cl	17b	70	17d	53	17f	97
18a	4-Br	18b	94	18d	87	18f	47
19a	4-NHAc	19b	98	19d	82	19f	42
20a	4-OH	20b	93	20d	58	20f	31
21a	4-OMe	21b	93	21d	89	21f	62
22a	3-CF ₃ , 4-Cl	22b	93	22d	41	22f	36
23a	3,5-CF ₃	23b	quant.	23d	85	23f	62
24a	3,5-F	24b	82	24d	77	24f	42

ตารางที่ 8 (ต่อ) แสดงร้อยละผลผลิตของอนุพันธ์โซราเฟนิบแต่ละชนิดในแต่ละขั้นตอน

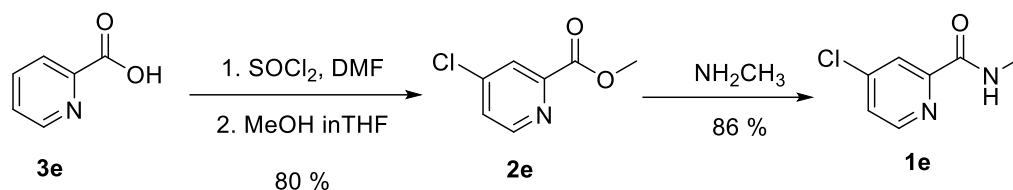
Phenols (a)		Alkynes (b)		1,2,3-Triazoles (d)		Sorafenib analogues (f)	
Compound	R	Compound	yield	Compound	yield	Compound	yield
25a	3,4-F	25b	88	25d	3,4-F	25f	88
26a	2,3-F	26b	77	26a	2,3-F	26b	77
27a	2,4-F	27b	78	27a	2,4-F	27b	78
28a	2,5-F	28b	92	28a	2,5-F	28b	92
29a	2,6-F	29b	96	29a	2,6-F	29b	96
30a	4-NH ₂	30b	-	30d	-	0f	77

กระบวนการในการสังเคราะห์สารตั้งต้น 4-azido phenol (**1c**) สามารถสังเคราะห์ที่ผ่านปฏิกิริยา Diazotization ของ 4-aminophenol (**2c**) โดยใช้ Sodium Nitrite ในสารละลาย Hydrochloric และ Nucleophilic Aromatic Substitution ด้วย Sodium Azide⁵⁵ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารที่ไม่เสถียรในบรรยากาศ ดังแสดงในภาพที่ 20



ภาพที่ 20 แสดงวิธีการสังเคราะห์ 4-azidophenol (**1c**)

กระบวนการในการสังเคราะห์ 4-chloro-N-methyl picolinamide (**1e**) สามารถทำได้ภายใน 3 ขั้นตอน ซึ่งเป็นวิธีที่ทำการตัดแปลงมาจากงานวิจัยที่มีรายงานไว้⁵⁶ ดังแสดงในภาพที่ 21 โดยทำการ Activate หมู่ Carboxylic ของ Picolinic acid (**3e**) ด้วยการเปลี่ยนไปเป็น Acyl chloride โดยใช้ Thionyl Chloride (SOCl₂) หลังจากนั้นทำปฏิกิริยา Methanol ทำให้ได้ Ester (**2e**) คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ ก่อนที่จะทำปฏิกิริยา Amide Formation กับ Methylamine ได้ผลิตภัณฑ์ (**1e**) 86 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 21 แสดงวิธีการสังเคราะห์ 4-chloro-N-methyl picolinamide (**1e**)

3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activities) และการศึกษาความสัมพันธ์ของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพเชิงโครงสร้าง (Structure-Activity relationships, SARs)

โมเลกุลที่ออกแบบและสังเคราะห์ทั้งหมด 30 โมเลกุล (**1f-30f**) ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 และ Huh7 (Anti-HepG2 and Huh7 activates) และใช้เทคนิค MTT assay เพื่อหาค่า IC_{50} รวมถึงศึกษาความสัมพันธ์ของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพเชิงโครงสร้างโดยพิจารณาการแทนที่ Aryl Urea ด้วย 1,2,3-triazole ที่ต่อกับ Substituted phenoxy ring โดยพิจารณาจากชนิดของหมู่แทนที่ ตำแหน่งของหมู่แทนที่ และจำนวนของหมู่แทนที่บน Phenoxy ring

เพื่อทดสอบว่าหมู่แทนที่ชนิดใดและตำแหน่งใดที่ทำให้โมเลกุลมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ในงานวิจัยนี้จึงได้สังเคราะห์โมเลกุล **1f-13f** ที่มีหมู่แทนที่ เช่น Fluorine, Trifluoromethyl, Nitro และ *tert*-butyl บนตำแหน่ง *ortho*, *meta* และ *para* และนำโมเลกุลดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการต้านเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 และ Huh7 เปรียบเทียบกับโมเลกุลที่ไม่มีหมู่แทนที่ (**1f**) และ Sorafenib จากผลการทดสอบพบว่าการมีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง *para*, การมี Fluorine atom เป็นหมู่แทนที่และการมี alkyl group ซึ่งมีเป็นหมู่ที่มีความเป็น Hydrophobic มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับได้ ($IC_{50} < 100 \mu\text{M}$) ดังแสดงในตารางที่ 9

สำหรับโมเลกุลที่มีหมู่แทนที่เป็น Fluorine atom (**2f-4f**) พบว่าการมีหมู่แทนที่เป็น Fluorine atom ที่ตำแหน่ง *para* (**2f**) มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับชนิด Huh7 ได้ดีกว่าตำแหน่ง อื่นๆ โดยโมเลกุลดังกล่าวมีค่า $IC_{50} = 64.40 \mu\text{M}$ ในขณะที่หมู่แทนที่ตำแหน่งอื่นมีค่า IC_{50} มากกว่า $300 \mu\text{M}$ และในส่วนของ Trifluoromethyl substituted molecules (**5f-7f**) พบว่าโมเลกุลที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง *para* (**5f**) มีค่า $IC_{50} = 50.91 \mu\text{M}$ ซึ่งดีกว่าหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งอื่น ๆ นอกจากนี้โมเลกุลที่มีหมู่แทนที่เป็น Nitro group ที่ตำแหน่ง *ortho* (**10f**) และ *Tert*-butyl group

ที่ตำแหน่ง *meta* (**12f**) ยังมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับได้ทั้งชนิด HepG2 และ Huh7 (**10f**, HepG2; $IC_{50} = 72.00 \mu\text{M}$, Huh7; $IC_{50} = 52.48 \mu\text{M}$, **12f**, HepG2; $IC_{50} = 61.60 \mu\text{M}$, Huh7; $IC_{50} = 47.35 \mu\text{M}$) แต่อย่างไรก็ตามโมเลกุลดังกล่าวยังคงมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับชนิด Huh7 ได้ดีกว่า HepG2 ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับกับอนุพันธ์ของโซราฟินิบตัวอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามการมีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง *para* (**8f**, *p*-NO₂, $IC_{50} = 21.13 \mu\text{M}$, **11f**, *p*-tBu, $IC_{50} = 5.67 \mu\text{M}$) ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับชนิด Huh7 ได้ดีกว่าหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งอื่นๆ

ตารางที่ 9 ตารางแสดงผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และ Huh7 ของอนุพันธ์ของโซราฟินิบที่แทนที่ตำแหน่ง Aryl Urea ด้วยหมู่ 1,2,3-triazole (1f-13f) เพื่อศึกษาผลของการมีหมู่แทนที่และผลของตำแหน่งของหมู่แทนที่ต่อความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

Compound	R	IC ₅₀ (μM)	
		HepG2	Huh7
1f	H	234.333±86.236	351.146±181.332
2f	4-F	>500	64.404±5.469
3f	3-F	>300	>300
4f	2-F	>300	>300
5f	4-CF ₃	>300	50.906±0.375
6f	3-CF ₃	>300	>300
7f	2-CF ₃	>300	>300
8f	4-NO ₂	>500	21.125±5.903
9f	3-NO ₂	>100	>300
10f	2-NO ₂	71.995±5.503	52.482±0.797
11f	4-tBu	>300	5.665±0.574
12f	3-tBu	61.596±5.229	47.347±1.072
13f	2-tBu	>300	>300
Sorafenib		3.871±1.740	2.930±0.652

จากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับชนิด Huh7 ได้ดีที่สุดคือโมเลกุล **11f** ซึ่งมีหมู่แทนที่มีความเป็น Hydrophobic ที่ตำแหน่ง *para* ผู้วิจัยจึงได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของโซราฟีนิบที่ทำการแทนที่หมู่ Aryl Urea ด้วย 1,2,3-triazole ที่ต่อกับ Substituted phenoxy ring เพิ่มเติมโดยการเปลี่ยนแปลงชนิดของหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง *para* เป็นหมู่ให้และหมู่ดึงอิเล็กตรอนโดยเฉพาะหมู่ที่มีความเป็น Hydrophobic เช่น alkyl group ดังแสดงใน **ตารางที่ 9**

การศึกษาผลของ Hydrophobicity ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลง Alkyl group บนวง Phenoxy ที่ตำแหน่ง *para* เป็น Methyl, Ethyl, Isopropyl และ Tert-butyl groups (**11f, 14f-16f**) ดังแสดงใน **ตารางที่ 10** จากผลการทดลองพบว่า Tert-butyl groups (**11f**) ซึ่งเป็นหมู่แทนที่ที่มี Hydrophobicity สูงที่สุดยังคงเป็นหมู่แทนที่ที่ดีที่สุด ในส่วนของการศึกษาผลของชนิดของหมู่แทนที่ที่เปลี่ยนแปลงไปโดยทำการเปลี่ยนหมู่แทนที่เป็นหมู่แทนที่ที่มีความสามารถในการให้และรับอิเล็กตรอนที่แตกต่างกันดังแสดงใน **ตารางที่ 9** เปรียบเทียบกับอนุพันธ์ของโซราฟีนิบที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง *para* (**2f, 5f, 8f, 11f**) ใน **ตารางที่ 9** จากผลการทดลองพบว่า โมเลกุลส่วนใหญ่ยังคงมีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งระดับชนิด Huh7 แต่ในกรณีของการมีหมู่แทนที่เป็น Hydroxy group ที่ตำแหน่ง *para* นั้นพบว่า มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 และ Huh7 (**20f, HepG2; IC₅₀ = 84.01 μM, Huh7; IC₅₀ = 36.20 μM**) แต่ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับชนิด Huh7 ได้ดีกว่า HepG2 เช่นเดียวกัน และจากการศึกษาผลของชนิดของหมู่แทนที่ที่เปลี่ยนแปลงไปต่อความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับชนิดพบว่าหมู่ให้อิเล็กตรอนอ่อนๆ และหมู่ดึงอิเล็กตรอนอ่อนๆ รวมไปถึงหมู่แทนที่ที่เป็นหมู่ Nitro และหมู่ Hydroxy ที่ตำแหน่ง *para* บนวง Phenoxy เป็นหมู่แทนที่ที่มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับชนิด Huh7 ได้ดี

นอกจากนี้การแทนที่ตำแหน่ง Aryl Urea ด้วย 1,2,3-triazole โดยที่มีหมู่แทนที่บนวง Phenoxy เหมือนกับโซราฟีนิบ (**22f; IC₅₀ > 300 μM** สำหรับ HepG2 และ Huh7, โซราฟีนิบ; HepG2 และ Huh7 มี IC₅₀ = 3.87 และ 2.93 μM ตามลำดับ) ทำให้ความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับหายไป จึงสามารถสรุปได้ว่า 3-CF₃, 4-Cl ไม่เหมาะที่จะใช้เป็นหมู่แทนที่ในอนุพันธ์ของโซราฟีนิบที่ทำการแทนที่หมู่ Aryl Urea ด้วย 1,2,3-triazole ที่ต่อกับ Substituted phenoxy ring นี้

นอกจากนี้ยังพบว่า การแทนที่ Hydrogen atom ด้วย Fluorine atom ยังสามารถเพิ่มความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย โดยสามารถยืนยันได้โดยการเปลี่ยน Hydrogen atom (**1f**) ที่มีค่า $IC_{50} = 351.15 \mu M$ เป็น *para*-Fluorine (**2f**) ที่มีค่า $IC_{50} = 64.40 \mu M$ ซึ่งมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น และการเปลี่ยน Methyl group (**14f**) ที่มีค่า $IC_{50} = 112.68 \mu M$ เป็น Trifluoromethyl group (**5f**) ที่มีค่า $IC_{50} = 50.91 \mu M$ ซึ่งมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น 2 เท่า ตามลำดับ ตารางที่ 10 ตารางแสดงผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 และ Huh7 ของอนุพันธ์ของโซราฟินิบที่แทนที่ตำแหน่ง Aryl Urea ด้วยหมู่ 1,2,3-triazole (**14f-22f**, **30f**) เพื่อศึกษาผลของชนิดของหมู่แทนที่ต่อความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับ

Compound	R	IC_{50} (μM)	
		HepG2	Huh7
14f	4-CH ₃	>500	112.679±4.190
15f	4-Et	>300	>300
16f	4- <i>i</i> Pr	>300	>300
17f	4-Cl	>500	>500
18f	4-Br	>300	>300
19f	4-NHAc	>300	>300
20f	4-OH	84.009±4.584	36.201±4.377
21f	4-OCH ₃	>300	>300
22f	3-CF ₃ , 4-Cl	>300	>300
30f	4-NH ₂	>300	>300
Sorafenib (16)		3.871±1.740	2.930±0.652

จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับของอนุพันธ์โซราฟินิบที่มี Fluorine atom เป็นหมู่แทนที่ 2 ตำแหน่งที่แตกต่างกัน และทำการเปรียบเทียบกับกรณีหมู่ Trifluoromethyl เป็นหมู่แทนที่ 2 หมู่อีกด้วยดังแสดงในตารางที่ 11 โดยที่จากผลการทดลองพบว่า การเพิ่มจำนวนของ Fluorine atom (**23f-29f**) ไม่สามารถเพิ่มความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับได้ทั้งในเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 และ Huh7 โดยที่ค่า IC_{50} ของอนุพันธ์ดังกล่าวมีค่ามากกว่า $100 \mu M$

ตารางที่ 11 ตารางแสดงผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (Anti-Hepatocellular carcinoma) ชนิด HepG2 และ Huh7 ของอนุพันธ์ของโซราฟีนิบที่แทนที่ตำแหน่ง Aryl Urea ด้วยหมู่ 1,2,3-triazole (**23f-29f**) เพื่อศึกษาผลของตำแหน่งและการเพิ่มขึ้นของ Fluorine atom ต่อความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ

Compound NO.	R	IC ₅₀ (μM)	
		HepG2	Huh7
23f	3,5-CF ₃ , CF ₃	>300	>300
24f	3,5-F, F	>300	>300
25f	3,4-F, F	>300	>300
26f	2,3-F, F	>100	>100
27f	2,4-F, F	>300	>300
28f	2,5-F, F	>100	>300
29f	2,6-F, F	>300	>300
Sorafenib		3.871±1.740	2.930±0.652

ผลการทดลองข้างต้นทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าในขอบเขตของโมเลกุลที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษา หมู่แทนที่และตำแหน่งของหมู่แทนที่ที่ดีที่สุด คือ *Tert-butyl* ที่ตำแหน่ง *para* (**11f**) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ได้รับการคัดเลือกไปศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ เพิ่มเติม

3.4 การศึกษา Molecular docking

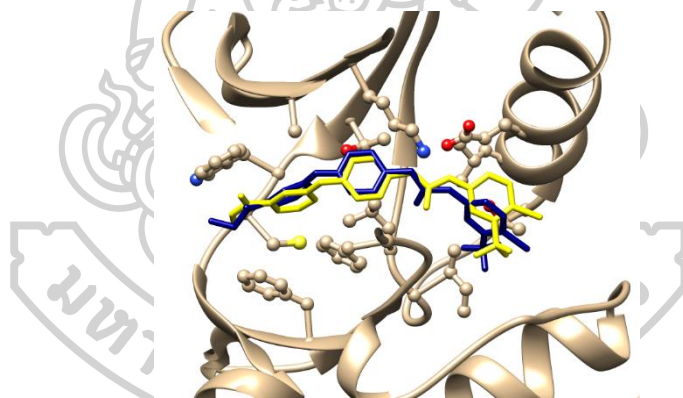
นอกจากการทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับแล้ว ทางผู้วิจัยได้ทำการศึกษา Molecular Docking เพื่อทำความเข้าใจเกี่ยวกับพลังงานและ interaction ระหว่างสารที่ได้รับการคัดเลือก (**11f**) กับ B-Raf เปรียบเทียบกับโซราฟีนิบ โดยอนุพันธ์ของโซราฟีนิบที่ได้รับการคัดเลือก (**11f**) นั้นถูกนำไป Docking

จากผลการทดลองพบว่า โมเลกุลโซราฟีนิบที่ทำการ Redocking ยังคงเข้าไปเกิด อันตรกิริยากับ active site ที่บริเวณใกล้เคียงกับ co-crystallized ของโซราฟีนิบกับ B-Raf ดังแสดงในภาพที่ 22 โดยที่มีค่า Binding Energy เท่ากับ -117.291 kcal/mol ในขณะที่โมเลกุล **11f** มีค่า Binding Energy เท่ากับ -113.787 kcal/mol นอกจากนี้ *para-tert-butyl* Phenoxy ring ของ **11f** เข้าไปเกิด interaction บริเวณเดียวกันกับ 4-Chloro-3-trifluoromethyl phenyl ring ของโซ

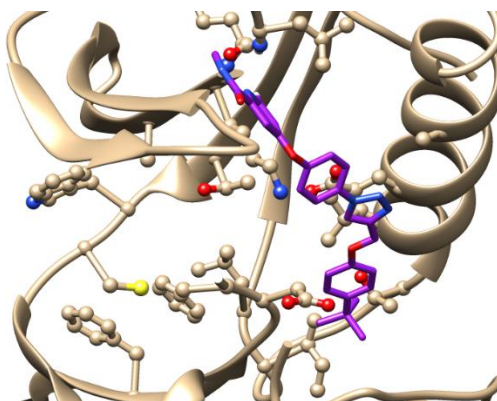
ราฟีนิบ และในส่วนอื่นๆ ของโมเลกุลเกิด interaction ระหว่าง α C-helix และ P-loop ของ B-Raf ดังแสดงในภาพที่ 23 โดยที่โมเลกุลดังกล่าวสามารถเกิด Hydrogen bond ได้ 1 ตำแหน่งคือ MET483 ในขณะที่ Sorafenib เกิด Hydrogen bond ได้ 1 ตำแหน่งคือ GLU500 และ ASP593 ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดง Binding energies, amino acid residues และ hydrogen bond lengths ของ โซราฟีนิบและ **11f** บริเวณ binding site ของ B-RAF

Compounds	Binding energy (kcal/mol)	Amino acid residue	Hydrogen bond length (Å)
11f	-113.787	MET483:O	2.76
โซราฟีนิบ	-117.291	GLU500:O, ASP593:H	2.65, 2.10



ภาพที่ 22 แสดงการเปรียบเทียบตำแหน่งของการเข้าไปเกิด Interaction ของโซราฟีนิบที่มาจาก co-crystallization (สีน้ำเงิน) และ Redocking (สีเหลือง) บริเวณ Binding site



ภาพที่ 23 แสดงการเกิด Hydrogen bond ของอนุพันธ์โซราฟีนิบ **11f**

3.5 การทดสอบความเป็นพิษของสารที่สังเคราะห์ได้ (Toxicity experimentation)

อนุพันธ์ของโซราฟีนิบที่ได้รับการคัดเลือก **11f** ถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษเปรียบเทียบกับโซราฟีนิบ และคำนวณค่า Selectivity Index (SI) ที่เป็นสัดส่วนระหว่าง Toxicity กับ Activity โดยทำการทดลองกับ HEK 239 cell lines ซึ่งเซลล์ชนิดนี้ คือ Human Embryonic Kidney cell line ที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ของมนุษย์ในระยะตัวอ่อน (Fetus) ที่มีความสามารถในการ Transformation ไปเป็นเซลล์อื่นได้ดี ซึ่งที่เซลล์ชนิดนี้มี Karyotypes เป็น Hypotriploid ที่มีโครโมโซม 64 คู่ โดยเซลล์ดังกล่าวมีความ Sensitive สูงมาก⁵⁷

จากผลการทดลองพบว่าโซราฟีนิบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HEK 293 สูงกว่าโมเลกุล **11f** โดยมีค่า IC_{50} ในการทดสอบความเป็นพิษของโซราฟีนิบต่อเซลล์ HEK 293 เป็น 2.442 μ M และโมเลกุล **11f** เป็น 3.619 μ M ตามลำดับ และจากการคำนวณค่า Selectivity Index (SI) พบว่า โซราฟีนิบมีค่า $SI = 0.8334$ ส่วนโมเลกุลที่ **11f** มีค่า $SI = 0.6388$ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าโซราฟีนิบดังแสดงในตารางที่ 13 แสดงให้เห็นว่า Sorafenib มีความเป็นพิษน้อยกว่าโมเลกุล **11f**

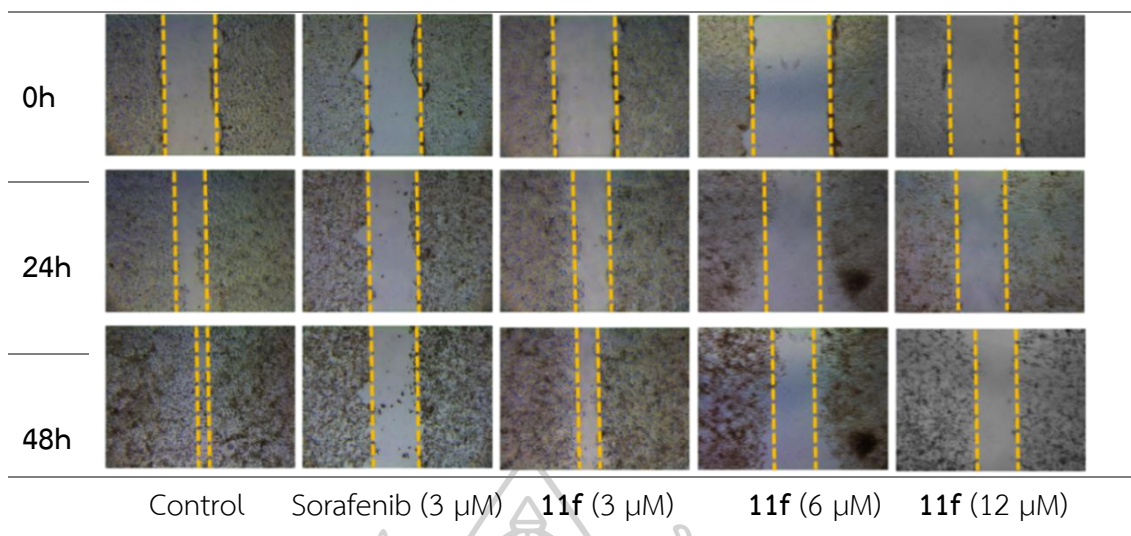
ตารางที่ 13 แสดงค่า IC_{50} ของ Sorafenib และโมเลกุล **11f** ที่ใช้ในการคำนวณค่า Selectivity Index (SI)

Compounds	IC_{50} (μ M)		Selectivity Index (SI)
	Huh7	HEK 293	
Sorafenib	2.930±0.652	2.442±0.298	0.8334
11f	5.665±0.574	3.619±0.791	0.6388

3.6 การทดสอบ Cell Migration

เนื่องจาก Cell migration เป็นกระบวนการที่มีความสำคัญในการพัฒนาการของเซลล์มะเร็ง ผู้วิจัยจึงนำโมเลกุลที่ได้รับการคัดเลือกหมายเลข **11f** มาทำการทดสอบ Cell migration โดยใช้เทคนิค Wound-Healing Assay โดยการขูดเซลล์ให้เกิด Wound gap เพื่อให้เกิดการ Heal บริเวณที่เกิด Wound gap ซึ่งจะต้องเกิดผ่าน Cell migration และ Cell growth หลังจากนั้นทำการวัด Healing rate โดยค่าที่ได้จะขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพ ชนิด และความเข้มข้นกับสารที่เติมลงไป

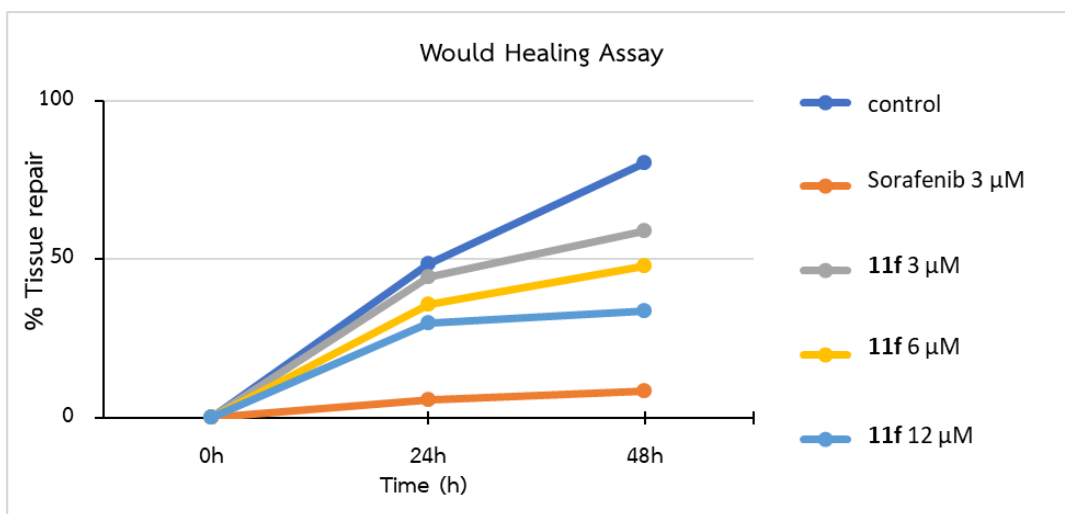
ในการทดลองนี้ทำการทดลองที่ความเข้มข้นแตกต่างกันจาก 3, 6 และ 12 μM เปรียบเทียบกับยาไซราฟิโนบที่มีความเข้มข้น 3 μM และใช้เซลล์มะเร็งตับชนิด Huh7 ในการทดสอบ โดยเปรียบเทียบ Healing ที่เวลาต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 24 และภาพที่ 25 ค่า tissue repair percentage แสดงผลตามตารางที่ 14 จากผลการทดลองพบว่า Tissue Repair percentage ของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีสารตัวอย่างขึ้นอยู่กับเวลาและความเข้มข้น ที่ความเข้มข้นเดียวกันเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น Tissue Repair percentage ก็มีค่าเพิ่มมากขึ้นด้วย และที่เวลาเดียวกันเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร Tissue Repair percentage มีค่าลดลง แสดงให้เห็นว่าสารที่นำมาทำการทดสอบมีความสามารถในการยับยั้ง cell migration ได้ โดยที่ไซราฟิโนบที่มีความเข้มข้น 3 μM มีความสามารถในการยับยั้งการเกิด Cell migration ได้ประมาณ 10 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ control (ที่ 24 h; Control = 48.541 %, ไซราฟิโนบ = 5.734 %, ที่ 48 h; Control = 80.294 %, ไซราฟิโนบ = 8.323 %) ในขณะที่ **11f** ที่ความเข้มข้น 12 μM สามารถลด cell migration ได้เพียง 2 และ 3 เท่าที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (ที่ 24 h; Control = 48.541 %, **11f** = 29.989 %, ที่ 48 h; Control = 80.294 %, **11f** = 33.560 %)



ภาพที่ 24 แสดงผลของโซราฟินิบที่ความเข้มข้น 3 μM และสารหมายเลข **11f** ที่ความเข้มข้น 3, 6 และ 12 μM ต่อ Tissue Repair percentage เปรียบเทียบกับ Control ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 14 แสดงค่า Tissue Repair Percentage ของการทดสอบ Cell migration ของโซราฟินิบ เปรียบเทียบกับ **11f** โดยวิธี Wound Healing assay โดยใช้เซลล์มะเร็งรังดับชนิด Huh7

Compounds	% Tissue repair		
	0h	24h	48h
control	0	48.54134	80.2938
sorafenib 3 μM	0	5.733818	8.322763
11f 3 μM	0	44.50438	58.81878
11f 6 μM	0	35.75999	47.82771
11f 12 μM	0	29.98901	33.56026



ภาพที่ 25 กราฟแสดง Tissue Repair percentage ที่เวลาที่เปลี่ยนแปลงไปของโซราฟินิบที่ความเข้มข้น 3 μ M, 11f 3 μ M, 11f 6 μ M และ 11f 12 μ M

3.7 การทดสอบ Anti-Proliferative activity

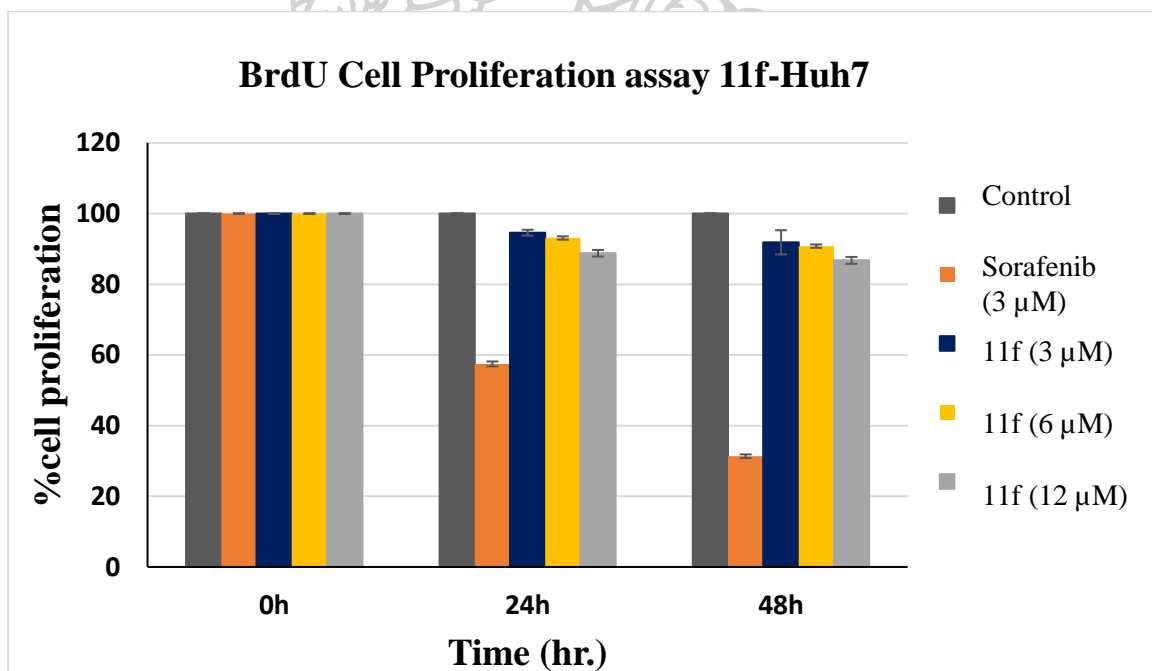
Cell Proliferation เป็นหนึ่งในกระบวนการที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยในการทดลองนี้ได้ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง Cell proliferation ของสารหมายเลข 11f เปรียบเทียบกับโซราฟินิบและ Control โดยใช้ BrdU Cell Proliferation assay ในเซลล์มะเร็งตับชนิด Huh7 โดยที่ BrdU (Bromodeoxyuridine หรือ 5-Bromo-2'-deoxyuridine) อนุพันธ์ของ thymidine ที่เป็น Halogenated Nucleotide มีคุณสมบัติคือสามารถติดฉลาก DNA ได้ โดยที่ BrdU จะทำหน้าที่ในการแทนที่ thymidine ในระยะ S-phase ของการแบ่งเซลล์⁵⁸ ทำให้สามารถตรวจสอบการเกิด Cell Proliferation ได้

จากผลการทดสอบพบว่าโมเลกุลที่ 11f มีความสามารถในการยับยั้งการเกิด Cell Proliferation ได้ เมื่อเวลาผ่านไป Cell Proliferation percentage ลดลงเหลือ 94.60, 93.09 และ 88.77 % ที่ความเข้มข้น 3, 6 และ 12 μ M ตามลำดับ ในเวลา 24 ชั่วโมง และ 91.87, 90.78 และ 86.76 % ที่ความเข้มข้น 3, 6 และ 12 μ M ตามลำดับ ในเวลา 48 ชั่วโมง จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าความสามารถในการยับยั้ง Cell Proliferation ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและเวลา ในขณะที่เดียวกันโซราฟินิบก็มีความสามารถในการยับยั้ง Cell Proliferation ได้เช่นกัน แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ดีกว่าโมเลกุลที่ 11f โดยที่ Cell Proliferation percentage ของโซราฟินิบที่ความเข้มข้น 3 μ M ลดลงเหลือ 57.46 % ในเวลา 24 ชั่วโมง และ 31.35 % ในเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดง

ในตารางที่ 15 และภาพที่ 26 แสดงให้เห็นว่าโมเลกุล **11f** ยังมีความสามารถในการยับยั้ง Cell Proliferation ได้น้อยกว่าโซราฟินิบอย่างชัดเจน

ตารางที่ 15 แสดง Cell Proliferation percentage ของโซราฟินิบที่ความเข้มข้น 3 μM เปรียบเทียบกับ **11f** ที่ความเข้มข้น 3, 6 และ 12 μM ที่เวลา 0-48 ชั่วโมง

compound	% Cell proliferation		
	0h	24h	48h
control	100	100	100
Sorafenib 3 μM	100	57.46	31.35
11f 3 μM	100	94.60	91.87
11f 6 μM	100	93.09	90.78
11f 12 μM	100	88.77	86.76



ภาพที่ 26 กราฟแสดงผลการทดสอบการยับยั้ง cell proliferation ของโซราฟินิบที่ความเข้มข้น 3 μM เปรียบเทียบกับ **11f** ที่ความเข้มข้น 3, 6 และ 12 μM ที่เวลา 0-48 ชั่วโมง

บทที่ 4

วิธีการทดลอง

4.1 General

The starting materials and all of the reagents used were obtained from commercially available sources, which are Sigma-Aldrich, Acros Organics, and Tokyo Chemical Industry (TCI). All of reagents are analytical grade used as received without further purification. The solvents were distilled before used, and dried solvents were dried with the applicable procedure. For the air and moisture-sensitive reaction or intermediate were set under argon atmosphere. All of the reactions were determined by analytical thin-layer chromatography (TLC), which was performed by precoated silica gel 60 TLC sheets, 0.2 mm layer thickness (Merck) with fluorescent indicator (254 nm) and detected with a UV lamp (254 and 365 nm). The TLC plates can be treated with dipping reagents and heating carefully by heat gun. Proton (^1H), carbon (^{13}C), fluorine (^{19}F) and two-dimension (2D) nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker AVANCE III HD 300 spectrometers in Fourier transform mode, and the coupling constant (J) and the chemical shift were reported in hertz (Hz) and parts per million (ppm) units respectively. The spectra of samples were obtained by CDCl_3 and $\text{DMSO-}d_6$ solutions using TMS ($\delta = 0$ ppm) or TFA ($\delta = -76.55$ ppm) as internal standards. The residual solvent peak of CDCl_3 and $\text{DMSO-}d_6$ are set at δ_{H} 7.26, or δ_{C} 77.22 ppm., and δ_{H} 2.50, or δ_{C} 39.51 ppm. respectively. The high-resolution mass spectra (HRMS) were recorded using Bruker Daltonics MicroTOF mass spectrometer with ESI+ mode and reported as ion mass/charge (m/z) ratio.

The reagents for cytotoxicity, cell migration and cell proliferation activities were purchased from GE Healthcare Life Sciences (Fetal Bovine Serum (FBS), DMEM/LOW GLUCOSE), Gibthai (0.25% Trypsin-EDTA(1X)) and Cell signaling TECHNOLOGY (BrdU Cell Proliferation Assay Kit). The Absorbance of biological activity was measured by microplate reader, Multiskan GO from thermo scientific.

4.2 Experimental

4.2.1 Cytotoxicity testing using MTT assay

The cell lines were seeded in 96-well plates at the concentration 4.5×10^4 cells/ 200 μ L DMEM medium culture/ well and incubated at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere for 24 h. The medium was removed from plates and treated with various concentration of synthetic compounds and sorafenib including the control (0.1% DMSO). Then, the treated cells were incubated for 48 h. Afterward, the medium was removed, and the cells was washed with PBS. MTT solution (100 μ L, 0.5mg/mL) was added to the cells and the treated cells were incubated at 37°C for 3 hours. The MTT solution was removed and DMSO (100 μ L) was added. The absorbance was measured under microplate at 570 nm.

4.2.2 Toxicity experimental

HEK293 cells were seeded in a 96-well plate at the concentration of 1×10^4 cells/well and incubated for 24 h at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere. The samples and the drug were dissolved in DMSO (sonication is required to completely dissolve the samples). Stock drug and sample solutions were diluted with complete medium. The cells were treated with the samples at different concentrations (50, 25, 12.5, 6.25, 3,125, 1.5625, 0.7812 and 0.1953 μ M) and incubated for 48 h. After incubation, the medium was removed. MTT solution (100 μ L, 2 mg/mL) was added and the cells were incubated for 4 h at 37 °C. The MTT solution was removed and 100 μ L of DMSO was added. The absorbance was measured under microplate reader at 550 nm.

4.2.3 Wound healing assay

Huh7 cells were seeded in 12-well plate at the concentration of 5×10^5 cells/well/ 2 mL DMEM medium and incubated at 37° C for 24 hours under 5% CO₂ atmosphere. The synthetic compound and the sorafenib were dissolved in DMSO. Stock drug and sample solutions were diluted with complete medium. The medium was removed from plates followed by creation of a wound and the wound was

washed with PBS (x2). The wound cells were treated the samples at the different concentrations (3, 6 and 12 μM) and their cell migration inhibitory activity was monitored under microscope at 0, 24 and 48 hours.

4.2.4 BrdU cell proliferative activity assay

BrdU cell proliferative activity was performed BrdU cell proliferative assay kit. Preparation of each reagent followed the BrdU Cell Proliferation Protocol (Cell signaling, 6813) and evaluated the absorbance at 450 nm by Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer.

Reagent Preparation

1. Prepare 1X Wash Buffer by diluting 20X Wash Buffer (included in each BrdU ELISA Kit) in purified water.
2. Prepare 1X detection antibody solution by diluting BrdU Detection Antibody 1:100 with Detection Antibody Diluent (green).
3. Prepare 1X HRP-conjugated secondary antibody solution by diluting Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody 1:100 with HRP-linked Antibody Diluent.
4. Prepare 10X BrdU solution by diluting BrdU 1:100 with cell culture medium.

BrdU Assay

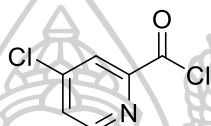
1. Add 100 μl /well of the Fixing/Denaturing Solution, keep the plate at room temperature for 30 min. Remove solution.
2. Add 100 μl /well prepared 1X detection antibody solution, keep plate at room temperature for 1 hour. Remove solution and wash plate 3 times with 1X Wash Buffer.
3. Add 100 μl /well prepared 1X HRP-conjugated secondary antibody solution, keep plate at room temperature for 30 min. Remove the solution and wash plate 3 times with 1X Wash Buffer.
4. Add 100 μl TMB Substrate.
5. Incubate for 30 min at room temperature.
6. Add 100 μl STOP Solution.

7. Read absorbance at 450 nm (For optimal readings, read the plate within 30 min of adding STOP Solution).

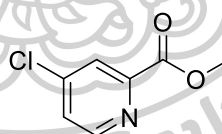
4.3 Chemistry

4-Azidophenol (**1c**) was prepared according to the reported method and 4-chloro-*N*-methyl picolinamide (**1e**) was synthesized by the modified procedures. The synthetic procedure of all compounds to provide the targeted inhibitors were reported

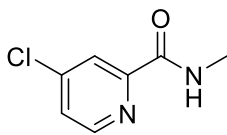
4.3.1 Preparation of 4-chloro-*N*-methyl picolinamide (**1e**)



To a stirred solution of picolinic acid (1.00 g, 8.12 mmol) in dried DMF (5 mL) was added SOCl_2 (4.0 mL, 55.1 mmol). The resulting solution was stirred and heated to 72 °C under Ar atmosphere for 24 h. Moreover, SOCl_2 (2.0 mL, 27.5 mmol) was added to the reaction and the reaction mixture was continued stirred at the same temperature for another 24 h. The mixture was diluted with toluene and concentrated under reduced pressure to provide crude product which was used in the next step without further purification.



The crude product was cooled down to -10 °C and added MeOH (10 mL, 248 mmol) dropwise. The reaction mixture was stirred for 2 h. and diluted with EtOAc (100 mL). Water (100 mL) was added into the solution and extracted with EtOAc (3x100 mL). The organic phase was dried over anh. Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to give the crude product, which was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford methyl-4-chloropicolinate (852 mg, 4.97 mmol, 80 %) as a yellow liquid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.03 (s, 3H), 7.52 (dd, J = 5.2, 2.0 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 8.66 (d, J = 5.2 Hz, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 53.2 (CH_3), 125.7 (CH), 127.2 (CH), 145.5 (C), 149.2 (C), 150.7 (CH), 164.6 (CO) ppm.

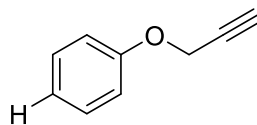


To a stirred solution of methyl-4-chloropicolinate (852 mg, 4.97 mmol) in MeOH and THF (0.8:5.0 mL) was cooled to $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Then, 8% w/w NH_2CH_3 in THF (3x1.5 mL) was added dropwise during 10 minutes and continued stirring for another 2 h. The reaction mixture was quenched with water (50 mL), extracted with EtOAc (3x50 mL), dried over anh. Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to deliver 4-chloro-*N*-methyl picolinamide (**1e**) as a yellow oil (730 mg, 4.28 mmol, 86%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.11 (d, $J = 5.1$ Hz, 3H), 7.35 (dd, $J = 5.3, 2.0$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.49 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 35.9 (CH_3), 124.3 (CH), 124.7 (CH), 145.2 (C), 149.2 (CH), 155.8 (C), 167.6 (CO) ppm.

4.3.2 General procedure for propargyl derivatives (1b-30b)

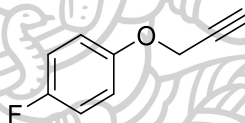
To a stirred suspension of phenol derivatives and Cs_2CO_3 in CH_3CN was added neat propargyl bromide or 80% propargyl bromide in THF dropwise. The resulting suspension was stirred at room temperature or heated to reflux for 4-24h. The reaction mixture was diluted with water and extracted with EtOAc to provide propargyl derivatives, which was purified by column chromatography given the desired product.

Synthesis of (pro-2-yn-1-yloxy)benzene (**1b**)



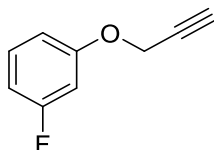
Phenol (0.20 mL, 2.27 mmol), propargyl bromide (80% w/w in toluene, 0.40 mL, 2.34 mmol), Cs_2CO_3 (944 mg, 2.90 mmol) and CH_3CN (6.0 mL) were heated to reflux for 5 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **1b** as a peach liquid (130 mg, 0.99 mmol, 44%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.52 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.69 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.99 (m, 3H), 7.31 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 55.7 (CH_2), 75.5 (CH), 76.7 (CH), 78.7 (C), 113.8 (2CH), 121.9 (CH), 129.5 (2CH), 157.6 (C).

Synthesis of 1-fluoro-4-(pro-2-yn-1-yloxy)benzene (**2b**)



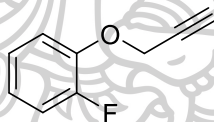
4-Fluorophenol (1.20 g, 10.7 mmol), propargyl bromide (80% w/w in toluene, 2.02 mL, 11.2 mmol), Cs_2CO_3 (4.33 g, 13.2 mmol) and CH_3CN (30 mL) refluxed for 4 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **2b** as a colorless liquid (1.22 g, 8.14 mmol, 76%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.51 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.64 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.95 (m, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 56.5 (CH_2), 75.7 (CH), 78.5 (C), 115.9 (d, $^2J_{\text{FC}} = 23.2$ Hz, 2CH), 116.2 (d, $^3J_{\text{FC}} = 8.0$ Hz, 2CH), 153.7 (d, $^4J_{\text{FC}} = 2.2$ Hz, C), 157.8 (d, $^1J_{\text{FC}} = 237.7$ Hz, C); ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -124.8 (s, 1F).

Synthesis of 1-fluoro-3-(pro-2-yn-1-yloxy)benzene (**3b**)



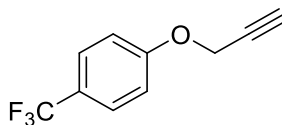
3-Fluorophenol (0.7 mL, 7.19 mmol), propargyl bromide (0.6 mL, 7.91 mmol), Cs_2CO_3 (4.32 g, 13.3 mmol) and CH_3CN (50.0 mL) were stirred for 24 hours at room temperature. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **3b** (1.05 g, 7.00 mmol, 97%) as a colorless liquid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.53 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.67 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 6.67 (m, 3H), 7.24 (m, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 56.0 (CH_2), 75.9 (CH), 78.1 (C), 102.8 (d, $^2J_{\text{FC}} = 24.8$ Hz, CH), 108.4 (d, $^2J_{\text{FC}} = 21.8$ Hz, CH), 110.6 (d, $^4J_{\text{FC}} = 3.4$ Hz, CH), 130.3 (d, $^3J_{\text{FC}} = 9.8$ Hz, CH), 158.8 (d, $^3J_{\text{FC}} = 3.8$ Hz, C), 163.5 (d, $^1J_{\text{FC}} = 243.8$ Hz, C); ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ -112.2 (s, 1F).

Synthesis of 1-fluoro-2-(pro-2-yn-1-yloxy)benzene (**4b**)



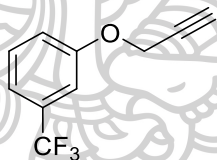
2-Fluorophenol (1.40 g, 12.5 mmol), propargyl bromide (80% w/w in toluene, 2.5 mL, 20.8 mmol), Cs_2CO_3 (3.94 g, 12.1 mmol) and CH_3CN were heated to reflux for 4h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **4b** (1.72 g, 11.5 mmol, 92%) as a colorless oil. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 3.61 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.88 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.94-7.02 (m, 3H), 7.11-7.26 (m, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 56.4 (CH_2), 78.7 (CH), 78.8 (C), 115.7 (CH), 116.2 (d, $^2J_{\text{FC}} = 17.3$ Hz, CH), 121.9 (d, $^3J_{\text{FC}} = 6.8$ Hz, CH), 124.7 (d, $^3J_{\text{FC}} = 3.8$ Hz, CH), 145.0 (d, $^2J_{\text{FC}} = 9.8$ Hz, C), 151.9 (d, $^1J_{\text{FC}} = 242.3$ Hz, C); ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -136.4 (s, 1F).

Synthesis of 1-(prop-2-yn-1-yloxy)-4-(trifluoromethyl)benzene (5b)



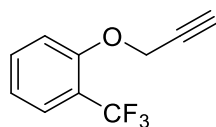
4-(Trifluoromethyl) phenol (524 mg, 3.23 mmol), propargyl bromide (80% w/w in toluene, 0.8 mL, 4.25 mmol), Cs₂CO₃ (1.32 g, 4.05 mmol) and CH₃CN (35.0 mL) were heated to reflux for 5 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **5b** (608 mg, 3.26 mmol, quantitative yield) as a yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.62 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 4.91 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 8.8 Hz), 7.66 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 55.8 (CH₂), 78.6 (CH), 78.7 (C), 115.3 (2CH), 121.9 (q, ²*J*_{FC} = 31.9 Hz, C), 124.5 (q, ¹*J*_{FC} = 269.4 Hz), 126.9 (q, ³*J*_{FC} = 3.8 Hz, (CF₃), 160.0 (C). ¹⁹F- NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -61.5 (s, 3F) ppm.

Synthesis of 1-(prop-2-yn-1-yloxy)-3-(trifluoromethyl)benzene (6b)



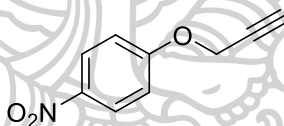
3-(Trifluoro)methylphenol (0.86 mL, 7.19 mmol), propargyl bromide (0.6 mL, 7.91 mmol), Cs₂CO₃ (3.26 g, 10.0 mmol) and CH₃CN (50 mL) were stirred for 24 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **6b** (1.23 g, 6.14 mmol, 85%) as a colorless liquid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.61 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.92 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 7.32 (m, 3H), 7.55 (m, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 55.9 (CH₂), 78.7 (CH), 78.7 (C), 111.48 (q, ³*J*_{FC} = 3.8 Hz, CH), 117.9 (q, ³*J*_{FC} = 3.9 Hz, CH), 119.3 (CH), 124.0 (q, ¹*J*_{FC} = 270.7 Hz, CF₃), 130.4 (q, ²*J*_{FC} = 31.6 Hz, C), 130.7 (CH), 157.5 (C) ppm.; ¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ -62.9 (s, 3F) ppm.

Synthesis of 1-(prop-2-yn-1-yloxy)-2-(trifluoromethyl)benzene (7b)



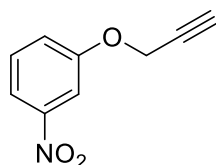
2-(Trifluoro)methylphenol (1.37 g, mL, 8.44 mmol), propargyl bromide (0.6 mL, 7.91 mmol), Cs₂CO₃ (4.15 g, 12.7 mmol) and CH₃CN (50 mL) were stirred for 24 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **7b** (1.65 g, 8.23 mmol, 98%) as a colorless oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.53 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 4.79 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 7.06 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.51 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 56.4 (CH₂), 76.2 (CH), 77.8 (C), 113.6 (CH), 123.5 (q, ¹*J*_{FC} = 270.7 Hz, CF₃), 119.5 (q, ²*J*_{FC} = 30.8 Hz, C), 121.0 (CH), 127.3 (q, ³*J*_{FC} = 5.3 Hz, CH), 133.1 (CH), 155.4 (q, ⁴*J*_{FC} = 1.6 Hz, C) ppm.; ¹⁹F NMR (282 MHz CDCl₃) δ -62.9 (s, 3F) ppm.

Synthesis of 1-nitro-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (8b)



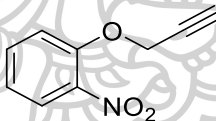
4-Nitrophenol (515 mg, 3.70 mmol), propargyl bromide (80% w/w in toluene, 0.7 mL, 4.09 mmol), Cs₂CO₃ (1.51 g, 4.63 mmol) and CH₃CN (20 mL) was reflux for 4 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (15% EtOAc:*n*-hexane) to give **8b** (651 mg, 3.67 mmol, quantitative yield) as a yellow solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.59 (t, *J* = 3.0 Hz, 1H), 4.81 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.24 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 56.3 (CH₃), 78.2 (CH), 79.1 (C), 115.0 (2CH), 125.8 (2CH), 141.4 (C), 162.3 (C).

Synthesis of 1-nitro-3-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (9b)



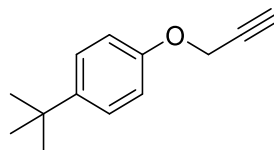
3-Nitrophenol (1.50 g, 10.8 mmol), propargyl bromide (1.0 mL, 13.2 mmol), Cs_2CO_3 (7.12 mg, 21.9 mmol) and CH_3CN (70 mL) were stirred for 24 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (15% EtOAc:*n*-hexane) to give **9b** (1.81 g, 10.5 mmol, 97%) as a yellow solid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) 2.59 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.79 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 7.31 (ddd, $J = 8.3, 2.5, 0.9$ Hz, 1H), 7.47 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.83 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.88 (ddd, $J = 8.2, 2.2, 0.9$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 56.3 (CH_2), 76.7 (C), 77.3 (CH), 109.6 (CH), 116.6 (CH), 121.9 (CH), 130.1 (CH), 149.1 (C), 157.9 (C).

Synthesis of 1-nitro-2-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (10b)



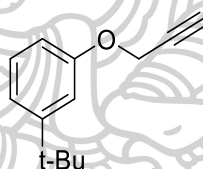
2-Nitrophenol (1.27 g, 9.10 mmol), propargyl bromide (0.7 mL, 9.23 mmol), Cs_2CO_3 (5.08 g, 15.59 mmol) and CH_3CN (50 mL) were stirred for 24 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (15% EtOAc:*n*-hexane) to give **10b** (1.61 g, 9.06 mmol, quantitative yield) as a yellow solid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.59 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H), 4.86 (d, $J = 3.0$ Hz, 2H), 7.10 (td, $J = 7.5, 1.1$ Hz, 1H), 7.27 (dd, $J = 8.5, 1.1$ Hz, 1H), 7.56 (ddd, $J = 8.1, 7.4, 1.7$ Hz, 1H), 7.86 (dd, $J = 8.1, 1.7$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 57.2 (CH_2), 77.1 (CH), 77.2 (C), 115.5 (CH), 121.4 (CH), 125.7 (CH), 134.0 (CH), 140.4 (C), 150.8 (C).

Synthesis of 1-(*tert*-butyl)-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**11b**)



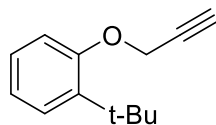
4-(*Tert*-butyl) phenol (1.15 g, 8.32 mmol), propargyl bromide (80% w/w in toluene, 1.8 mL, 9.95 mmol), Cs₂CO₃ (3.01 g, 9.24 mmol) and CH₃CN (20 mL) were heated to reflux for 4 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to provide **11b** (1.34 g, 7.11 mmol, 85%) as a yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.28 (s, 9H), 2.45 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.61 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 6.89 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 31.5 (3CH₃), 34.0 (C), 55.7 (CH₂), 75.3 (CH), 78.9 (C), 114.3 (2CH), 126.2 (2CH), 144.1 (C), 155.3 (C) ppm.

Synthesis of 1-(*tert*-butyl)-3-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**12b**)



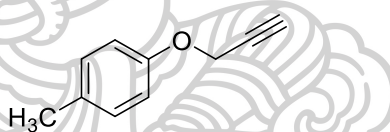
3-(*Tert*-butyl) phenol (1.09 g, 7.28 mmol), propargyl bromide (0.6 mL, 7.91 mmol), Cs₂CO₃ (3.59 g, 11.0 mmol) and CH₃CN (50 mL) were stirred for 24 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **12b** (1.32 mg, 7.00 mmol, 96%) as a colorless liquid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.31 (s, 9H), 2.51 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 6.79 (dd, *J* = 7.9, 2.5 Hz, 1H), 7.03 (m, 1H), 7.24 (m, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 31.7 (3CH₃), 34.8 (C), 55.7 (CH₂), 75.4 (CH), 78.8 (C), 111.0 (CH), 113.0 (CH), 118.7 (CH), 128.9 (CH), 153.1 (C), 157.4 (C) ppm.

Synthesis of 1-(*tert*-butyl)-2-(prop-2-yn-1-yloxy) benzene (**13b**)



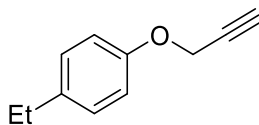
2-(*Tert*-butyl) phenol (1.10 mL, 7.19 mmol), propargyl bromide (0.6 mL, 7.91 mmol), Cs_2CO_3 (3.84 g, 11.8 mmol) and CH_3CN (50 mL) were stirred for 24 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **13b** (1.53 g, 8.10 mmol, quantitative yield) as a colorless liquid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.39 (s, 9H), 2.47 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.71 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.93 (m, 2H), 7.18 (ddd, $J = 8.2, 7.6, 1.7$ Hz, 1H), 7.30 (dd, $J = 7.6, 1.7$ Hz, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 29.9 (3 CH_3), 34.8 (C), 55.5 (CH_2), 75.0 (CH), 78.9 (C), 112.7 (CH), 121.2 (CH), 121.8 (CH), 126.9 (CH), 138.7 (C), 156.5 (C) ppm.

Synthesis of 1-methyl-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**14b**)



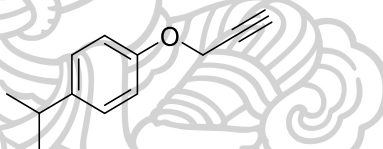
p-Cresol (1.00 mL, 9.53 mmol), propargyl bromide (80% w/w in toluene, 1.2 mL, 7.02 mmol), Cs_2CO_3 (2.96 mg, 9.10 mmol) and CH_3CN (30 mL) were heated to reflux for 4 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (5% EtOAc:*n*-hexane) to give **14b** (1.30 mg, 8.89 mmol, 93%) as an egg shell liquid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.29 (s, 3H), 2.50 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.61 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.83 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 7.08 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 20.5 (CH_3), 55.9 (CH_2), 75.3 (CH), 78.8 (C), 114.8 (2CH), 129.9 (2CH), 130.9 (C), 155.4 (C) ppm.

Synthesis of 1-ethyl-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (15b)



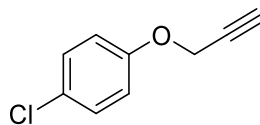
4-Ethylphenol (1.01 g, 8.28 mmol), propargyl bromide (0.7 mL, 9.23 mmol) and Cs_2CO_3 (3.42 g, 10.5 mmol) and CH_3CN (50 mL) was for 24 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **15b** (1.49 g, 9.31 mmol, quantitative yield) as a colorless oil. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.21 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H), 2.49 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 2.59 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H), 4.65 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.90 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.2 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 15.8 (CH_3), 28.0 (CH_2), 55.9 (CH_2), 75.3 (CH), 78.8 (C), 114.8 (2CH), 128.7 (2CH), 137.4 (C), 155.6 (C) ppm.

Synthesis of 1-isopropyl-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (16b)



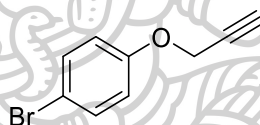
4-Isopropylphenol (1.10 g, 8.06 mmol), propargyl bromide (0.6 mL, 7.91 mmol), Cs_2CO_3 (3.32 g, 10.2 mmol) and CH_3CN (50 mL) was for 24 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **16b** (1.26 g, 7.24 mmol, quantitative yield) as a colorless liquid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.23 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H), 2.50 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 2.86 (m, 1H), 4.66 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.91 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.16 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 24.2 (2CH_3), 33.3 (CH), 55.86 (CH_2), 75.3 (CH), 78.5 (C), 114.7 (2CH), 127.3 (2CH), 142.0 (C), 155.6 (C) ppm.

Synthesis of 1-chloro-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (17b)



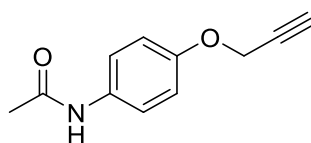
4-Chlorophenol (0.5 mL, 10.2 mmol), propargyl bromide (80% w/w in toluene, 2.0 mL, 11.7 mmol), Cs_2CO_3 (4.28 g, 13.2 mmol) and CH_3CN (30 mL) were heated to reflux for 4 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (5% EtOAc :*n*-hexane) to give **17b** (1.19 g, 7.14 mmol, 70%) as a colorless liquid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.52(t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.66 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.89 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 56.1 (CH_2), 75.8 (CH), 78.2 (C), 116.3 (2CH), 126.5 (2CH), 129.4 (C), 156.1 (C) ppm.

Synthesis of 1-bromo-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (18b)



4-Bromophenol (1.04 g, 6.02 mmol), propargyl bromide (80% w/w in toluene, 2.0 mL, 7.71 mmol), Cs_2CO_3 (2.81 g, 8.63 mmol) and CH_3CN (30 mL) were heated to reflux for 4 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **18b** (1.19 g, 5.65 mmol, 94%) as a colorless liquid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.52 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 3.0$ Hz, 2H), 6.86 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 55.9 (CH_2), 75.9 (CH), 78.1 (C), 113.9 (C), 116.7 (2CH), 132.3 (2CH), 156.6 (C) ppm.

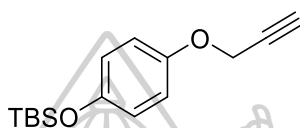
Synthesis of *N*-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)acetamide (19b)



N-(4-hydroxyphenyl)acetamide (1.14 g, 7.56 mmol) propargyl bromide (0.6 mL, 7.91 mmol), Cs_2CO_3 (3.97 g, 12.2 mmol) and CH_3CN (50 mL) were stirred for 24 h.

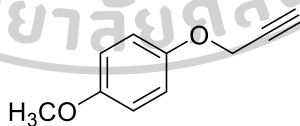
The crude product was purified by silica gel column chromatography (30% EtOAc:*n*-hexane) to give **19b** (1.40 g, 7.40 mmol, 98%) as a colorless oil. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.12 (s, 3H), 2.52 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 6.90 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.80 (br s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 24.2 (CH_3), 56.1 (CH_2), 75.6 (CH), 78.5 (C), 115.3 (2CH), 121.9 (2CH), 131.9 (C), 154.3 (C), 168.7 (CO) ppm.

Synthesis of *tert*-butyldimethyl(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenoxy)silane (**20b**)



4-((*Tert*-butyldimethylsilyloxy)phenol) (720 mg, 3.21 mmol), propargyl bromide (80% w/w in toluene, 0.8 mL, 3.08 mmol), Cs_2CO_3 (1.38 g, 4.24 mmol) and CH_3CN (30 mL) were heated to reflux for 4 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (5% EtOAc:*n*-hexane) to give **20b** (1.30 mg, 8.89 mmol, 93%) as a white solid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.17 (s, 6H), 0.98 (s, 9H), 2.50 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.63 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.77 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 6.86 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ -4.1 (2 CH_3), 18.4 (C), 25.9 (3 CH_3), 56.7 (CH_2), 75.4 (CH), 79.1 (C), 116.1 (2CH), 120.1 (2CH), 150.4 (C), 152.3 (C) ppm.

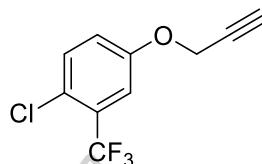
Synthesis of 1-methoxy-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**22b**)



4-Methoxyphenol (1.00 mL, 9.53 mmol), propargyl bromide (80% w/w in toluene, 1.7 mL, 1.00 mmol), Cs_2CO_3 (2.96 mg, 9.10 mmol) and CH_3CN (30 mL) were heated to reflux for 4 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (5% EtOAc:*n*-hexane) to give **22b** (1.30 g, 8.89 mmol, 93%) as an egg shell liquid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.50 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 4.61 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.83 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 6.92 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz,

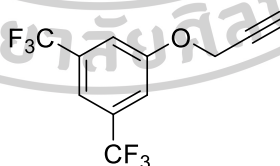
CDCl₃) δ 55.6 (CH₃), 56.6 (CH₂), 75.3 (CH), 78.9 (C), 114.6 (2CH), 116.1 (2CH), 151.7 (C), 154.5 (C) ppm.

Synthesis of 1-chloro-4-(prop-2-yn-1-yloxy)-2-(trifluoromethyl)benzene (22b)



4-Chloro-3-(trifluoromethyl)phenol (530 mg, 2.69 mmol), propargyl bromide (80% w/w in toluene, 0.23 mL, 3.07 mmol), Cs₂CO₃ (1.73 g, 5.31 mmol) and CH₃CN (40 mL) were heated to reflux for 24 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **22b** (587 mg, 2.50 mmol, 93%) as a colorless oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.56 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.72 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 7.09 (dd, *J* = 8.8, 3.0 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75, MHz, CDCl₃) δ 56.3 (CH₂), 76.5 (CH), 77.4 (C), 114.7 (q, ³*J*_{FC} = 5.3 Hz, C), 119.1 (CH), 122.6 (q, ¹*J*_{FC} = 271.5 Hz, CF₃), 124.3 (CH), 129.2 (q, ²*J*_{FC} = 30.8 Hz, C), 132.4 (CH), 155.9 (C) ppm.; ¹⁹F NMR (282 MHz CDCl₃) δ -63.5 (s, 3F) ppm.

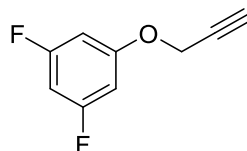
Synthesis of 1-(prop-2-yn-1-yloxy)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzene (23b)



3,5-Bis(trifluoromethyl)phenol (0.65 mL, 4.32 mmol), propargyl bromide (80% w/w in toluene, 0.36 mL, 4.78 mmol), Cs₂CO₃ (2.90 g, 8.89 mmol) and CH₃CN (45 mL) were heated to reflux at for 4 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **23b** (1.25 g, 4.67 mmol, quantitative yield) as a colorless oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.59 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.80 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 7.40 (s, 2H), 7.52 (s, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 56.2 (CH₂), 76.6 (CH),

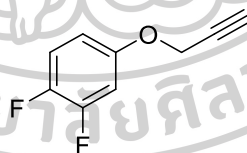
76.9 (C), 115.2 (m, C), 115.5 (d, $^3J_{FC} = 3.0$ Hz, 2CH), 123.1 (q, $^1J_{FC} = 271.0$ Hz, 2CF₃), 132.9 (q, $^2J_{FC} = 33.3$ Hz, 2C), 158.0 (C) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ -63.2 (s, 6F) ppm.

Synthesis of 1,3-difluoro-5-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (24b)



3,5-Difluorophenol (1.04 g, 8.02 mmol), propargyl bromide (0.6 mL, 7.91 mmol), Cs₂CO₃ (3.14 g, 9.65 mmol) and CH₃CN (50 mL) were stirred for 24 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **24b** (968 mg, 5.86 mmol, 82%) as a colorless liquid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.56 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.67 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.45 (m, 1H), 6.52 (m, 2H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 56.3 (CH₂), 76.4 (CH), 77.5 (C), 97.2 (t, $^2J_{FC} = 25.70$ Hz, CH), 98.9 (dd, $^2J_{FC}$, $^4J_{FC} = 27.8, 0.8$ Hz, 2CH), 159.4 (t, $^3J_{FC} = 13.6$ Hz, C), 163.6 (dd, $^1J_{FC}$, $^3J_{FC} = 245.3, 15.4$ Hz, 2CF) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ -109.7 (s, 2F) ppm.

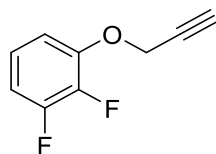
Synthesis of 1,2-difluoro-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (25b)



3,4-Difluorophenol (1.06 g, 8.19 mmol), propargyl bromide (0.6 mL, 7.91 mmol), Cs₂CO₃ (4.04 g, 12.4 mmol) and CH₃CN (50 mL) was for 24 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **25b** (1.21 g, 7.17 mmol, 88%) as a colorless liquid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.54 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.69 (m, 1H), 6.82 (m, 1H), 7.08 (m, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 56.6 (CH₂), 76.1 (CH), 77.9 (C), 104.9 (d, $^2J_{FC} = 20.3$ Hz, CH), 110.4 (dd, $^2J_{FC} = 63.8$ Hz, CH), 117.3 (dd, $^3J_{FC}$, $^4J_{FC} = 18.0, 1.5$ Hz, CH), 148.0 (dd, $^1J_{FC}$, $^2J_{FC} = 240.0, 12.8$ Hz, CF), 150.4 (dd, $^1J_{FC}$, $^2J_{FC} = 246.8, 14.3$ Hz, CF), 153.7 (dd, $^3J_{FC}$, $^4J_{FC}$

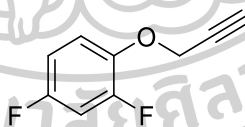
= 9.0, 2.3 Hz, C) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ -136.0 (d, $J_{\text{FF}} = 19.7$ Hz, 1F), -147.9 (d, $J_{\text{FF}} = 22.6$ Hz, 1F) ppm.

Synthesis of 1,2-difluoro-3-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (26b)



2,3-Difluorophenol (956 mg, 7.35 mmol), propargyl bromide (0.6 mL, 7.91 mmol), Cs_2CO_3 (4.24 g, 13.0 mmol) and CH_3CN (50 mL) were stirred for 24 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **26b** (946 mg, 5.63 mmol, 77%) as a colorless liquid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.55 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.78 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.85 (m, 2H), 7.00 (m, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 57.1 (CH_2), 76.5 (CH), 77.7 (C), 110.3 (d, $^2J_{\text{FC}} = 17.3$ Hz, CH), 111.0 (d, $^4J_{\text{FC}} = 3.0$ Hz, CH), 123.1 (dd, $^2J_{\text{FC}}, ^3J_{\text{FC}} = 9.0, 5.3$ Hz, CH), 141.8 (dd, $^1J_{\text{FC}}, ^2J_{\text{FC}} = 246.7, 14.3$ Hz, CF), 147.1 (dd, $^3J_{\text{FC}}, ^4J_{\text{FC}} = 5.3, 3.0$ Hz, C), 151.5 (dd, $^1J_{\text{FC}}, ^2J_{\text{FC}} = 246.0, 10.5$ Hz, CF) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ -137.7 (s, 1F), -137.8 (s, 1F) ppm.

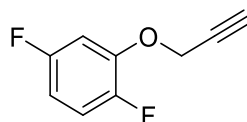
Synthesis of 2,4-difluoro-1-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (27b)



2,4-Difluorophenol (0.7 mL, 7.33 mmol), propargyl bromide (0.6 mL, 7.91 mmol), Cs_2CO_3 (4.04 g, 12.4 mmol) and CH_3CN (50 mL) were stirred for 24 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **27b** (960 mg, 5.71 mmol, 78%) as a colorless liquid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.54 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.72 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.79 (m, 2H), 7.08 (m, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 58.2 (CH_2), 76.3 (CH), 78.0 (C), 105.1 (dd, $^2J_{\text{FC}}, ^2J_{\text{FC}} = 26.3, 21.8$ Hz, CH), 110.5 (dd, $^2J_{\text{FC}}, ^4J_{\text{FC}} = 22.5, 3.8$ Hz, CH), 117.6 (dd, $^3J_{\text{FC}}, ^3J_{\text{FC}} = 9.0, 2.3$ Hz, CH), 141.9 (dd, $^2J_{\text{FC}}, ^4J_{\text{FC}} = 10.5, 3.0$ Hz, C), 153.2 (dd, $^1J_{\text{FC}}, ^3J_{\text{FC}} = 248.3, 12.0$ Hz, CF), 157.4

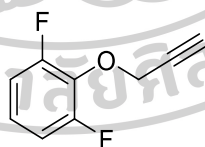
(dd, $^1J_{FC}$, $^3J_{FC}$ = 241.5, 10.5 Hz, CF) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ -119.0 (d, J_{FF} = 3.4 Hz, 1F) , -129.2 (d, J_{FF} = 3.4 Hz, 1F) ppm.

Synthesis of 1,4-difluoro-2-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (28b)



2,5-Difluorophenol (1.11 g, 8.50 mmol), propargyl bromide (0.7 mL, 9.23 mmol), Cs_2CO_3 (4.92 g, 15.1 mmol) and CH_3CN (60 mL) was for 24 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **28b** (1.32 g, 7.86 mmol, 92%) as a colorless liquid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.58 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 4.73 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 6.63 (m, 1H), 6.85 (m, 1H), 7.01 (m, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 57.3 (CH_2), 76.8 (CH), 77.5 (C), 103.9 (dd, $^2J_{FC}$, $^3J_{FC}$ = 42.8, 1.5 Hz, CH), 107.9 (dd, $^2J_{FC}$, $^3J_{FC}$ = 23.3, 6.8 Hz, CH), 116.5 (dd, $^2J_{FC}$, $^3J_{FC}$ = 21.0, 10.5 Hz, CH), 146.1 (dd, $^2J_{FC}$, $^3J_{FC}$ = 13.6, 11.9 Hz, C), 149.3 (dd, $^1J_{FC}$, $^4J_{FC}$ = 240.8, 3.8 Hz, CF), 158.6 (dd, $^1J_{FC}$, $^4J_{FC}$ = 240.8, 2.3 Hz, CF) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ -117.3 (d, J_{FF} = 14.1 Hz, 1F), -140.2 (d, J_{FF} = 14.1 Hz, 1F) ppm.

Synthesis of 1,3-difluoro-2-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (29b)



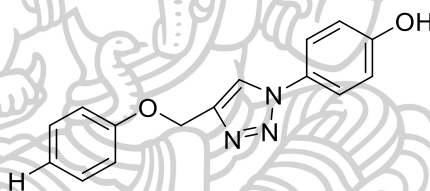
2,6-Difluorophenol (1.12 g, 8.60 mmol), propargyl bromide (0.7 mL, 9.23 mmol), Cs_2CO_3 (4.02 g, 12.3 mmol) and CH_3CN (60 mL) was for 24 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane) to give **29b** (1.39 g, 8.29 mmol, 96%) as a colorless liquid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.51 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 4.81 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 6.96 (m, 3H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 61.6 (t, $^4J_{FC}$ = 3.8 Hz, CH_2), 76.3 (CH), 77.9 (C), 112.2 (dd, $^2J_{FC}$, $^4J_{FC}$ = 15.0, 6.8 Hz, 2CH),

123.9 (t, $^3J_{FC}$ = 9.0 Hz, CH), 133.9 (t, $^3J_{FC}$ = 14.3 Hz, C), 156.5 (dd, $^1J_{FC}$, $^3J_{FC}$ = 247.5, 5.3 Hz, 2CF) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) δ -128.1 (s, 2F) ppm.

4.3.3 General procedure for click reaction

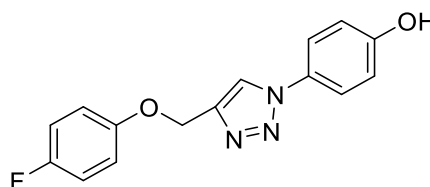
To a stirred mixture of propargyloxy derivatives (**1b-29**) and 4-azidophenol (**1c**) in 50% *n*-BuOH in water was added sodium ascorbate and 1M aq. CuSO_4 sequentially. The reaction mixture was stirred at 60°C. The resulting solution was diluted with ice water, followed by 10% aq. NH_3 and stirred for another 5 minutes. The solid precipitate was collected with a Buchner filter and air-dried overnight to give the designed products (**1d-30d**). Purification of the crude product by column chromatography to provide desired products.

Synthesis of 4-(4-(phenoxy methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**1d**)



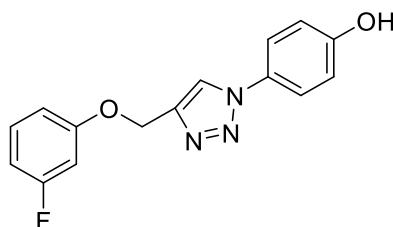
(Prop-2yn-1-yloxy)benzene (**1b**) (200 mg, 1.51 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (229 mg, 1.69 mmol), sodium ascorbate (15.0 mg, 0.08 mmol), 1M aq. CuSO_4 (75 μL) and 50% *n*-BuOH in water (4.5 mL) were stirred at 60°C for 2 h. The resulting solution was diluted with ice water (15 mL), 10% aq. NH_3 (3 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of the crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **1d** (247 mg, 0.93 mmol, 62% yield) as a white solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 5.21 (s, 2H), 6.93 (m, 3H), 7.07 (m, 2H), 7.30 (m, 2H), 7.67 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.75 (s, 1H), 9.97 (br s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 61.0 (CH_2), 114.7 (2CH), 116.1 (2CH), 120.9 (C), 122.0 (2CH), 122.7 (C), 128.7 (C), 129.9 (2CH), 143.5 (CH), 157.8 (C), 158.0 (CH).

Synthesis of 4-(4-((4-fluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol
(2d)



1-Fluoro-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**2b**) (928 mg, 6.18 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (878 mg, 6.50 mmol), sodium ascorbate (98.2 mg, 0.50 mmol), 1M aq. CuSO_4 (300 μL) and 50% *n*-BuOH in water (18 mL) were stirred at 60°C for 2 h. The resulting solution was diluted with ice water (30 mL), 10% aq. NH_3 (6 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **2d** (383 mg, 21.7 mmol, 62% yield) as a white solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 5.18 (s, 2H), 6.94 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.12 (m, 4H), 7.66 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 8.75 (s, 1H), 9.96 (br s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 61.6 (CH_2), 115.9 (d, $^2J_{\text{FC}} = 25.1$ Hz, 2CH), 116.1 (d, $^3J_{\text{FC}} = 10.1$ Hz, 2CH), 116.1 (2CH), 122.0 (2CH), 122.8 (C), 128.7 (C), 143.4 (CH), 154.3 (d, $^4J_{\text{FC}} = 1.8$ Hz, C), 156.7 (d, $^1J_{\text{FC}} = 234.6$ Hz, CF), 157.8 (C); ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -125.2 (s, 1F); HRMS (ESI+) m/z : calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{FN}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 286.0992, found 286.0981.

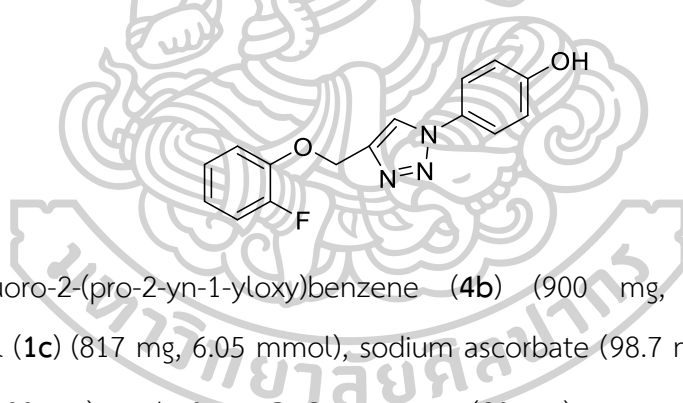
Synthesis of 4-(4-((3-fluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol
(3d)



1-Fluoro-3-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**3b**) (844 mg, 5.62 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (991 mg, 7.33 mmol), sodium ascorbate (104 mg, 0.53 mmol), 1M

aq. CuSO₄ (272 μ L) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 4 h. The resulting solution was diluted with ice water (20 mL), 10% aq. NH₃ (15 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **3d** (1.30 g, 4.57 mmol, 81%) as a brown solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.23 (s, 2H), 6.78 (td, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 6.95 (m, 4H), 7.33 (m, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.75 (s, 1H), 9.97 (br s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 61.5 (CH₂), 102.4, (d, ²*J*_{FC} = 24.8 Hz, CH), 107.7 (d, ²*J*_{FC} = 21.0 Hz, CH), 111.2 (d, ⁴*J*_{FC} = 3.0 Hz, CH), 116.2 (2CH), 122.2 (2CH), 123.0 (C), 128.8 (C), 130.8 (d, ³*J*_{FC} = 10.5 Hz, CH), 143.2 (CH), 158.0 (C), 159.6 (d, ³*J*_{FC} = 11.3 Hz, C), 163.1 (d, ¹*J*_{FC} = 241.5 Hz, C); ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -113.0 (s, 1F); HRMS (ESI+) *m/z*: calcd. for C₁₅H₁₃FN₃O₂ [M+H]⁺ 308.0809, found 308.0811.

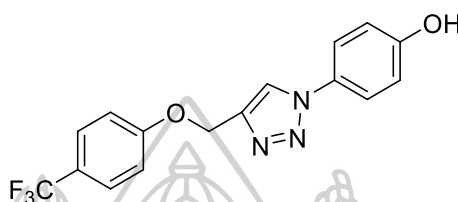
Synthesis of 4-(4-((2-fluorophenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**4d**)



1-Fluoro-2-(pro-2-yn-1-yloxy)benzene (**4b**) (900 mg, 6.00 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (817 mg, 6.05 mmol), sodium ascorbate (98.7 mg, 0.498 mmol), 1M aq. CuSO₄ (300 μ L) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 2 h. The resulting solution was diluted with ice water (40 mL), 10% aq. NH₃ (15 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **4d** (979 mg, 3.43 mmol, 57%) as a brown solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.29 (s, 2H), 6.95 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.98 (td, *J* = 4.7, 1.6, 1H), 7.16 (m, 1H), 7.23 (ddd, *J* = 11.8, 8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.40 (td, *J* = 8.5, 1.5 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.79 (s, 1H), 9.98 (br s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 62.0 (CH₂), 115.6 (C), 116.1 (d, ²*J*_{FC} = 18.0 Hz, CH), 116.1 (2CH), 121.5 (d, ³*J*_{FC} = 7.5 Hz, CH), 122.1 (2CH), 123.0 (CH), 124.8 (d, ³*J*_{FC} = 3.8 Hz, CH),

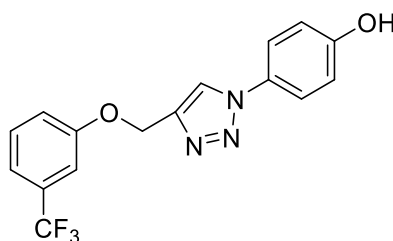
128.7 (CH), 143.0 (CH), 145.9 (d, $^2J_{FC} = 10.4$ Hz, C), 151.8 (d, $^1J_{FC} = 242.0$ Hz, CF), 157.9 (C); ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -136.4 (s, 1F); HRMS (ESI+) m/z : calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{FN}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 286.0992, found 286.0987.

Synthesis of 4-(4-((4-(trifluoromethyl)phenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**5d**)



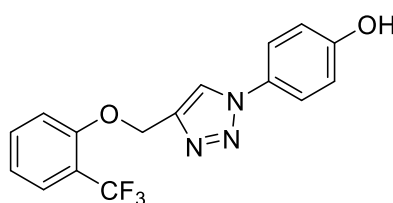
1-(Prop-2-yn-1-yloxy)-4-(trifluoromethyl)benzene (**5b**) (471.8 mg, 2.36 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (460 mg, 3.40 mmol), sodium ascorbate (41.3 mg, 0.21 mmol), 1M aq. CuSO_4 (120 μL) and 50% *n*-BuOH in water (10 mL) were stirred at 60°C for 2 h. The resulting solution was diluted with ice water (15 mL), 10% aq. NH_3 (5 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **5d** (646 mg, 1.93 mmol, 82% yield) as a peach solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 5.32 (s, 2H), 6.95 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.26 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.66 (m, 4H), 8.79 (s, 1H), 9.98 (br s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 61.4 (CH_2), 115.4 (C), 116.2 (C), 124.7 (q, $^1J_{FC} = 270.0$ Hz, CF_3), 121.6 (q, $^2J_{FC} = 31.9$ Hz, C) 122.2 (C), 123.1 (2CH), 127.12 (q, $^3J_{FC} = 3.5$ Hz, 2CH), 128.8 (2CH), 143.1 (2CH), 158.0 (2CH), 160.9 (C) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -61.4 (s, 3F) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 358.0779, found 358.0777.

Synthesis of 4-(4-((3-(trifluoromethyl)phenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**6d**)



1-(Prop-2-yn-1-yloxy)-3-(trifluoromethyl)benzene (**6b**) (949 mg, 4.76 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (1.03 g, 7.62 mmol), sodium ascorbate (72.3 mg, 0.36 mmol), 1M aq. CuSO_4 (240 μL) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 4 h. The resulting solution was diluted with ice water (20 mL), 10% aq. NH_3 (15 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **6d** (623 mg, 1.86 mmol, 39%) as a brown solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 5.32 (s, 2H), 6.95 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.56 (m, 1H), 7.67 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 8.78 (s, 1H), 9.96 (br s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 61.5 (CH_2), 111.5 (q, $^3J_{\text{FC}} = 3.8$ Hz, CH), 116.2 (2CH), 117.6 (q, $^3J_{\text{FC}} = 3.8$ Hz, CH), 119.1 (CH), 122.1 (CH), 124.2 (q, $^1J_{\text{FC}} = 270.0$ Hz, CF_3), 122.1 (2CH), 123.0 (CH), 128.7 (C), 130.5 (q, $^2J_{\text{FC}} = 31.5$ Hz, C), 143.1 (C), 157.9 (C), 158.4 (C) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -62.7 (s, 3F) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 336.0960, found 336.0954.

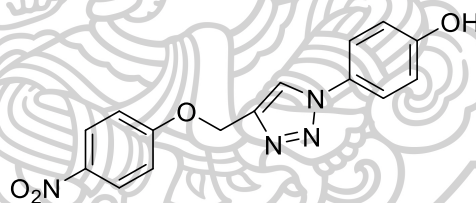
Synthesis of 4-(4-((2-(trifluoromethyl)phenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**7d**)



1-(Prop-2-yn-1-yloxy)-2-(trifluoromethyl)benzene (**7b**) (1.0965 mg, 5.48 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (960 mg, 7.10 mmol), sodium ascorbate (118 mg, 0.59 mmol), 1M

aq. CuSO_4 (272 μL) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 4 h. The resulting solution was diluted with ice water (20 mL), 10% aq. NH_3 (15 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **7d** (1.20 g, 3.59 mmol, 66%) as a brown solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 5.37 (s, 2H), 6.94 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.11 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.62 (m, 1H), 7.67 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.72 (s, 1H), 9.94 (brs, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 62.0 (CH_2), 114.3 (CH), 116.2 (2CH), 117.5 (q, $^2J_{\text{FC}}$ = 15.0 Hz, C), 123.8 (q, $^1J_{\text{FC}}$ = 270.8 Hz, CF_3), 120.8 (CH), 122.1 (2CH), 122.9 (CH), 126.9 (q, $^3J_{\text{FC}}$ = 5.3 Hz, C), 128.7 (C), 134.3 (C), 143.0 (C), 155.9 (C), 158.0 (C) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -62.3 (s, 3F) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 358.0779, found 358.0774.

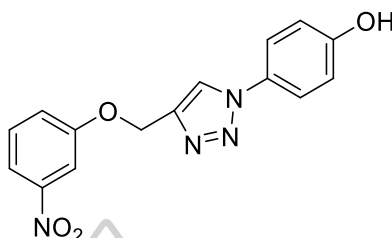
Synthesis of 4-(4-((4-nitrophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (8d)



1-Nitro-4-(prop-2-yn-1-yloxy) benzene (**8b**) (201 mg, 1.13 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (200 mg, 1.48 mmol), sodium ascorbate (18.3 mg, 0.09 mmol), 1M aq. CuSO_4 (57 μL) and 50% *n*-BuOH in water (10 mL) were stirred at 60°C for 2 h. The resulting solution was diluted with ice water (15 mL), 10% aq. NH_3 (3 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **8d** (222 mg, 0.71 mmol, 63% yield) as a brown solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 5.40 (s, 2H), 6.95 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.31 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.68 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.24 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.81 (s, 1H), 9.99 (br s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 61.9 (CH_2), 115.4 (2CH), 116.1 (2CH), 122.1 (2CH), 123.1 (CH), 125.9 (2CH), 128.6 (C), 141.1 (C), 142.5 (C), 157.9

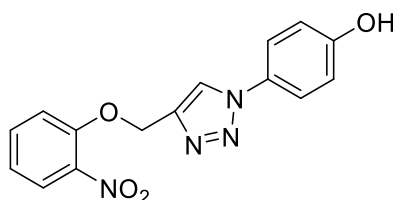
(C), 163.2 (C); HRMS (ESI+) m/z : calcd. for $C_{15}H_{13}N_4O_4$ $[M+H]^+$ 313.0937, found 313.0936.

Synthesis of 4-(4-((3-nitrophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**9d**)



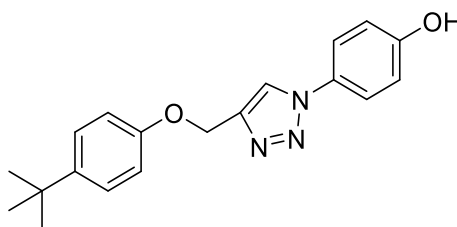
1-Nitro-3-(prop-2-yn-1-yloxy) benzene (**9b**) (902 mg, 5.09 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (998 mg, 7.38 mmol), sodium ascorbate (115 mg, 0.58 mmol), 1M aq. $CuSO_4$ (240 μ L) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 4 h. The resulting solution was diluted with ice water (40 mL), 10% aq. NH_3 (15 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **9d** (1.53 g, 4.89 mmol, 96%) as a brown solid. 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 5.38 (s, 2H), 6.95 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.55 (ddd, J = 8.3, 2.3, 1.2 Hz, 1H), 7.62 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.85 (ddd, J = 8.2, 2.1, 1.2 Hz, 1H), 7.91 (t, J = 2.1 Hz, 1H), 8.80 (s, 1H), 9.98 (br s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ 61.8 (CH₂), 109.2 (CH), 115.9 (CH), 116.1 (2CH), 122.1 (2CH), 122.2 (CH), 123.0 (CH), 128.7 (C), 130.8 (CH), 142.8 (C), 142.8 (C), 157.9 (C), 158.5 (C) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd. for $C_{15}H_{13}N_4O_4$ $[M+H]^+$ 313.0937, found 313.0927.

Synthesis of 4-(4-((2-nitrophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (10d)



1-Nitro-2-(prop-2-yn-1-yloxy) benzene (**10b**) (859 mg, 4.85 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (853 mg, 6.31 mmol), sodium ascorbate (84.2 mg, 0.43 mmol), 1M aq. CuSO₄ (240 μ L) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 3 h. The resulting solution was diluted with ice water (40 mL), 10% aq. NH₃ (15 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **10d** product (1.21 g, 3.88 mmol, 80%) as a brown solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.43 (s, 2H), 6.94 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.15 (ddd, *J* = 8.0, 7.2, 1.4 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.67 (m, 2H), 7.88 (dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 8.77 (s, 1H), 9.98 (br s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 62.5 (CH₂), 115.7 (CH), 116.1 (2CH), 121.1 (CH), 122.1 (2CH), 123.1 (CH), 125.0 (CH), 128.6 (C), 134.4 (CH), 139.9 (C), 142.2 (C), 150.6 (C), 157.9 (C) ppm.; HRMS (ESI+) *m/z*: calcd. for C₁₆H₁₃F₃N₃O₂ [M+H]⁺ 313.0937, found 313.0937.

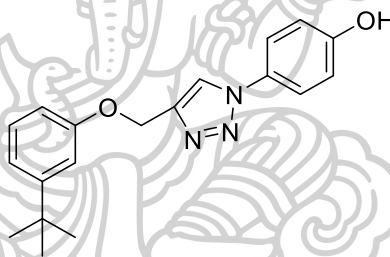
Synthesis of 4-(4-((4-*tert*-butylphenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (11d)



1-(*Tert*-butyl)-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**11b**) (907 mg, 4.82 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (857 mg, 6.34 mmol), sodium ascorbate (97.7mg, 0.49 mmol), 1M aq. CuSO₄ (300 μ L) and 50% *n*-BuOH in water (18 mL) were stirred at 60°C for 3 h.

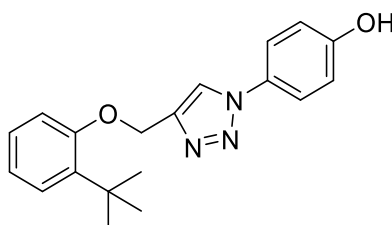
The resulting solution was diluted with ice water (30 mL), 10% aq. NH₃ (6 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **11d** (405 mg, 1.25 mmol, 26% yield) as a peach solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.25 (s, 9H), 5.17 (s, 2H), 6.96 (m, 4H), 7.31 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.74 (s, 1H), 9.96 (br s, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 31.3 (CH₃), 33.8 (C), 61.0 (CH₂), 114.2 (2CH), 116.0 (2CH), 122.0 (2CH), 122.6 (CH), 126.1 (2CH), 128.7 (C), 143.1 (C), 143.7 (C), 155.8 (C), 157.8 (C) ppm.; HRMS (ESI+) *m/z*: calcd for C₁₉H₂₂N₃O₂ [M+H]⁺ 324.1712, found 324.1715.

Synthesis of 4-(4-((3-(*tert*-butyl)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (12d**)**



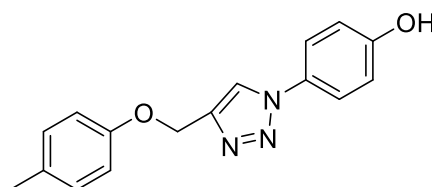
1-(*Tert*-butyl)-3-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**12b**) (1.06 mg, 5.62 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (961 mg, 7.11 mmol), sodium ascorbate (97.9 mg, 0.49 mmol), 1M aq. CuSO₄ (272 μL) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 4 h. The resulting solution was diluted with ice water (20 mL), 10% aq. NH₃ (15 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **12d** (861 mg, 2.66 mmol, 47%) as a brown solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.52 (s, 9H), 5.19 (s, 2H), 6.95 (m, 5H), 7.23 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.74 (s, 1H), 9.94 (br s, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 31.1 (CH₃), 34.5 (C), 61.0 (CH₂), 111.2 (CH), 112.5 (CH), 116.2 (2CH), 117.9 (CH), 122.1 (2CH), 122.7 (CH), 128.8 (C), 129.1 (CH), 143.9 (C), 152.5 (C), 157.9 (C), 158.0 (C) ppm.; HRMS (ESI+) *m/z*: calcd for C₁₉H₂₁N₃O₂Na [M+Na]⁺ 346.1531, found 346.1528.

Synthesis of 4-(4-((2-(*tert*-butyl)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**13d**)



1-(*Tert*-butyl)-2-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**13b**) (903 mg, 4.79 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (836 mg, 6.19 mmol), sodium ascorbate (86.2 mg, 0.44 mmol), 1M aq. CuSO₄ (240 μ L) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 2 h. The resulting solution was diluted with ice water (20 mL), 10% aq. NH₃ (15 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **13d** (743 mg, 2.30 mmol, 48%) as a brown solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.31 (s, 9H), 5.23 (s, 2H), 6.90 (m, 1H), 6.96 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.23 (m, 3H), 7.79 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.76 (s, 1H), 9.97 (br s, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 29.7 (CH₃), 34.4 (C), 61.1 (CH₂), 113.0 (CH), 116.1 (2CH), 120.7 (CH), 122.0 (2CH), 122.4 (CH), 126.3 (CH), 127.2 (CH), 128.7 (C), 137.5 (C), 143.7 (C), 156.9 (C), 157.8 (C) ppm.; HRMS (ESI+) *m/z*: calcd for C₁₉H₂₂N₃O₂ [M+H]⁺ 324.1712, found 324.1697.

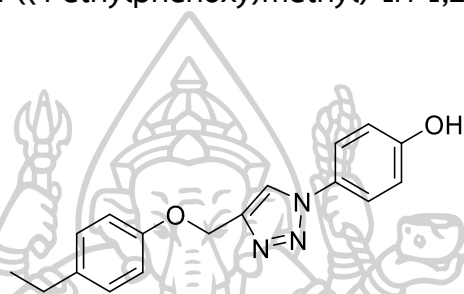
Synthesis of 4-(4-((*p*-tolyl)oxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**14d**)



1-Methyl-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**14b**) (81.0 mg, 5.55 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (973 mg, 7.20 mmol), sodium ascorbate (117 mg, 0.61 mmol), 1M aq. CuSO₄ (272 μ L) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 15 h. The resulting solution was diluted with ice water (60 mL), 10% aq. NH₃ (12 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude

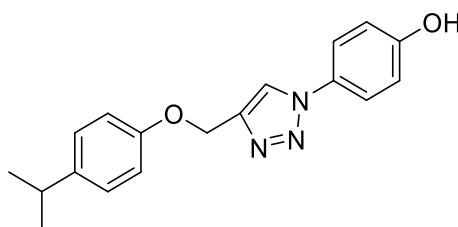
product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **14d** (490 mg, 1.74 mmol, 31% yield) as a brown solid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.24 (s, 3H), 5.16 (s, 2H), 7.00 (m, 4H), 7.11 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.67 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 8.74 (s, 1H), 9.97 (s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 20.1 (CH_3), 61.0 (CH_2), 114.6 (2CH), 116.0 (2CH), 122.0 (2CH), 122.6 (CH), 128.7 (C), 129.6 (C), 129.8 (2CH), 143.6 (C), 155.9 (C), 157.8 (C) ppm.

Synthesis of 4-(4-((4-ethylphenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (15d)



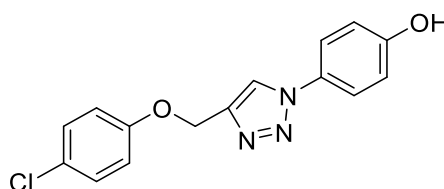
1-Ethyl-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**15b**) (768 mg, 4.79 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (903 mg, 6.68 mmol), sodium ascorbate (84.1 mg, 0.42 mmol), 1M aq. CuSO_4 (240 μL) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 2 h. The resulting solution was diluted with ice water (40 mL), 10% aq. NH_3 (15 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **15d** (360 mg, 1.22 mmol, 25%) as a brown solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.15 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H), 2.54 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H), 5.17 (s, 2H), 6.96 (m, 4H), 7.14 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.67 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 8.74 (s, 1H), 9.93 (br s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 15.9 (CH_3), 27.3 (CH_2), 61.1 (CH_2), 114.6 (2CH), 116.1 (2CH), 122.0 (2CH), 122.6 (CH), 128.7 (2CH), 128.8 (C), 136.2 (CH), 143.7 (C), 156.1 (C), 157.8 (C) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 296.1399, found 296.1395.

Synthesis of 4-(4-((4-isopropylphenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**16d**)



1-Isopropyl-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**16b**) (1.22 g, 6.98 mmol) , 4-azidophenol (**1c**) (1.22 g, 9.06 mmol), sodium ascorbate (78.1 mg, 0.39 mmol), 1M aq. CuSO_4 (240 μL) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 5 h. The resulting solution was diluted with ice water (40 mL), 10% aq. NH_3 (15 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-Hexane) given **16d** (1.44 g, 4.67 mmol, 67%) as a brown solid. ^1H NMR (300 M Hz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.18 (d, $J = 6.9$, 6H), 2.83 (m, 1H), 5.17 (s, 2H), 6.94 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.98 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.17 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 8.75 (s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 24.1 (CH_3), 32.6 (CH), 61.1 (CH_2), 114.6 (2CH), 116.1 (2CH), 122.0 (2CH), 122.7 (CH), 127.2 (2CH), 128.8 (C), 140.9 (C), 143.8 (C), 156.2 (C), 157.8 (C) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 310.1556, found 310.1539.

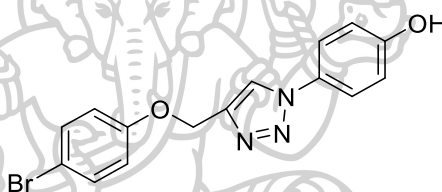
Synthesis of 4-(4-((4-chlorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**17d**)



1-Chloro-4-(prop-2-yn-1-yloxy) benzene (**17b**) (1.00 g, 6.00 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (816 mg, 6.72 mmol), sodium ascorbate (95.6 mg, 0.32 mmol), 1M aq. CuSO_4 (300 μL) and 50% *n*-BuOH in water (18 mL) were stirred at 60°C for 2 h. The resulting solution was diluted with ice water (30 mL), 10% aq. NH_3 (6 mL) and

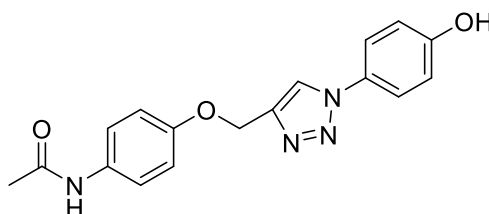
stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **17d** (970 mg, 3.22 mmol, 53% yield) as a peach solid. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 5.21 (s, 2H), 6.94 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.10 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.66 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.75(s, 1H), 9.96 (br s, 1 H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 61.4 (CH₂), 116.0 (2CH), 116.6 (2CH), 122.0 (2CH), 122.8 (CH), 124.6 (C), 128.7 (C), 129.3 (2CH), 143.2 (C), 156.8 (C), 157.8 (C) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for C₁₅H₁₃ClN₃O₂ [M+H]⁺ 302.0696, found 302.0688.

Synthesis of 4-(4-((4-bromophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (18d)



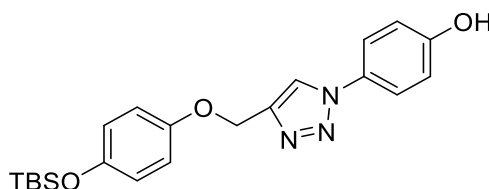
1-Bromo-4-(prop-2-yn-1-yloxy) benzene (**18b**) (505 mg, 2.39 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (460 mg, 3.40 mmol), sodium ascorbate (36.6 mg, 0.18 mmol), 1M aq. CuSO₄ (120 μ L) and 50% *n*-BuOH in water (10 mL) were stirred at 60°C for 2 h. The resulting solution was diluted with ice water (15 mL), 10% aq. NH₃ (5 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **18d** (717 mg, 2.07 mmol, 87%) as a brown solid. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 5.21 (s, 2H), 6.94 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.05 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 7.47 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 7.66 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.75 (s, 1H), 10.01 (br s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 61.3 (CH₂), 112.5 (C), 116.2 (2CH), 117.2 (2CH), 122.2 (2CH), 122.6 (C), 123.0 (CH), 128.8 (C), 132.3 (2CH), 143.3 (C), 157.9 (C) ppm. HRMS (ESI+) m/z : calcd for C₁₅H₁₃BrN₃O₂ [M+H]⁺ 346.0191, found 346.0197.

Synthesis of *N*-(4-((1-(4-hydroxyphenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)acetamide (**19d**)



N-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)acetamide (**19b**) (1.05 mg, 5.52 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (977 mg, 7.23 mmol), sodium ascorbate (113 mg, 0.57 mmol), 1M aq. CuSO₄ (272 μ L) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 6 h. The resulting solution was diluted with ice water (20 mL), 10% aq. NH₃ (15 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (80% EtOAc:*n*-hexane) given **19d** (1.47 g, 4.54 mmol, 82%) as a brown solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.01 (s, 3H), 3.63 (br s, 1H), 5.15 (s, 2H), 6.97 (m, 4H), 7.50 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.66 (m, 2H), 8.12 (s, 1H), 9.82 (s, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 23.9 (CH₂), 61.3 (CH₂), 114.9 (2CH), 116.2 (2CH), 120.7 (2CH), 122.1 (2CH), 122.8 (CH), 128.8 (C), 133.0 (C), 143.7 (C), 153.9 (C), 157.9 (C), 168.0 (CO) ppm.; HRMS (ESI+) *m/z*: calcd for C₁₇H₁₆F₃N₄O₃Na [M+Na]⁺ 347.1120, found 347.1124.

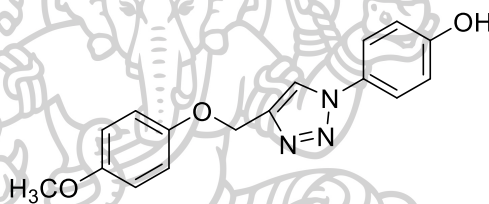
Synthesis of 4-(4-((4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**20d**)



Tert-butyldimethyl(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenoxy)silane (**20b**) (1.01 g, 3.85 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (806 mg, 5.97 mmol), sodium ascorbate (42.7 mg, 0.22 mmol), 1M aq. CuSO₄ (130 μ L) and 50% *n*-BuOH in water (10 mL) were stirred at 60°C for 3 h. The resulting solution was diluted with ice water (15 mL), 10% aq. NH₃

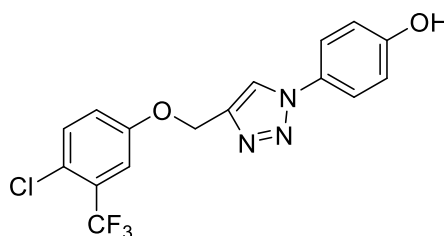
(5 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **20d** (1.23 g, 2.32 mmol, 58%) as a white solid. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.15 (s, 6H), 0.93 (s, 9H), 5.12 (s, 2H), 6.63 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.79 (m, 4H), 7.51 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.72 (s, 1H), 9.96 (s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ -4.6 (3CH₃), 17.9 (C), 25.6 (CH₃), 61.5 (CH₂), 115.7 (2CH), 116.1 (2CH), 120.5 (2CH), 122.0 (2CH), 122.6 (CH), 128.8 (C), 143.7 (C), 149.0 (C), 151.5 (C), 157.8 (C) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for C₂₁H₂₈N₃O₃Si [M+H]⁺ 398.1900, found 398.1883.

Synthesis of 4-(4-((4-methoxyphenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (21d)



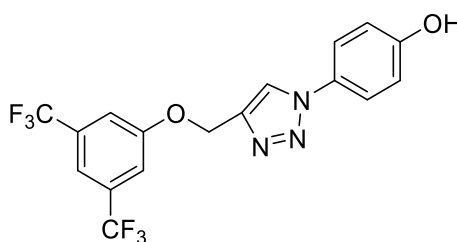
1-Methoxy-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**21b**) (1.28 g, 7.80 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (1.56 g, 17.6 mmol), sodium ascorbate (98.4 mg, 0.50 mmol), 1M aq. CuSO₄ (250 μ L) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 2 h. The resulting solution was diluted with ice water (60 mL), 10% aq. NH₃ (10 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **21d** (2.09 g, 7.03 mmol, 89%) as a brown solid. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 3.69 (s, 3H), 5.13 (s, 2H), 6.87 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 6.97 (m, 4H), 7.67 (d, J = 8.8, 2H), 8.73 (s, 1H), 9.98 (br s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 55.3 (CH₃), 61.6 (CH₂), 114.6 (2CH), 115.7 (2CH), 116.1 (2CH), 120.0 (2CH), 122.6 (CH), 128.8 (C), 143.8 (C), 152.0 (C), 153.6 (C), 157.8 (C) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for C₁₆H₁₆N₃O₃ [M+H]⁺ 298.1192, found 298.1184.

Synthesis of 4-(4-((4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**22d**)



1-Chloro-4-(prop-2-yn-1-yloxy)-2-(trifluoromethyl)benzene (**22b**) (491 mg, 2.09 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (420 mg, 3.11 mmol), sodium ascorbate (41.8 mg, 0.21 mmol), 1M aq. CuSO_4 (120 μL) and 50% *n*-BuOH in water (10 mL) were stirred at 60°C for 24 h. The resulting solution was diluted with ice water (20 mL), 10% aq. NH_3 (10 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **22d** (313 mg, 0.85 mmol, 41%) as a brown solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 5.45 (s, 2H), 6.95 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.67 (m, 2H), 7.79 (s, 2H), 8.80 (s, 1H), 9.98 (br s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 61.8 (CH_2), 114.6 (q, $^3J_{\text{FC}} = 5.5$ Hz, C), 116.1 (2CH), 122.4 (q, $^1J_{\text{FC}} = 270.0$ Hz, CF_3), 120.2 (CH), 121.9 (d, $^4J_{\text{FC}} = 2.3$ Hz, CH), 122.1 (2CH), 123.0 (CH), 127.5 (q, $^2J_{\text{FC}} = 25.5$ Hz, C), 128.6 (C), 132.8 (C), 142.8 (C), 156.8 (C), 158.0 (C) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -62.9 (s, 3F) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 370.0570, found 370.0565.

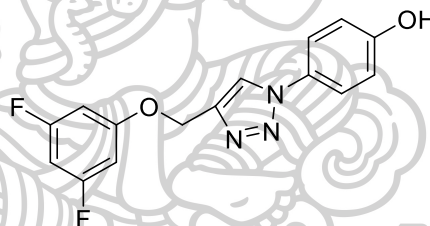
Synthesis of 4-(4-((3,5-bis(trifluoromethyl)phenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**23d**)



1-(Prop-2-yn-1-yloxy)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzene (**23b**) (275 mg, 1.03 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (307 mg, 2.27 mmol), sodium ascorbate (31.1 mg, 0.16

mmol), 1M aq. CuSO₄ (120 μL) and 50% *n*-BuOH in water (10 mL) were stirred at 60°C for 24 h. The resulting solution was diluted with ice water (20 mL), 10% aq. NH₃ (10 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **23d** (352 mg, 0.87 mmol, 85%) as a brown solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.45 (s, 2H), 6.95 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.67 (m, 2H), 7.79 (s, 2H), 8.80 (s, 1H), 9.98 (br s, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 62.1 (CH₂), 114.1 (CH), 116.0 (2CH), 116.1 (2CH), 123.1 (q, ¹*J*_{FC} = 270.8 Hz, 2CF₃), 122.1 (2CH), 123.1 (CH), 128.6 (C), 131.6 (q, ²*J*_{FC} = 33.4 Hz, 2C), 142.6 (C), 157.9 (C), 159.0 (C) ppm.; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -62.9 (s, 6F) ppm.; HRMS (ESI+) *m/z*: calcd for C₁₇H₁₂F₆N₃O₂ [M+H]⁺ 404.0834, found 404.0838.

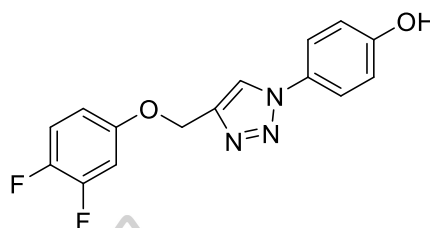
Synthesis of 4-(4-((3,5-difluorophenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl) phenol (24d)



1,3-Difluoro-5-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**24b**) (731 mg, 4.35 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (866 mg, 6.41 mmol), sodium ascorbate (103 mg, 0.52 mmol), 1M aq. CuSO₄ (240 μL) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 4 h. The resulting solution was diluted with ice water (20 mL), 10% aq. NH₃ (15 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **24d** (1.01 mg, 3.34 mmol, 77%) as a brown solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.26 (s, 2H), 6.84 (m, 3H), 6.95 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.79 (s, 1H), 9.97 (brs, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 61.9 (CH₂), 96.6 (t, ²*J*_{FC} = 26.3 Hz, CH), 99.3 (dd, ²*J*_{FC}, ⁴*J*_{FC} = 18.9, 9.4 Hz, 2CH), 116.2 (2CH), 122.2 (2CH), 123.1 (CH), 128.7 (C), 142.7 (C), 158.0 (C), 160.2 (t, ³*J*_{FC} = 14.1 Hz, C), 163.1 (dd, ¹*J*_{FC}, ³*J*_{FC} = 242.6, 16.2 Hz, 2CF) ppm.;

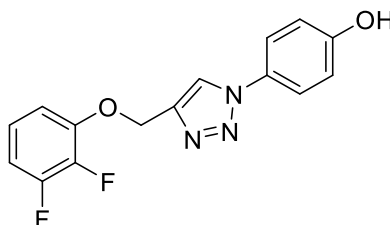
^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -110.6 (s, 2F) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 304.0898, found 304.0886.

Synthesis of 4-(4-((3,4-difluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl) phenol (25d)



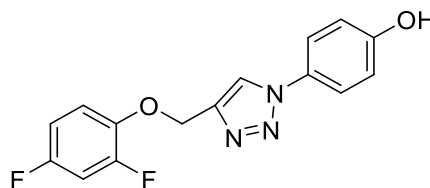
1,2-Difluoro-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**25b**) (923 mg, 5.49 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (974 mg, 7.21 mmol), sodium ascorbate (108 mg, 0.54 mmol), 1M aq. CuSO_4 (272 μL) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 4 h. The resulting solution was diluted with ice water (20 mL), 10% aq. NH_3 (15 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **25d** (1.34 mg, 4.41 mmol, 80%) as a brown solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 5.20 (s, 2H), 6.89 (m, 1H), 6.94 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.21 (ddd, $J = 12.5, 6.7, 2.8$ Hz, 1H), 7.34 (q, $J = 9.7$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 8.74 (s, 1H), 9.95 (br s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 61.9 (CH_2), 104.5 (d, $^2J_{\text{FC}} = 20.3$ Hz, CH), 111.2 (dd, $^2J_{\text{FC}}, ^3J_{\text{FC}} = 5.9, 3.2$ Hz, CH), 116.2 (2CH), 117.7 (d, $^3J_{\text{FC}} = 18.8$ Hz, CH), 122.2 (2CH), 123.0 (CH), 128.8 (C), 144.3 (dd, $^1J_{\text{FC}}, ^2J_{\text{FC}} = 236.3, 12.8$ Hz, CF), 149.7 (dd, $^1J_{\text{FC}}, ^2J_{\text{FC}} = 243.8, 13.5$ Hz, CF), 154.7 (dd, $^2J_{\text{FC}}, ^3J_{\text{FC}} = 8.9, 1.5$ Hz, CH), 158.0 (C) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -137.9 (d, $J_{\text{FF}} = 22.8$, 1F), -150.4 (d, $J_{\text{FF}} = 22.8$, 1F) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 326.0717, found 326.0712.

Synthesis of 4-(4-((2,3-difluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**26d**)



1,2-Difluoro-3-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**26b**) (994 mg, 5.91 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (986 mg, 7.30 mmol), sodium ascorbate (1.12 mg, 0.59 mmol), 1M aq. CuSO₄ (272 μ L) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 4 h. The resulting solution was diluted with ice water (20 mL), 10% aq. NH₃ (15 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **26d** (1.23 g, 4.04 mmol, 68%) as a brown solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.33 (s, 2H), 6.94 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.01 (m, 1H), 7.16 (m, 1H), 7.26 (m, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.78 (s, 1H), 9.96 (br s, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 62.5 (CH₂), 109.4 (d, ³*J*_{FC} = 16.5 Hz, CH), 111.1 (d, ³*J*_{FC} = 3.0 Hz, CH), 116.2 (2CH), 122.2 (2CH), 123.2 (CH), 124.2 (dd, ²*J*_{FC}, ³*J*_{FC} = 9.0, 5.3 Hz, CH), 128.7 (C), 140.4 (dd, ¹*J*_{FC}, ²*J*_{FC} = 243.8, 14.3 Hz, CF), 142.8 (C), 147.5 (dd, ²*J*_{FC}, ³*J*_{FC} = 7.5, 3.1 Hz, C), 150.6 (dd, ¹*J*_{FC}, ²*J*_{FC} = 242.3, 9.3 Hz, CF), 158.0 (C) ppm.; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -139.8 (s, 1F), -139.9 (s, 1F) ppm.; HRMS (ESI+) *m/z*: calcd for C₁₅H₁₁F₂N₃O₂Na [M+Na]⁺ 326.0717, found 326.0716.

Synthesis of 4-(4-((2,4-difluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**27d**)

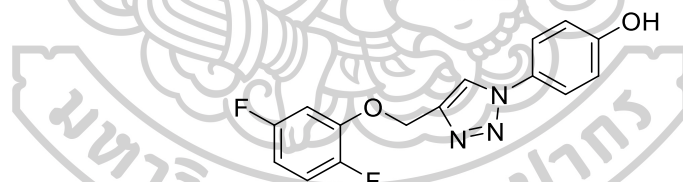


2,4-Difluoro-1-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**27b**) (881 mg, 5.24 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (986 mg, 7.30 mmol), sodium ascorbate (110 mg, 0.56 mmol), 1M

aq. CuSO_4 (272 μL) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 4 h. The resulting solution was diluted with ice water (20 mL), 10% aq. NH_3 (15 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **27d** (1.01 mg, 3.33 mmol, 64%) as a brown solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 5.27 (s, 2H), 6.94 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.02 (m, 1H), 7.26 (m, 1H), 7.39 (m, 1H), 7.66 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 62.7 (CH_2), 105.0 (dd, $^2J_{\text{FC}}$, $^2J_{\text{FC}} = 68.3, 22.5$ Hz, CH), 110.9 (dd, $^2J_{\text{FC}}$, $^4J_{\text{FC}} = 21.8, 3.8$ Hz, CH), 116.2 (2CH), 117.5 (dd, $^3J_{\text{FC}}$, $^3J_{\text{FC}} = 9.0, 2.3$ Hz, CH), 122.2 (2CH), 123.1 (CH), 128.8 (C), 142.6 (dd, $^2J_{\text{FC}}$, $^4J_{\text{FC}} = 10.5, 3.8$ Hz, C), 143.0 (C), 151.69 (dd, $^1J_{\text{FC}}$, $^3J_{\text{FC}} = 245.3, 10.5$ Hz, CF), 155.9 (dd, $^1J_{\text{FC}}$, $^3J_{\text{FC}} = 237.8, 10.5$ Hz, CF), 158.0 (C) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -121.3 (d, $J_{\text{FF}} = 28.2$ Hz, 1F), -131.1 (d, $J_{\text{FF}} = 28.2$ Hz, 1F) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 326.0717, found 326.0719.

Synthesis of 4-(4-((2,5-difluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl) phenol

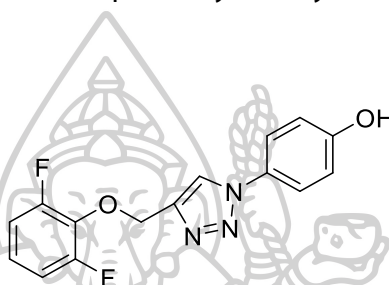
(**28d**)



1,4-Difluoro-2-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**28b**) (925 mg, 5.50 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (1.08 mg, 8.02 mmol), sodium ascorbate (79.8 mg, 0.40 mmol), 1M aq. CuSO_4 (272 μL) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 4 h. The resulting solution was diluted with ice water (20 mL), 10% aq. NH_3 (15 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **28d** (1.21 g, 4.00 mmol, 73%) as a brown solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 5.31 (s, 2H), 6.78 (m, 1H), 6.95 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.24 (m, 1H), 7.36 (m, 1H), 7.68 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.78 (s, 1H), 9.98 (br s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 62.3 (CH_2), 103.5 (dd, $^2J_{\text{FC}}$, $^3J_{\text{FC}}$

= 27.8, 2.3 Hz, CH), 107.0 (dd, $^2J_{FC}$, $^3J_{FC}$ = 24.0, 17.5 Hz, CH), 116.2 (2CH), 116.6 (dd, $^2J_{FC}$, $^3J_{FC}$ = 20.3, 10.5 Hz, CH), 122.2 (2CH), 123.3 (CH), 128.7 (C), 142.6 (C), 146.7 (dd, $^2J_{FC}$, $^3J_{FC}$ = 12.0, 11.3 Hz, C), 148.3 (dd, $^1J_{FC}$, $^4J_{FC}$ = 242.3, 3.0 Hz, CF), 158.3 (dd, $^1J_{FC}$, $^4J_{FC}$ = 238.5, 2.3 Hz, CF), 158.0 (C) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -117.5 (d, J_{FF} = 15.2 Hz, 1F), -141.3 (d, J_{FF} = 15.2 Hz, 1F) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 326.0717, found 326.0718.

Synthesis of 4-(4-((2,6-difluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**29d**)



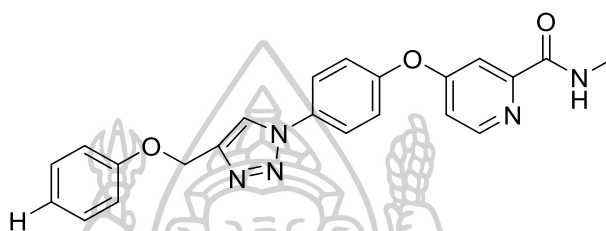
1,3-Difluoro-2-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**29b**) (936 mg, 5.56 mmol), 4-azidophenol (**1c**) (981 mg, 7.26 mmol), sodium ascorbate (110 mg, 0.55 mmol), 1M aq. CuSO_4 (272 μL) and 50% *n*-BuOH in water (20 mL) were stirred at 60°C for 4 h. The resulting solution was diluted with ice water (20 mL), 10% aq. NH_3 (15 mL) and stirred for another 5 minutes, filtered and air-dried overnight. Purification of crude product by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) given **29d** (836 mg, 2.76 mmol, 50%) as a brown solid. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 5.26 (s, 2H), 6.94 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.10 (m, 3H), 7.65 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.73 (s, 1H), 9.94 (br s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 66.6 (t, $^4J_{FC}$ = 3.0 Hz, CH_2), 112.6 (dd, $^2J_{FC}$, $^4J_{FC}$ = 8.3, 6.8 Hz, 2CH), 116.2 (2CH), 122.0 (2CH), 123.1 (CH), 124.3 (t, $^4J_{FC}$ = 9.0 Hz, C), 128.7 (C), 134.0 (t, $^2J_{FC}$ = 14.3 Hz, C), 143.0 (C), 155.8 (dd, $^1J_{FC}$, $^3J_{FC}$ = 245.3, 5.3 Hz, 2CF), 157.9 (C) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -129.2 (s, 2F) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 326.0717, found 326.0719.

4.3.4 General procedure for inhibitor formation

To a stirred suspension of triazole phenol derivatives (**1d-29d**), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**), *t*-BuOK and K_2CO_3 in dried DMF (5 mL) was heated to 80-

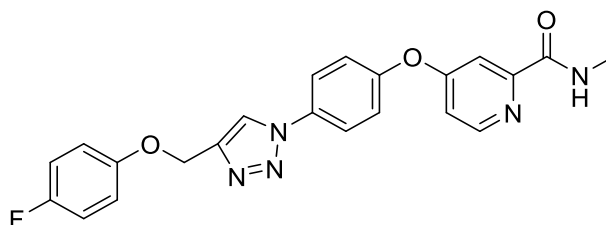
85°C for various times. The resulting suspension was cooled to room temperature and diluted with water, which was extracted with EtOAc. The organic phase was dried over anh. Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to provide crude product which was purified by column chromatography given desired product (**1f-30f**).

Synthesis of *N*-methyl-4-(4-(4-(phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)picolinamide (1f**)**



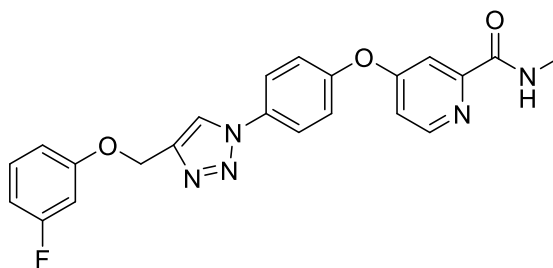
4-(4-(Phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**1d**) (102 mg, 0.38 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (148 mg, 0.87 mmol), *t*-BuOK (41.8 mg, 0.37 mmol) and K₂CO₃ (55.5 mg, 0.40 mmol) in dried DMF (5 mL) was reacted for 10 h. The crude product was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford **1f** (118 mg, 0.29 mmol, 76%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.20 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 5.33 (s, 2H), 7.02 (m, 4H), 7.31 (m, 5H), 7.76 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.06 (br s, 1H), 8.44 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 26.2 (CH₃), 61.9 (CH₂), 110.4 (CH), 114.5 (CH), 114.8 (2CH), 121.1 (2CH), 121.4 (CH), 122.0 (CH), 122.7 (2CH), 129.6 (2CH), 134.3 (C), 145.6 (C), 150.0 (CH), 152.5 (C), 154.1 (C), 158.1 (C), 164.3 (CO), 165.5 (C) ppm.; HRMS (ESI+) *m/z*: calcd. for C₂₂H₁₉N₅O₃Na [M+Na]⁺ 424.1386, found 424.1374.

Synthesis of 4-(4-(4-((4-fluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl) phenoxy)-N-methylpicolinamide (2f)



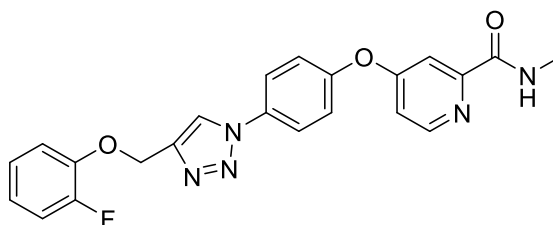
4-(4-((4-Fluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**2d**) (112 mg, 0.39 mmol), 4-chloro-N-methylpicolinamide (**1e**) (102 mg, 0.60 mmol), *t*-BuOK (126 mg, 1.12 mmol) and K₂CO₃ (78.8 mg, 0.57 mmol) in dried DMF (5 mL) was reacted for 16 h. The crude product was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford **2f** (57.1 mg, 0.136 mmol, 35%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.80 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H), 5.24 (s, 2H), 7.14 (m, 4H), 7.26 (dd, *J* = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.50 (m, 3H), 8.05 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.57 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.82 (q, *J* = 4.8 Hz, 1H), 9.00 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 26.0 (CH₃), 61.6 (CH₂), 109.4 (CH), 114.6 (CH), 115.9 (d, ²*J*_{FC} = 23.0 Hz, 2CH), 116.1 (d, ³*J*_{FC} = 8.0 Hz, 2CH), 121.9 (2CH), 122.5 (2CH), 123.1 (CH), 134.0 (C), 143.7 (C), 150.6 (CH), 152.6 (C), 153.3 (C), 154.3 (d, ⁴*J*_{FC} = 2.3 Hz, C), 156.7 (d, ¹*J*_{FC} = 234.8 Hz, CF), 163.7 (CO), 165.1 (C) ppm.; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -125.8 (s, 1F); HRMS (ESI+) *m/z*: calcd. for C₂₂H₁₈FN₅O₃Na [M+Na]⁺ 442.1291, found 442.1290.

Synthesis of 4-(4-(4-((3-fluorophenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-*N*-methylpicolinamide (**3f**)



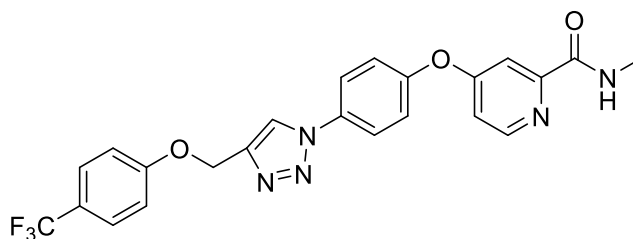
4-(4-((3-Fluorophenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**3d**) (274 mg, 0.96 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (237 mg, 1.60 mmol), *t*-BuOK (219 mg, 1.95 mmol) and K₂CO₃ (270 mg, 1.95 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 20 h. The crude product was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford **3f** (213 mg, 0.51 mmol, 53%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.79 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H), 5.26 (s, 2H), 6.79 (td, *J* = 8.3, 1.9 Hz, 1H), 6.92 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H), 6.98 (dt, *J* = 11.3, 2.3 Hz, 1H), 7.24 (dd, *J* = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.35 (m, 1H), 7.47 (m, 3H), 8.03 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.56 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.81 (q, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.97 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 26.2 (CH₃), 61.5 (CH₂), 102.5 (d, ²*J*_{FC} = 24.8 Hz, CH), 107.8 (d, ³*J*_{FC} = 21.0 Hz, CH), 109.6 (CH), 111.3 (d, ⁴*J*_{FC} = 3.0 Hz, CH), 114.7 (CH), 122.4 (2CH), 122.7 (2CH), 123.3 (CH), 130.9 (C), 131.0 (C), 134.1 (C), 143.7 (C), 150.7 (CH), 153.0 (d, ²*J*_{FC} = 68.3 Hz, CH), 159.5 (d, ³*J*_{FC} = 10.5 Hz, C), 163.1 (d, ¹*J*_{FC} = 241.5 Hz, CF), 163.8 (CO), 165.3 (C) ppm.; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -113.2 (s, 1F); HRMS (ESI+) *m/z*: calcd. for C₂₂H₁₉FN₅O₃Na [M+H]⁺ 420.1472, found 420.1473.

Synthesis of 4-(4-(4-((2-fluorophenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-*N*-methylpicolinamide (**4f**)



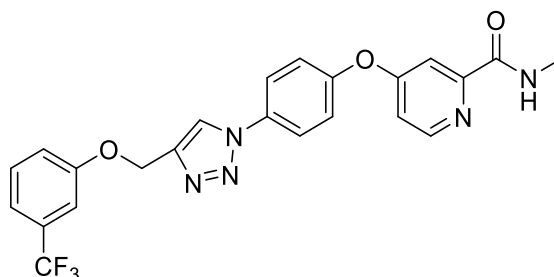
4-(4-((2-Fluorophenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**4d**) (304 mg, 1.06 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (208 mg, 1.22 mmol), *t*-BuOK (246 mg, 2.19 mmol) and K₂CO₃ (176 mg, 1.27 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 24 h. The crude product was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford **4f** (118 mg, 0.28 mmol, 27%) as an orange brown solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.78 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H), 5.31 (s, 2H), 6.97 (m, 1H), 7.19 (m, 3H), 7.38 (td, *J* = 8.5, 1.1 Hz, 1H), 7.46 (m, 3H), 8.02 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H), 8.55 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.82 (q, *J* = 4.9 Hz, 1H), 8.94 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 26.3 (CH₃), 62.1 (CH₂), 109.7 (CH), 114.9 (CH), 115.9 (CH), 116.4 (d, ²*J*_{FC} = 17.3 Hz, CH), 122.0 (d, ³*J*_{FC} = 6.8 Hz, CH), 122.5 (2CH), 122.9 (2CH), 123.6 (CH), 125.2 (d, ³*J*_{FC} = 3.8 Hz, CH), 134.2 (C), 143.8 (C), 146.0 (d, ²*J*_{FC} = 10.5 Hz, C), 152.1 (d, ¹*J*_{FC} = 241.5 Hz, CF), 151.0 (C), 152.7 (C), 153.7 (CH), 164.1 (CO), 165.4 (C) ppm.; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -136.7 (s, 1F); HRMS (ESI+) *m/z*: calcd. for C₂₂H₁₉FN₅O₃ [M+H]⁺ 420.1472, found 420.1456.

Synthesis of *N*-methyl-4-(4-(4-((4-(trifluoromethyl)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)picolinamide (**5f**)



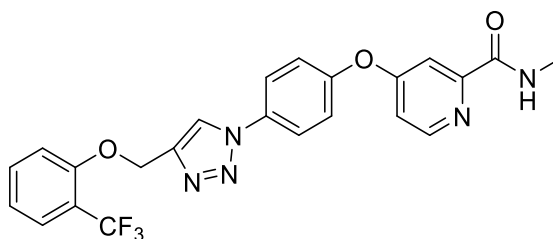
4-(4-((4-(Trifluoromethyl)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**5d**) (264 mg, 0.79 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (137 mg, 0.80 mmol), *t*-BuOK (140 mg, 1.25 mmol) and K₂CO₃ (173 mg, 1.25 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 18 h. The crude product was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford **5f** (152 mg, 0.324 mmol, 42%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.80 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H), 5.37 (s, 2H), 7.28 (m, 3H), 7.49 (m, 3H), 7.69 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 8.05 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.56 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.82 (q, *J* = 4.5 Hz, 1H), 9.02 (s, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 26.0 (CH₃), 61.3 (CH₂), 109.4 (CH), 114.6 (CH), 115.3 (2CH), 124.5 (q, ¹*J*_{FC} = 269.3 Hz, CF₃), 121.6 (q, ²*J*_{FC} = 31.9 Hz, C), 122.2 (2CH), 122.6 (2CH), 123.3 (CH), 126.0 (q, ³*J*_{FC} = 3.8 Hz, 2CH), 134.0 (C), 143.4 (C), 150.6 (C), 152.6 (C), 153.4 (C), 160.8 (CO), 163.6 (C), 165.1 (C) ppm.; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -61.5 (s, 3F) ppm.; HRMS (ESI+) *m/z*: calcd for C₂₃H₁₉FN₅O₃ [M+H]⁺ 470.1440, found 470.1431.

Synthesis of *N*-methyl-4-(4-(4-((3-(trifluoromethyl)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)picolinamide (**6f**)



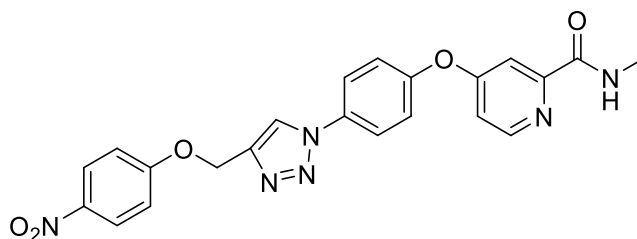
4-(4-((3-(Trifluoromethyl)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**6d**) (333 mg, 0.99 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (198 mg, 1.16 mmol), *t*-BuOK (216 mg, 1.93 mmol) and K_2CO_3 (271 mg, 1.96 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 16 h. The crude product was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford **6f** (224 mg, 0.52 mmol, 53%) as a white solid. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.79 (d, $J = 4.9$ Hz, 3H), 5.36 (s, 2H), 7.26 (dd, $J = 5.6, 2.6$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.40 (br s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.49 (m, 3H), 7.56 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.56 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 8.81 (q, $J = 4.9$ Hz, 1H), 9.01 (s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 26.1 (CH₃), 61.5 (CH₂), 109.4 (CH), 111.5 (q, $^3J_{FC} = 3.8$ Hz, CH), 114.6 (CH), 117.6 (q, $^3J_{FC} = 3.8$ Hz, CH), 124.0 (q, $^1J_{FC} = 270.78$ Hz, CF₃), 119.1 (CH), 122.3 (2CH), 122.6 (2CH), 123.3 (CH), 130.4 (q, $^2J_{FC} = 31.5$ Hz, C), 130.8 (CH), 134.0 (C), 143.6 (C), 150.6 (C), 152.3 (C), 153.4 (C), 158.3 (CO), 163.7 (C), 165.2 (C) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -62.6 (s, 3F) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for C₂₃H₁₉F₃N₅O₃ [M+H]⁺ 470.1440, found 470.1437.

Synthesis of *N*-methyl-4-(4-(4-((2-(trifluoromethyl)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)picolinamide (**7f**)



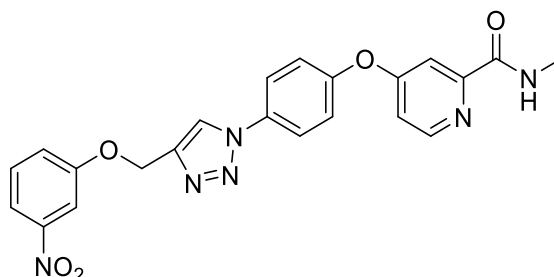
4-(4-((2-(Trifluoromethyl)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**7d**) (332 mg, 0.99 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (204 mg, 1.20 mmol), *t*-BuOK (227 mg, 2.02 mmol) and K₂CO₃ (267 mg, 1.64 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 20 h. The crude product was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford **7f** (222 mg, 0.47 mmol, 47%) as white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.79 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H), 5.42 (s, 2H), 7.14 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.24 (dd, *J* = 5.9, 2.6 Hz, 1H), 7.49 (m, 3H), 7.55 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.66 (q, *J* = 7.8 Hz, 2H), 8.04 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.56 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.80 (q, *J* = 4.9 Hz, 1H), 8.97 (s, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 26.0 (CH₃), 61.9 (CH₂), 109.4 (CH), 114.3 (CH), 114.6 (CH), 117.4 (q, ²*J*_{FC} = 30.6 Hz, C), 123.7 (q, ¹*J*_{FC} = 270.6 Hz, CF₃), 120.8 (CH), 122.3 (2CH), 122.6 (2CH), 123.2 (CH), 126.8 (q, ³*J*_{FC} = 5.3 Hz, CH), 133.9 (CH), 134.2 (CH), 143.3 (C), 150.6 (C), 152.6 (C), 153.4 (C), 156.8 (C), 163.7 (CO), 165.1 (C) ppm.; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -62.6 (s, 3F) ppm.; HRMS (ESI+) *m/z*: calcd for C₂₃H₁₉F₃N₅O₃ [M+H]⁺ 470.1440, found 470.1439.

Synthesis of *N*-methyl-4-(4-(4-((4-nitrophenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)picolinamide (**8f**)



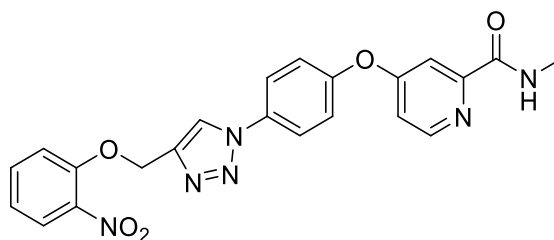
4-(4-((4-Nitrophenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**8d**) (303 mg, 0.90 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (192 mg, 1.13 mmol), *t*-BuOK (256 mg, 2.28 mmol) and K₂CO₃ (257 mg, 1.86 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 29 h. The crude product was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford **8f** (77.9 mg, 0.17 mmol, 18%) as white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.80 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H), 5.45 (s, 2H), 7.26 (dd, *J* = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.50 (m, 3H), 8.06 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.26 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 8.57 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.81 (q, *J* = 4.7 Hz, 1H), 9.05 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 26.0 (CH₃), 61.9 (CH₂), 109.4 (CH), 114.6 (CH), 115.4 (2CH), 122.3 (2CH), 122.6 (2CH), 123.5 (2CH), 125.9 (2CH), 134.0 (CH), 141.2 (C), 143.0 (C), 150.6 (C), 152.6 (C), 153.4 (C), 163.2 (C), 163.2 (CO), 165.1 (C) ppm.; HRMS (ESI+) *m/z*: calcd. for C₂₂H₁₈N₆O₅Na [M+Na]⁺ 469.1236, found 469.1229.

Synthesis of *N*-methyl-4-(4-(4-((3-nitrophenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)picolinamide (**9f**)



4-(4-((3-Nitrophenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**9d**) (300 mg, 0.96 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (188 mg, 1.10 mmol), *t*-BuOK (226 mg, 2.02 mmol) and K₂CO₃ (257 mg, 1.86 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 17 h. The crude product was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford **9f** (161 mg, 0.36 mmol, 38%) as white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.79 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H), 5.41 (s, 2H), 7.25 (dd, *J* = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.48 (dd, *J* = 5.4, 2.6 Hz, 3H), 7.59 (m, 2H), 7.86 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.91 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.56 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.82 (q, *J* = 4.7 Hz, 1H), 8.99 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 26.0 (CH₃), 61.8 (CH₂), 109.3 (CH), 109.4 (CH), 114.6 (CH), 116.0 (CH), 122.2 (CH), 122.3 (2CH), 122.6 (2CH), 123.3 (CH), 130.8 (CH), 134.0 (CH), 143.3 (C), 148.8 (C), 150.6 (C), 152.6 (C), 153.4 (C), 158.5 (C), 163.7 (CO), 165.1 (C) ppm.; HRMS (ESI+) *m/z*: calcd. for C₂₂H₁₈N₆O₅ [M+H]⁺ 447.1417, found 447.1418.

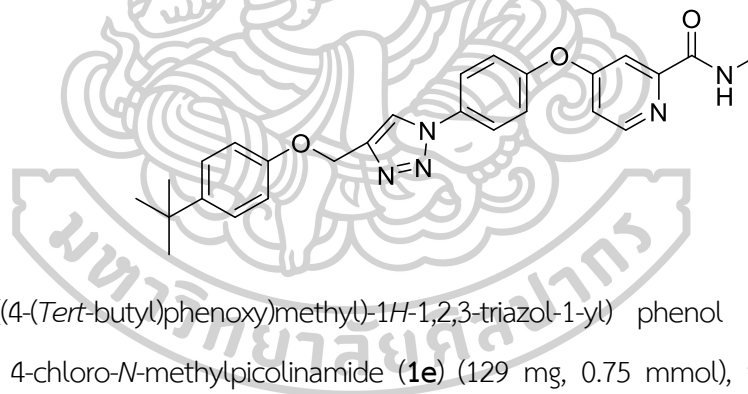
Synthesis of *N*-methyl-4-(4-(4-((2-nitrophenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)picolinamide (**10f**)



4-(4-((2-Nitrophenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**10d**) (306 mg, 0.98 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (186 mg, 1.10 mmol), *t*-BuOK (226 mg,

2.02 mmol) and K_2CO_3 (257 mg, 1.86 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 17 h. The crude product was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford **10f** (161 mg, 0.36 mmol, 38%) as white solid. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.80 (d, J = 4.8 Hz, 3H), 5.46 (s, 2H), 7.16 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.25 (dd, J = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 8.7 Hz, 3H), 7.63 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.70 (td, J = 8.6, 1.4 Hz, 1H), 7.87 (dd, J = 8.1, 1.4 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.56 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.83 (q, J = 4.7 Hz, 1H), 8.96 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 26.3 (CH₃), 62.6 (CH₂), 109.8 (CH), 114.9 (CH), 115.9 (CH), 121.5 (CH), 122.5 (2CH), 122.9 (2CH), 123.7 (CH), 125.2 (CH), 134.1 (CH), 134.7 (CH), 140.8 (C), 143.2 (C), 150.7 (C), 150.9 (C), 152.6 (C), 153.7 (C), 164.0 (CO), 165.4 (C) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd. for C₂₂H₁₈N₆O₅ [M+H]⁺ 447.1417, found 477.1413.

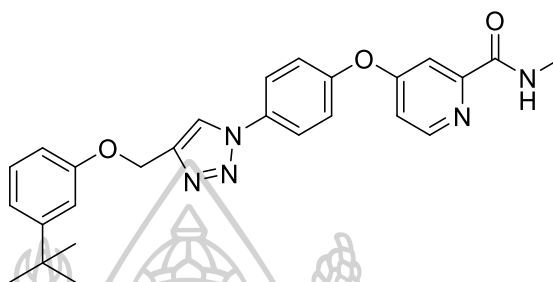
Synthesis of 4-(4-(4-((4-(*tert*-butyl)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-*N*-methylpicolinamide (11f)



4-(4-(4-(*Tert*-butyl)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl) phenol (**11d**) (163 mg, 0.50 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (129 mg, 0.75 mmol), *t*-BuOK (222 mg, 1.98 mmol) and K_2CO_3 (181 mg, 131 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 18 h. The crude product was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford **11f** (101 mg, 0.22 mmol, 44%) as a white solid. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.25 (s, 9H), 2.79 (d, J = 4.9 Hz, 3H), 5.22 (s, 2H), 6.99 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.24 (dd, J = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.48 (m, 3H), 8.05 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.56 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.81 (q, J = 4.9 Hz, 1H), 8.98 (s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 26.0 (CH₃), 31.3 (3CH₃), 33.8 (C), 61.0 (CH₂), 109.4 (CH), 114.0 (CH), 114.6 (CH), 122.2 (2CH), 122.5 (2CH), 122.9 (CH), 126.1 (2CH), 134.0 (CH), 143.1 (C), 144.2 (C), 150.6 (C), 152.6

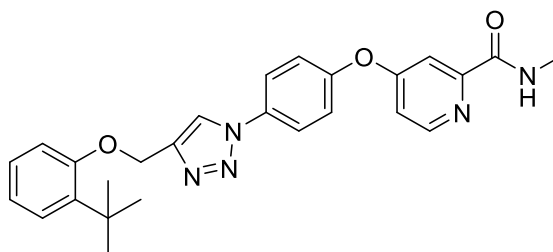
(C), 153.3 (C), 155.8 (C), 163.7 (CO), 165.1 (C) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for $C_{26}H_{28}N_5O_3$ [M+H]⁺ 458.2192, found 458.2196.

Synthesis of 4-(4-(4-((3-(*tert*-butyl)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-*N*-methylpicolinamide (12f)



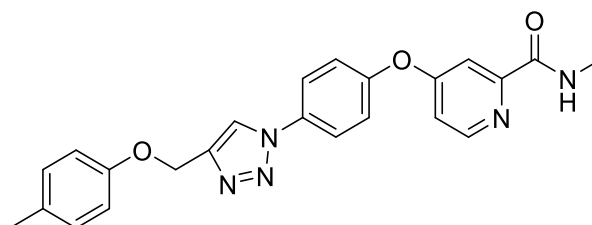
4-(4-((3-(*Tert*-butyl)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl) phenol (**12d**) (318 mg, 0.98 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (185 mg, 1.08 mmol), *t*-BuOK (215 mg, 1.92 mmol) and K_2CO_3 (258 mg, 1.86 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 17 h. The crude product was purified by column chromatography (30% EtOAc:*n*-hexane) to afford **12f** (136 mg, 0.30 mmol, 31%) as white solid. 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 1.25 (s, 9H), 2.79 (d, $J = 4.9$ Hz, 3H), 5.23 (s, 2H), 6.91 (dd, $J = 7.7, 1.9$ Hz, 1H), 7.00 (m, 2H), 7.24 (m, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.47 (d, $J = 3.0$ Hz, 2H), 8.03 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 8.6 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 8.81 (q, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.94 (s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ 26.2 (CH₃), 31.2 (3CH₃), 34.6 (C), 61.0 (CH₂), 109.6 (CH), 111.3 (CH), 112.6 (CH), 114.8 (CH), 118.1 (CH), 122.4 (2CH), 122.7 (2CH), 123.2 (CH), 129.3 (CH), 134.2 (CH), 144.4 (C), 150.8 (C), 152.6 (C), 152.7 (C), 153.5 (C), 158.0 (C), 163.9 (CO), 165.4 (C) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for $C_{26}H_{28}N_5O_3$ [M+H]⁺ 458.2192, found 458.2199.

Synthesis of 4-(4-(4-((2-(*tert*-butyl)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-*N*-methylpicolinamide (**13f**)



4-(4-(2-(*Tert*-butyl)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**13d**) (313 mg, 0.97 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (183 mg, 1.07 mmol), *t*-BuOK (228 mg, 2.02 mmol) and K₂CO₃ (264 mg, 1.91 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 18 h. The crude product was purified by column chromatography (30% EtOAc: *n*-Hexane) to afford **13f** (189 mg, 0.41 mmol, 42%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.30 (s, 9H), 2.79 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H), 5.25 (s, 2H), 6.90 (m, 1H), 7.23 (m, 4H), 7.47 (m, 3H), 8.05 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.56 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.81 (q, *J* = 4.7 Hz, 1H), 8.94 (s, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 24.5 (CH₃), 29.9 (3CH₃), 34.6 (C), 61.2 (CH₂), 109.71 (CH), 113.2 (CH), 114.8 (CH), 121.0 (CH), 122.5 (2CH), 122.7 (2CH), 123.0 (CH), 126.6 (CH), 127.4 (CH), 134.2 (CH), 137.8 (C), 144.4 (C), 150.8 (C), 152.6 (C), 153.6 (C), 157.0 (C), 164.0 (CO), 165.4 (C) ppm.; HRMS (ESI+) *m/z*: calcd for C₂₆H₂₇N₅O₃Na [M+Na]⁺ 480.2012, found 480.2017.

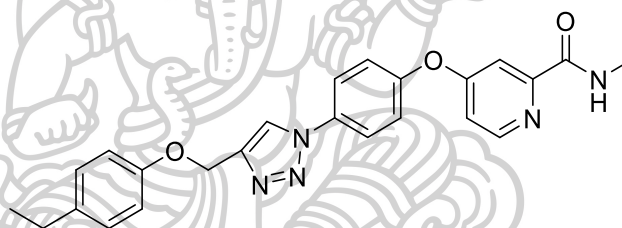
Synthesis of *N*-methyl-4-(4-(4-(*p*-tolyl)oxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)picolinamide (**14f**)



4-(4-(*p*-Tolyl)oxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**14d**) (115 mg, 0.41 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (94.3 mmol, 0.55 mmol), *t*-BuOK (128 mg, 1.14 mmol) and K₂CO₃ (53.9 mg, 0.39 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 17 h.

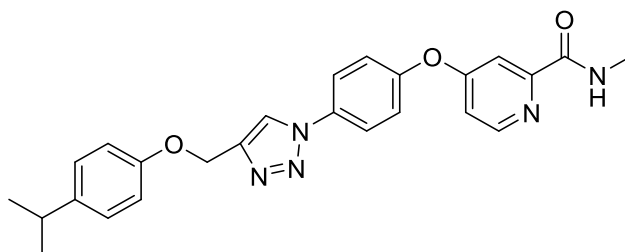
The crude product was purified by column chromatography (30% EtOAc:*n*-hexane) to afford **14f** (131 mg, 0.31 mmol, 77 %) as a white solid. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.24 (s, 3H), 2.80 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.97 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.12 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.24 (dd, J = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.49 (m, 3H), 8.05 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.56 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.80 (q, J = 7.7, 4.9 Hz, 1H), 8.97 (s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 20.1 (CH₃), 26.0 (CH₃), 61.0 (CH₂), 109.4 (CH), 114.6 (CH), 114.6 (2CH), 122.2 (2CH), 122.5 (2CH), 123.0 (CH), 129.7 (CH), 129.9 (2CH), 134.0 (C), 144.1 (C), 150.6 (C), 152.6 (C), 153.3 (C), 155.9 (C), 163.6 (CO), 165.2 (C) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for C₂₃H₂₂N₅O₃ [M+H]⁺ 416.1723, found 416.1717.

Synthesis of 4-(4-(4-((4-ethylphenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-*N*-methylpicolinamide (**15f**)



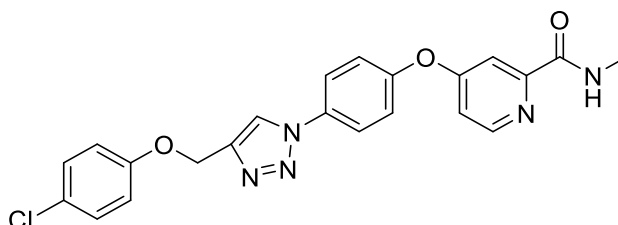
4-(4-((4-Ethylphenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**15d**) (285 mg, 0.97 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (206 mg, 1.21 mmol), *t*-BuOK (230 mg, 2.05 mmol) and K₂CO₃ (260 mg, 1.88 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 18 h. The crude product was purified by column chromatography (30% EtOAc:*n*-hexane) to afford **15f** (162 mg, 0.38 mmol, 39%) as a light yellow solid. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.14 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 2.54 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 2.79 (d, J = 4.8 Hz, 3H), 5.21 (s, 2H), 6.99 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.14 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.25 (dd, J = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.48 (m, 3H), 8.04 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.56 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.81 (dq, J = 5.1 Hz, 1H), 8.97 (s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 15.9 (CH₃), 26.1 (CH₃), 27.3 (CH₂), 61.1 (CH₂), 109.4 (CH), 114.6 (CH), 114.7 (2CH), 122.3 (2CH), 122.5 (2CH), 123.0 (CH), 128.7 (2CH), 134.1 (CH), 136.2 (C), 144.2 (C), 150.6 (C), 152.5 (C), 153.3 (C), 156.1 (C), 163.7 (CO), 165.2 (C) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for C₂₄H₂₃N₅O₃Na [M+Na]⁺ 452.1699, found 452.1691.

Synthesis of 4-(4-(4-((4-isopropylphenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-*N*-methylpicolinamide (**16f**)



4-(4-((4-Isopropylphenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**16d**) (311 mg, 1.01 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (217 mg, 1.27 mmol), *t*-BuOK (222 mg, 1.98 mmol) and K₂CO₃ (266 mg, 1.86 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 18 h. The crude product was purified by column chromatography (30% EtOAc:*n*-hexane) to afford **16f** (199 mg, 0.45 mmol, 44%) as white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.16 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 2.79 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H), 2.85 (m, 1H), 5.20 (s, 2H), 6.98 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.24 (dd, *J* = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.47 (m, 3H), 8.03 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.56 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.81 (q, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.94 (s, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 24.2 (CH₃), 26.2 (CH₃), 32.7 (CH), 61.1 (CH₂), 109.6 (CH), 114.7 (2CH), 114.8 (CH), 122.4 (2CH), 122.7 (2CH), 123.1 (CH), 127.4 (2CH), 134.2 (CH), 141.2 (C), 144.4 (C), 150.8 (C), 152.6 (C), 153.5 (C), 156.2 (C), 163.9 (CO), 165.4 (C) ppm.; HRMS (ESI+) *m/z*: calcd for C₂₅H₂₆N₅O₃ [M+H]⁺ 444.2036, found 444.2034.

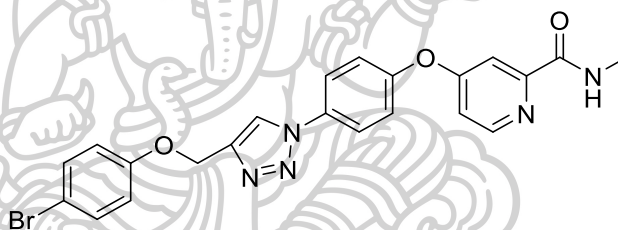
Synthesis of 4-(4-(4-((4-chlorophenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-*N*-methylpicolinamide (**17f**)



4-(4-((4-Chlorophenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**17d**) (228 mg, 0.75 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (123 mg, 0.73 mmol), *t*-BuOK (95.7 mg, 0.85 mmol) and K₂CO₃ (110 mg, 0.80 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 17 h. The

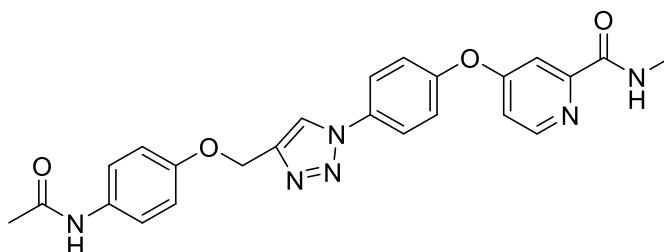
crude product was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford **17f** (311 mg, 0.71 mmol, 97% mmol) as a white solid. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.79 (d, J = 4.9 Hz, 3H), 5.26 (s, 2H), 7.13 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.25 (dd, J = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.48 (m, 2H), 8.04 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.80 (q, J = 4.9 Hz, 1H), 8.99 (s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 26.1 (CH₃), 61.3 (CH₂), 109.5 (CH), 114.7 (CH), 116.7 (2CH), 122.4 (2CH), 122.7 (2CH), 123.3 (CH), 124.8 (CH), 129.4 (2CH), 134.1 (C), 143.8 (C), 150.7 (C), 154.6 (C), 153.5 (C), 156.9 (C), 163.8 (CO), 166.2 (C) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for C₂₂H₁₈ClN₅O₃Na [M+Na]⁺ 458.0996, found 458.0989.

Synthesis of 4-(4-(4-((4-bromophenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-*N*-methylpicolinamide (18f)



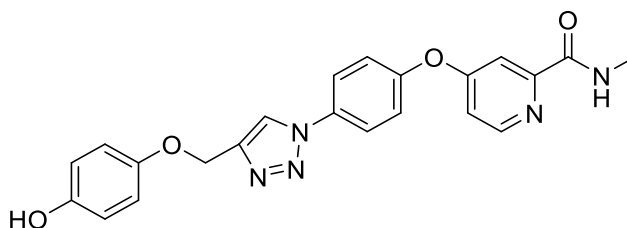
4-(4-((4-Bromophenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**18d**) (387 mg, 1.12 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (163 mg, 0.96 mmol), *t*-BuOK (220 mg, 1.96 mmol) and K₂CO₃ (300 mg, 2.17 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 17 h. The crude product was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford **18f** (215 mg, 0.45 mmol, 47% mmol) as a white solid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.02 (s, 3H), 5.28 (s, 2H), 6.93 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.06 (dd, J = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.34 (s, 1H), 7.42 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 7.73 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.84 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.17 (s, 1H), 8.46 (d, J = 5.6 Hz, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 26.1 (CH₃), 62.7 (CH₂), 110.7 (CH), 113.8 (CH), 114.8 (CH), 116.8 (2CH), 121.6 (CH), 122.1 (2CH), 123.0 (2CH), 132.6 (2CH), 134.3 (C), 144.8 (C), 150.3 (C), 152.4 (C), 154.3 (C), 157.3 (C), 164.8 (CO), 165.7 (C) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for C₂₂H₁₉BrN₅O₃ [M+H]⁺ 480.0671, 482.0651, found 480.0652, 482.0664.

Synthesis of 4-(4-(4-((4-acetamidophenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-*N*-methylpicolinamide (**19f**)



N-(4-((1-(4-Hydroxyphenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy) phenyl)acetamide (**19d**) (330 mg, 0.96 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (182 mg, 1.06 mmol), *t*-BuOK (229 mg, 2.03 mmol) and K₂CO₃ (278 mg, 2.01 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 20 h. The crude product was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford **19f** (185.2 mg, 0.40 mmol, 42%) as white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.00 (s, 3H), 2.79 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H), 5.19 (s, 2H), 7.00 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.24 (dd, *J* = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.48 (m, 5H), 8.03 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.55 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.82 (q, *J* = 4.80 Hz, 1H), 8.94 (s, 1H), 9.84 (s, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 23.8 (CH₃), 26.0 (CH₃), 61.2 (CH₂), 109.4 (CH), 114.6 (CH), 114.8 (CH), 120.5 (2CH), 122.2 (2CH), 122.5 (2CH), 123.0 (CH), 133.0 (CH), 134.0 (C), 144.1 (C), 150.6 (C), 152.6 (C), 153.3 (C), 153.7 (C), 163.6 (CO), 165.1 (CO), 167.8 (C) ppm.; HRMS (ESI+) *m/z*: calcd for C₂₄H₂₂N₆O₄Na [M+Na]⁺ 481.1600, found 481.1617.

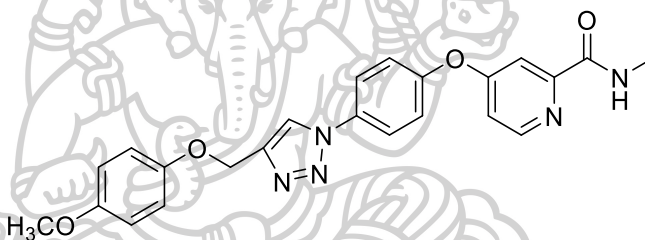
Synthesis of 4-(4-(4-((4-hydroxyphenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-*N*-methylpicolinamide (**20f**)



4-(4-((4-((*Tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**20d**) (441 mg, 0.98 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (185 mg, 1.08 mmol) and *t*-BuOK (215 mg, 1.92 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 17

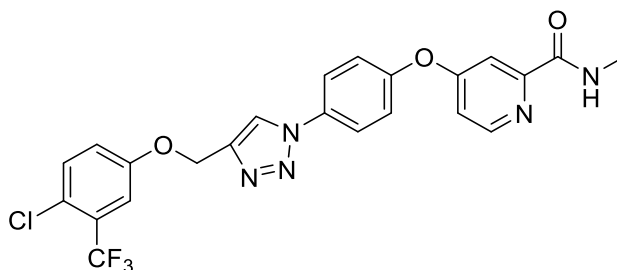
h. The crude product was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford **20f** (136 mg, 0.30 mmol, 31%) as white solid. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.78 (d, J = 4.8 Hz, 3H), 5.25 (s, 2H), 6.94 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.13 (dd, J = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.49 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.77 (m, 2H), 9.97 (br s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 26.0 (CH₃), 61.5 (CH₂), 108.6 (CH), 113.9 (CH), 116.1 (2CH), 116.4 (2CH), 122.1 (2CH), 122.3 (2CH), 122.9 (CH), 128.7 (C), 143.4 (C), 146.8 (C), 150.4 (C), 152.4 (C), 155.8 (C), 157.9 (C), 163.8 (CO), 166.2 (C) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for C₂₂H₁₉N₅O₄Na [M+Na]⁺ 440.1335, found 440.1338.

Synthesis of 4-(4-(4-(4-methoxyphenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-*N*-methylpicolinamide (21f)



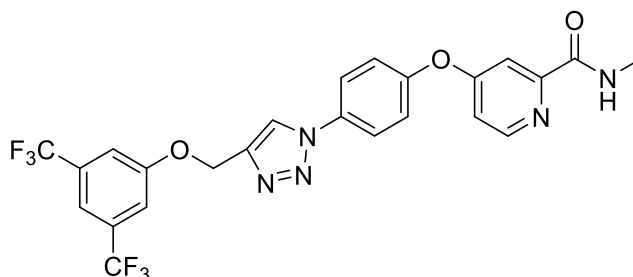
4-(4-(4-(4-Methoxyphenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**21d**) (265 mg, 1.34 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (139 mg, 1.27 mmol) and *t*-BuOK (165 mg, 1.47 mmol) K₂CO₃ (175 mg, 1.27 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 17 h. The crude product was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford **21f** (217 mg, 0.50 mmol, 62%) as a white solid. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.79 (d, J = 4.9 Hz, 3H), 3.69 (s, 3H), 1.57 (s, 2H), 6.86 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 7.00 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.24 (dd, J = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.47 (m, 3H), 8.03 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.56 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.82 (dq, J = 4.9 Hz, 1H), 8.93 (s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 26.2 (CH₃), 55.5 (CH₃), 61.7 (CH₂), 109.6 (CH), 114.8 (CH), 114.8 (2CH), 116.0 (2CH), 122.4 (2CH), 122.7 (2CH), 123.1 (CH), 134.2 (CH), 144.4 (C), 150.8 (C), 152.1 (C), 152.6 (C), 153.5 (C), 153.8 (C), 163.9 (CO), 165.3 (C) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for C₂₃H₂₂N₅O₄ [M+H]⁺ 432.1672, found 432.1673.

Synthesis of 4-(4-(4-((4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-N-methylpicolinamide (**22f**)



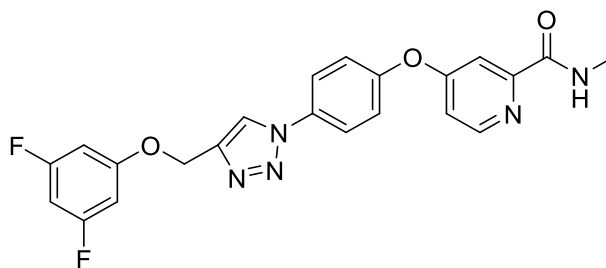
4-(4-((4-Chloro-3-(trifluoromethyl)phenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**22d**) (297 mg, 0.80 mmol), 4-chloro-N-methylpicolinamide (**1e**) (172 mg, 1.01 mmol) and *t*-BuOK (221 mg, 1.97 mmol) K_2CO_3 (286 mg, 2.07 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 20 h. The crude product was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford **22f** (146 mg, 0.29 mmol, 36%) as a nude solid. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.79 (d, J = 4.9 Hz, 3H), 5.38 (s, 2H), 7.26 (dd, J = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 9.0, 3.0 Hz, 1H), 7.51 (m, 4H), 7.67 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.56 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.81 (q, J = 4.9 Hz, 1H), 9.00 (s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 26.1 (CH₃), 61.8 (CH₂), 109.4 (CH), 120.6 (q, $^1J_{FC}$ = 266.8 Hz, CF₃), 114.7 (CH), 120.3 (CH), 122.0 (CH), 122.3 (2CH), 122.6 (2CH), 123.4 (CH), 127.3 (CH), 132.8 (CH), 134.0 (C), 143.3 (C), 150.6 (C), 152.5 (C), 153.4 (C), 156.8 (C), 158.3 (q, $^2J_{FC}$ = 37.0 Hz, C), 163.7 (CO), 165.2 (C) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -63.0 (s, 3F) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for C₂₃H₁₈ClF₃N₅O₃ [M+H]⁺ 504.1050, found 504.1045.

Synthesis of 4-(4-(4-((3,5-bis(trifluoromethyl)phenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-N-methylpicolinamide (**23f**)



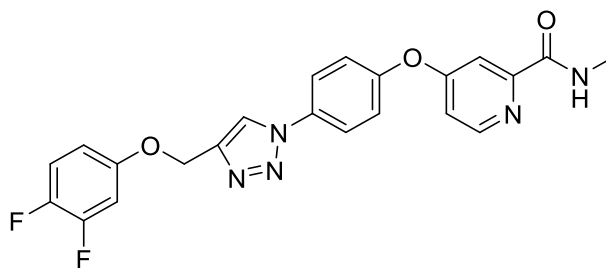
4-(4-((3,5-Bis(trifluoromethyl)phenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**23d**) (268 mg, 0.66 mmol), 4-chloro-N-methylpicolinamide (**1e**) (182 mg, 1.07 mmol) and *t*-BuOK (249 mg, 2.22 mmol) K_2CO_3 (277 mg, 2.00 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 16 h. The crude product was purified by column chromatography (50% EtOAc:*n*-hexane) to afford **23f** (221 mg, 0.41 mmol, 62%) as a white solid. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.80 (d, J = 4.9 Hz, 3H), 5.50 (s, 2H), 7.26 (dd, J = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 6.1, 3.3 Hz, 3H), 7.68 (s, 1H), 7.80 (s, 2H), 8.05 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.57 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.81 (q, J = 4.8 Hz, 1H), 9.03 (s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 26.1 (CH₃), 62.1 (CH₂), 109.5 (CH), 114.2 (m, CH), 114.7 (2CH), 116.1 (CH), 123.2 (q, $^1J_{FC}$ = 271.2 Hz, 2CF₃), 122.3 (2CH), 122.6 (2CH), 123.5 (CH), 131.6 (q, $^2J_{FC}$ = 32.8 Hz, 2C), 134.0 (CH), 143.1 (C), 150.6 (C), 152.6 (C), 153.5 (C), 159.0 (C), 163.7 (CO), 165.2 (C) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -63.0 (s, 6F) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for C₂₄H₁₈F₆N₅O₃ [M+H]⁺ 538.1314, found 538.1301.

Synthesis of 4-(4-(4-((3,5-difluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-N-methylpicolinamide (**24f**)



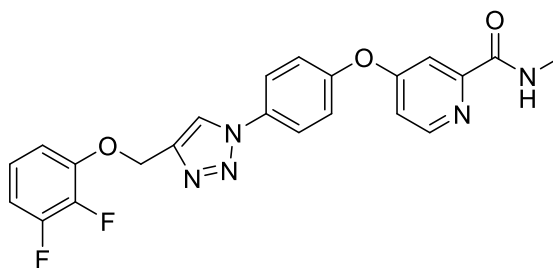
4-(4-((3,5-Difluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**24d**) (296 mg, 0.98 mmol), 4-chloro-N-methylpicolinamide (**1e**) (190 mg, 1.11 mmol) and *t*-BuOK (232 mg, 2.06 mmol) K_2CO_3 (255 mg, 1.85 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 19 h. The crude product was purified by column chromatography (30% EtOAc:*n*-hexane) to afford **24f** (178 mg, 0.41 mmol, 42%) as a white solid. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.79 (d, $J = 4.9$ Hz, 3H), 5.28 (s, 2H), 6.84 (m, 3H), 7.25 (dd, $J = 5.6, 2.9$ Hz, 1H), 7.48 (m, 3H), 8.03 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.56 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 8.82 (q, $J = 4.9$ Hz, 1H), 8.98 (s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 26.2 (CH₃), 61.9 (CH₂), 96.7 (t, $^2J_{FC} = 26.3$ Hz, CH), 99.2 (d, $^2J_{FC} = 28.5$ Hz, 2CH), 109.6 (CH), 114.8 (CH), 122.4 (2CH), 122.8 (2CH), 123.6 (CH), 134.1 (CH), 143.3 (C), 150.8 (C), 152.6 (C), 153.6 (C), 160.2 (t, $^3J_{FC} = 14.3$ Hz, C), 163.2 (dd, $^1J_{FC}, ^3J_{FC} = 242.3, 15.8$ Hz, 2CF), 163.9 (CO), 165.3 (C) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -110.7 (s, 2F) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for C₂₂H₁₇F₂N₅O₃Na [M+Na]⁺ 460.1197, found 460.1196.

Synthesis of 4-(4-(4-((3,4-difluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-*N*-methylpicolinamide (**25f**)



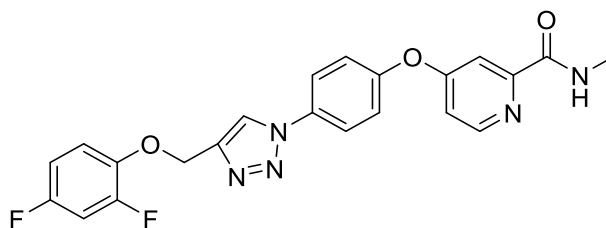
4-(4-((3,4-Difluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**25d**) (300 mg, 0.99 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (254 mg, 1.49 mmol) and *t*-BuOK (219 mg, 1.95 mmol) K_2CO_3 (260 mg, 1.88 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 18 h. The crude product was purified by column chromatography (30% EtOAc:*n*-hexane) to afford **25f** (136 mg, 0.31 mmol, 31%) as white solid. 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 2.80 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H), 5.26 (s, 2H), 6.93 (m, 1H), 7.25 (dd, $J = 19.4, 3.1$ Hz, 1H), 7.26 (dd, $J = 5.6, 2.6$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J = 19.7, 9.5$ Hz), 7.49 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 8.05 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 8.57 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 8.80 (q, $J = 4.8$ Hz, 1H), 8.99 (s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ 26.0 (CH_3), 61.9 (CH_2), 104.5 (d, $^2J_{FC} = 20.3$ Hz, CH), 109.4 (CH), 111.2 (dd, $^3J_{FC}, ^4J_{FC} = 5.3, 3.0$ Hz, CH), 114.6 (CH), 117.6 (d, $^2J_{FC} = 18.0$ Hz, CH), 122.2 (2CH), 122.6 (2CH), 123.3 (CH), 134.0 (CH), 144.2 (dd, $^1J_{FC}, ^2J_{FC} = 236.3, 12.8$ Hz, CF), 143.4 (C), 149.6 (dd, $^1J_{FC}, ^2J_{FC} = 243.0, 13.5$ Hz, CF), 150.6 (C), 152.6 (C), 153.4 (C), 154.6 (d, $^3J_{FC} = 9.0$ Hz, C), 163.7 (CO), 165.1 (C) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, $DMSO-d_6$) δ -164.0 (d, $J_{FF} = 22.6$ Hz, 1F), -138.3 (d, $J_{FF} = 22.6$ Hz, 1F) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for $C_{22}H_{18}F_2N_5O_3$ $[M+H]^+$ 438.1378, found 438.1379.

Synthesis of 4-(4-(4-((2,3-difluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-*N*-methylpicolinamide (**26f**)



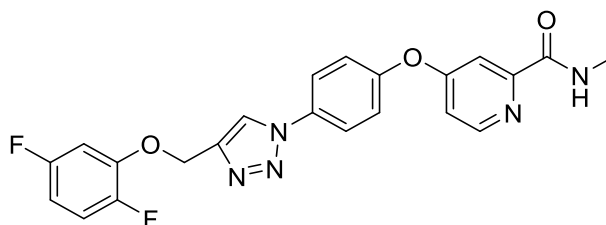
4-(4-((2,3-Difluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**26d**) (297 mg, 0.98 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (177 mg, 1.03 mmol) and *t*-BuOK (233 mg, 2.08 mmol) K_2CO_3 (326 mg, 2.36 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 17 h. The crude product was purified by column chromatography (30% EtOAc:*n*-hexane) to afford **26f** (77.8 mg, 0.18 mmol, 18%) as a white solid. 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 2.78 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H), 5.39 (s, 2H), 7.04 (dd, $J = 17.0, 8.5$ Hz, 1H), 7.23 (m, 3H), 7.49 (m, 3H), 8.06 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 8.56 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 8.80 (q, $J = 4.7$ Hz, 1H), 9.03 (s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ 26.0 (CH_3), 62.4 (CH_2), 109.4 (d, $^3J_{FC} = 5.3$ Hz, CH), 109.6 (CH), 111.1 (CH), 114.6 (CH), 122.2 (2CH), 122.6 (2CH), 123.5 (CH), 124.2 (dd, $^3J_{FC}, ^4J_{FC} = 9.0, 5.3$ Hz, CH), 134.0 (CH), 140.3 (dd, $^1J_{FC}, ^2J_{FC} = 243.8, 15.0$ Hz, CF), 143.1 (C), 147.4 (d, $^3J_{FC} = 4.5$ Hz, C), 150.5 (dd, $^1J_{FC}, ^2J_{FC} = 243.0, 10.5$ Hz, CF), 150.6 (C), 152.6 (C), 153.4 (C), 163.7 (CO), 165.1 (C) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, $DMSO-d_6$) δ -140.2 (s, 1F), -140.3 (s, 1F) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for $C_{22}H_{17}F_2N_5O_3Na$ $[M+Na]^+$ 460.1197, found 460.1195.

Synthesis of 4-(4-(4-((2,4-difluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-*N*-methylpicolinamide (**27f**)



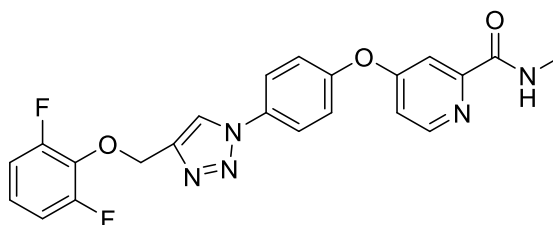
4-(4-((2,4-Difluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**27d**) (229.2 mg, 0.76 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (194 mg, 1.14 mmol) and *t*-BuOK (220 mg, 1.96 mmol) K_2CO_3 (282 mg, 2.04 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 17 h. The crude product was purified by column chromatography (30% EtOAc:*n*-hexane) to afford **27f** (136 mg, 0.30 mmol, 31%) as white solid. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.79 (d, J = 4.8 Hz, 3H), 5.30 (s, 1H), 7.03 (m, 1H), 7.28 (m, 2H), 7.41 (m, 1H), 7.47 (m, 3H), 8.03 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.80 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.80 (q, J = 4.7 Hz, 1H), 8.95 (s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 26.2 (CH₃), 62.7 (CH₂), 105.0 (d, $^2J_{FC}$ = 27.0, 21.8 Hz, CH), 109.6 (CH), 111.1 (dd, $^2J_{FC}$, $^4J_{FC}$ = 22.5, 3.8 Hz, CH), 114.8 (CH), 116.8 (d, $^3J_{FC}$ = 9.0 Hz, CH), 122.4 (2CH), 123.5 (2CH), 134.1 (CH), 142.6 (dd, $^2J_{FC}$, $^4J_{FC}$ = 10.5, 3.0 Hz, CH), 143.5 (CH), 152.3 (dd, $^1J_{FC}$, $^3J_{FC}$ = 245.3, 12.8 Hz, CF), 150.8 (C), 152.6 (C), 153.5 (C), 156.1 (d, $^1J_{FC}$, $^3J_{FC}$ = 238.5, 10.5 Hz, CF), 157.7 (d, $^2J_{FC}$ = 36.5 Hz, C) 164.0 (O), 165.3 (C) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -121.4 (d, J_{FF} = 2.7 Hz, 1F), -131.3 (d, J_{FF} = 2.7 Hz, 1F) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for C₂₂H₁₈F₂N₅O₃ [M+H]⁺ 438.1378, found 438.1376.

Synthesis of 4-(4-(4-((2,5-difluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-*N*-methylpicolinamide (**28f**)



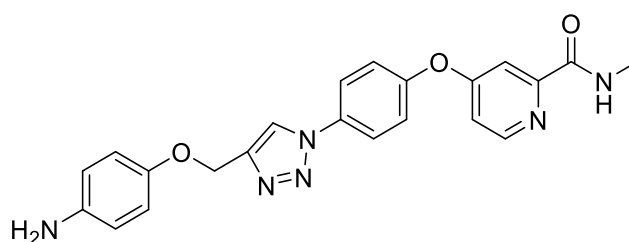
4-(4-((2,5-Difluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**28d**) (298 mg, 0.98 mmol), 4-chloro-*N*-methylpicolinamide (**1e**) (208 mg, 1.22 mmol) and *t*-BuOK (225 mg, 2.01 mmol) K_2CO_3 (266 mg, 1.93 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 17 h. The crude product was purified by column chromatography (30% EtOAc:*n*-hexane) to afford **28f** (218 mg, 0.50 mmol, 51%) as a white solid. 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 2.79 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H), 5.36 (s, 2H), 6.81 (tt, $J = 8.5, 3.1$ Hz, 1H), 7.25 (dd, $J = 5.7, 2.7$ Hz, 1H), 7.29 (m, 1H), 7.39 (m, 1H), 7.49 (m, 2H), 8.06 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 8.56 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 8.80 (q, $J = 4.7$ Hz, 1H), 9.03 (s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ 26.0 (CH_3), 62.2 (CH_2), 103.5 (d, $^2J_{FC} = 27.8$ Hz, CH), 107.0 (dd, $^2J_{FC}, ^3J_{FC} = 23.3, 6.8$ Hz, CH), 109.4 (CH), 114.6 (CH), 116.5 (dd, $^2J_{FC}, ^3J_{FC} = 20.3, 19.5$ Hz, CH), 122.2 (2CH), 122.6 (2CH), 123.5 (CH), 134.0 (CH), 143.0 (CH), 148.2 (dd, $^1J_{FC}, ^4J_{FC} = 238.5, 2.8$ Hz, CF), 150.7 (C), 152.6 (C), 153.4 (C), 158.2 (dd, $^1J_{FC}, ^4J_{FC} = 236.3, 2.6$ Hz, CF), 163.0 (C), 163.7 (CO), 165.1 (C) ppm.; ^{19}F NMR (282 MHz, $DMSO-d_6$) δ -117.9 (d, $J_{FF} = 15.3$ Hz, 1F), -141.6 (d, $J_{FF} = 15.3$ Hz, 1F) ppm.; HRMS (ESI+) m/z : calcd for $C_{22}H_{17}F_2N_5O_3Na$ $[M+Na]^+$ 460.1197, found 460.1194.

Synthesis of 4-(4-(4-((2,6-difluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-N-methylpicolinamide (**29f**)



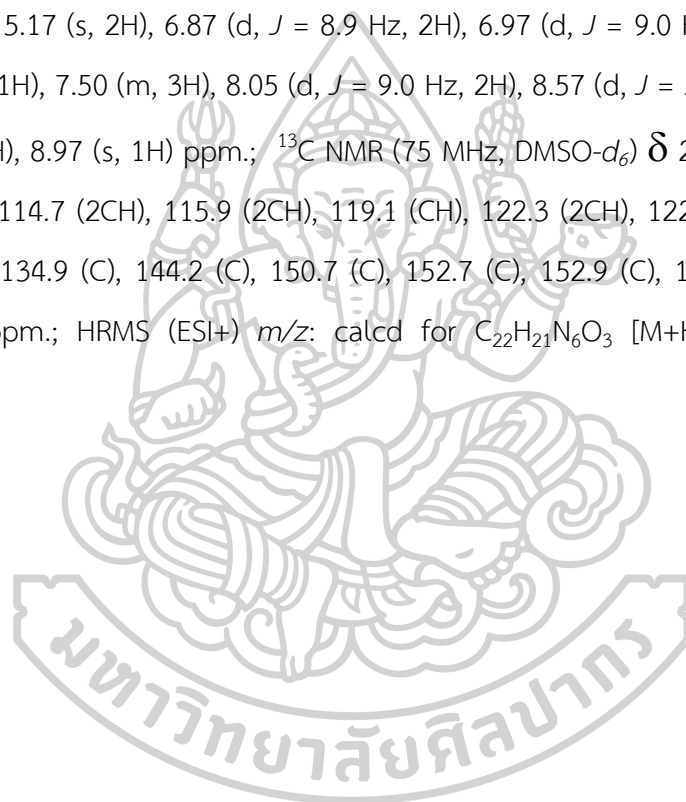
4-(4-((2,6-Difluorophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenol (**29d**) (307 mg, 1.01 mmol), 4-chloro-N-methylpicolinamide (**1e**) (216 mg, 1.27 mmol) and *t*-BuOK (217 mg, 1.93 mmol) K₂CO₃ (256 mg, 1.85 mmol) in dried DMF (10 mL) was reacted for 17 h. The crude product was purified by column chromatography (30% EtOAc:*n*-hexane) to afford **29f** (271 mg, 0.62 mmol, 61%) as white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.80 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H), 5.30 (s, 2H), 7.16 (m, 3H), 7.25 (dd, *J* = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.48 (m, 3H), 8.04 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.56 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.80 (q, *J* = 4.8 Hz, 1H), 9.00 (s, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 26.0 (CH₃), 66.4 (t, ⁴*J*_{FC} = 2.9 Hz, CH₂), 109.9 (CH), 112.6 (d, ²*J*_{FC} = 22.5 Hz, 2CH), 112.5 (d, ³*J*_{FC} = 9.0 Hz, CH), 114.6, 122.3 (2CH), 122.4 (2CH), 123.4 (CH), 124.3 (t, ³*J*_{FC} = 9.4 Hz, 2CH), 133.9 (CH), 143.3 (CH), 150.6 (C), 153.0 (d, ²*J*_{FC} = 55.8 Hz, C), 154.1 (d, ²*J*_{FC} = 5.4 Hz, C) 155.7 (dd, ¹*J*_{FC}, ³*J*_{FC} = 245.3, 5.3 Hz, 2CF), 163.7 (CO), 165.1 (C) ppm.; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -130.1 (s, 2F) ppm.; HRMS (ESI+) *m/z*: calcd for C₂₂H₁₇F₂N₅O₃Na [M+Na]⁺ 460.1197, found 460.1199.

Synthesis of 4-(4-(4-((4-aminophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)-N-methylpicolinamide (**30f**)



To a stirred solution of *N*-methyl-4-(4-(4-((4-nitrophenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)picolinamide (**8f**) (210 mg, 0.47 mmol) in THF and MeOH (1.7: 0.6 mL) was

added NaBH₄ (213 mg, 5.63 mmol) and NiCl₂·5H₂O (17.7 mg, 0.075 mmol) at -5°C, respectively. The reaction mixture was stirred for 2 hours and filtered to remove the catalyst. The filtrate was partitioned between water (20 mL) and EtOAc (20 mL) followed by extracted with EtOAc (3x20 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to provide crude product, which was purified by column chromatography (70% EtOAc:*n*-hexane) given **30f** (151 mg, 0.36 mmol, 77 %) as a brown solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.80 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H), 5.17 (s, 2H), 6.87 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.27 (dd, *J* = 5.6, 2.6 Hz, 1H), 7.50 (m, 3H), 8.05 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.57 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 8.82 (q, *J* = 5.0 Hz, 1H), 8.97 (s, 1H) ppm.; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 26.1 (CH₃), 61.6 (CH₂), 109.4 (CH), 114.7 (2CH), 115.9 (2CH), 119.1 (CH), 122.3 (2CH), 122.5 (2CH), 123.0 (CH), 134.1 (CH), 134.9 (C), 144.2 (C), 150.7 (C), 152.7 (C), 152.9 (C), 153.4 (C), 163.8 (CO), 165.2 (C) ppm.; HRMS (ESI+) *m/z*: calcd for C₂₂H₂₁N₆O₃ [M+H]⁺ 417.1675, found 417.1664.



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

อนุพันธ์ของโซราฟินิบที่ถูกแทนที่หมู่ Aryl Urea ด้วย 1,2,3-triazole ที่เชื่อมต่อกับ Substituted phenoxy ทั้ง 30 โมเลกุลถูกสังเคราะห์ผ่านปฏิกิริยา Huisgen 1,3-cycloaddition (Click Reaction) และทำการทดสอบ Cytotoxicity ด้วย MTT assay กับเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และ Huh7 พบว่า โมเลกุลส่วนใหญ่ไม่มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$) และในส่วนของโมเลกุลที่มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ ($IC_{50} < 100 \mu\text{M}$) มีหมู่แทนที่บน phenoxy ring ที่ต่อกับ 1,2,3-triazole ดังนี้ *p*-F, *p*-NO₂, *p*-tert-butyl, *p*-CF₃, *p*-OH, *o*-NO₂, *m*-tert-butyl โดยสารทุกตัวมีความ selective กับ Huh7 มากกว่า HepG2 สำหรับการศึกษาผลของตำแหน่งของหมู่แทนที่พบว่าหมู่แทนที่ที่ดีที่สุดที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับคือ หมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง *para* และการมี Fluorine atom อยู่ภายในโมเลกุลมีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ แต่อย่างไรก็ตามการที่มีจำนวน Fluorine atom เพิ่มขึ้น นอกจากไม่สามารถเพิ่มความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับได้แล้วยังลดประสิทธิภาพของสารกลุ่มนี้ด้วย ยิ่งไปกว่านั้นการแทนที่หมู่ Aryl Urea ด้วย 1,2,3-triazole ที่เชื่อมต่อกับ Substituted phenoxy ring ที่มีหมู่แทนที่เป็น 3-CF₃, 4-Cl คล้ายกับ Sorafenib ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับได้ (**22f**; HepG2 และ Huh7 มีค่า $IC_{50} > 300 \mu\text{M}$) และหมู่แทนที่ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเซลล์มะเร็งตับได้จะต้องเป็นหมู่แทนที่ที่ให้และรับอิเล็กตรอนอ่อนๆ รวมถึง Nitro และ Hydroxy groups ส่วนโมเลกุลที่มี Hydrophobicity (**11f**) มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับชนิด Huh7 ได้ดีที่สุดอีกด้วย จากผลการทดสอบข้างต้นทั้งหมดพบว่าโมเลกุลที่ดีที่สุดคือโมเลกุลที่มีหมู่แทนที่เป็น *para*-tert-butyl (**11f**; $IC_{50} = 5.67 \mu\text{M}$) จากการศึกษา Molecular Docking ระหว่าง B-raf และ **11f** พบว่า โมเลกุลที่ได้รับการคัดเลือกมีค่า Binding energy สูงกว่าโซราฟินิบเล็กน้อยและสามารถเกิด Hydrogen bond ได้เพียง 1 ตำแหน่งในขณะที่โซราฟินิบสามารถเกิด Hydrogen bond ได้ถึง 2 ตำแหน่ง

จากผลการศึกษา Toxicity พบว่าสารหมายเลข **11f** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HEK 293 น้อยกว่าโซราฟินิบ (โซราฟินิบ; $IC_{50} = 2.442 \mu\text{M}$, **11f**; $IC_{50} = 3.619 \mu\text{M}$) แต่เมื่อคำนวณค่า Selectivity Index แล้วยังคงพบว่าโซราฟินิบมีค่า Selectivity Index (SI) ที่ดีกว่า (โซราฟินิบ; SI = 0.8334, **11f**, SI = 0.6388) โมเลกุลดังกล่าว สำหรับการศึกษา Cell migration ของ **11f** พบว่าเมื่อ

ความเข้มข้นและเวลาเพิ่มขึ้น สามารถยับยั้งการเกิด Cell Migration ได้มากขึ้น และในทำนองเดียวกันนี้การทดสอบ Cell Proliferation ของสารดังกล่าวสามารถสรุปผลได้ว่าเมื่อความเข้มข้นและเวลาเพิ่มขึ้น การเกิด Cell Proliferation จะลดลง แต่อย่างไรก็ตามสารหมายเลข **11f** นี้ยังมีความสามารถในการยับยั้ง Cell Migration และ Cell Proliferation ได้น้อยกว่าโซราฟินิบอย่างชัดเจน

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าการแทนที่ตำแหน่ง Aryl Urea ของโซราฟินิบด้วย 1,2,3-triazole ที่เชื่อมต่อกับ Substituted phenoxy ring ยังคงมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ แต่อย่างไรก็ตามจะต้องมีตำแหน่งและหมู่แทนที่ที่เหมาะสม โดยในงานวิจัยนี้ โมเลกุล **11f** เป็นโมเลกุลที่ดีที่สุดที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แต่น้อยกว่าโซราฟินิบและเนื่องจากสารกลุ่มนี้เป็น multikinase inhibitor จึงมีแนวโน้มที่จะสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งอื่นๆ ได้





รายการอ้างอิง

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A., Global cancer statistics 2018 : GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 2018, 68 (6), 394-424.
2. Parkin, D. M.; Bray, F.; Ferlay, J.; Pisani, P., Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians* 2005, 55 (2), 74-108.
3. Cullen, J.; Elsamanoudi, S.; Brassell, S. A.; Chen, Y.; Colombo, M.; Srivastava, A.; McLeod, D. G., The burden of prostate cancer in Asian nations. *Journal of carcinogenesis* 2012, 11, 7.
4. Organization, W. H. Estimated number of causes in 2018, all cancers, both sexes, all ages. [http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=population&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_globocon_id=.](http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=population&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_globocon_id=)
5. Rapp, K.; Schroeder, J.; Klenk, J.; Stoehr, S.; Ulmer, H.; Concin, H.; Diem, G.; Oberaigner, W.; Weiland, S., Obesity and incidence of cancer: a large cohort study of over 145 000 adults in Austria. *British journal of cancer* 2005, 93 (9), 1062.
6. Steinmetz, K. A.; Potter, J. D., Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control* 1991, 2 (5), 325-357.
7. Adami, H. O.; Hsing, A. W.; McLaughlin, J. K.; Trichopoulos, D.; Hacker, D.; Ekblom, A.; Persson, I., Alcoholism and liver cirrhosis in the etiology of primary liver cancer. *International journal of cancer* 1992, 51 (6), 898-902.
8. Siegel, R. L.; Jacobs, E. J.; Newton, C. C.; Feskanich, D.; Freedman, N. D.; Prentice, R. L.; Jemal, A., Deaths due to cigarette smoking for 12 smoking-related cancers in the United States. *JAMA internal medicine* 2015, 175 (9), 1574-1576.

9. Chuang, S.-C.; La Vecchia, C.; Boffetta, P., Liver cancer: descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection. *Cancer letters* 2009, 286 (1), 9-14.
10. Buckley, M. F.; Sweeney, K.; Hamilton, J.; Sini, R.; Manning, D.; Nicholson, R.; DeFazio, A.; Watts, C.; Musgrove, E.; Sutherland, R., Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene* 1993, 8 (8), 2127-2133.
11. Moon, W. S.; Rhyu, K. H.; Kang, M. J.; Lee, D. G.; Yu, H. C.; Yeum, J. H.; Koh, G. Y.; Tarnawski, A. S., Overexpression of VEGF and angiopoietin 2 : a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma? *Mod Pathol* 2003, 16 (6), 552-7.
12. Calvisi, D. F.; Ladu, S.; Gorden, A.; Farina, M.; Conner, E. A.; Lee, J. S.; Factor, V. M.; Thorgeirsson, S. S., Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 2006, 130 (4), 1117-1128.
13. Daher, S.; Massarwa, M.; Benson, A. A.; Khoury, T., Current and future treatment of hepatocellular carcinoma: an updated comprehensive review. *Journal of clinical translational hepatology* 2018, 6 (1), 69.
14. Hira, E.; Ono, T.; Dhar, D. K.; El-Assal, O. N.; Hishikawa, Y.; Yamanoi, A.; Nagasue, N., Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2005, 103 (3), 588-98.
15. Mannion, M.; Raepfel, S.; Claridge, S.; Zhou, N.; Saavedra, O.; Isakovic, L.; Zhan, L.; Gaudette, F.; Raepfel, F.; Deziel, R.; Beaulieu, N.; Nguyen, H.; Chute, I.; Beaulieu, C.; Dupont, I.; Robert, M. F.; Lefebvre, S.; Dubay, M.; Rahil, J.; Wang, J.; Ste-Croix, H.; Robert Macleod, A.; Besterman, J. M.; Vaisburg, A., N-(4-(6,7-Disubstituted-quinolin-4-yloxy)-3-fluorophenyl)-2-oxo-3-phenylimidazolidine-1-carboxamides: a novel series of dual c-Met/VEGFR2 receptor tyrosine kinase inhibitors. *Bioorganic medicinal chemistry letters* 2009, 19 (23), 6552-6.
16. Michl, P.; Pauls, S.; Gress, T. M., Evidence-based diagnosis and staging of pancreatic cancer. *Best practice research Clinical gastroenterology* 2006, 20 (2), 227-51.
17. Zhang, Z.; Niu, B.; Chen, J.; He, X.; Bao, X.; Zhu, J.; Yu, H.; Li, Y., The use of lipid-coated nanodiamond to improve bioavailability and efficacy of sorafenib in resisting metastasis of gastric cancer. *Biomaterials* 2014, 35 (15), 4565-4572.
18. INSTITUTE, E. W. C. Cancer Development. <https://www.cancerquest.org/cancer->

[biology/cancer-development.](#)

19. Llovet, J. M.; Ricci, S.; Mazzaferro, V.; Hilgard, P.; Gane, E.; Blanc, J. F.; de Oliveira, A. C.; Santoro, A.; Raoul, J. L.; Forner, A.; Schwartz, M.; Porta, C.; Zeuzem, S.; Bolondi, L.; Greten, T. F.; Galle, P. R.; Seitz, J. F.; Borbath, I.; Haussinger, D.; Giannaris, T.; Shan, M.; Moscovici, M.; Voliotis, D.; Bruix, J.; Group, S. I. S., Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England journal of medicine* 2008, 359 (4), 378-90.
20. Chen, H.; Manyak, D.; Carlson, P.; Wang, F.; Liu, M., Drug discovery method and apparatus. Google Patents: 2004.
21. Toaldo, M. B.; Salvatore, V.; Marinelli, S.; Palamà, C.; Milazzo, M.; Croci, L.; Venerandi, L.; Cipone, M.; Bolondi, L.; Piscaglia, F., Use of VEGFR-2 targeted ultrasound contrast agent for the early evaluation of response to sorafenib in a mouse model of hepatocellular carcinoma. *Molecular Imaging Biology* 2015, 17 (1), 29-37.
22. Wilhelm, S.; Carter, C.; Lynch, M.; Lowinger, T.; Dumas, J.; Smith, R. A.; Schwartz, B.; Simantov, R.; Kelley, S., Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nature reviews Drug discovery* 2006, 5 (10), 835.
23. Sorafenib Bioavailability. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00398>.
24. 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.
25. Wood, L. S., Management of vascular endothelial growth factor and multikinase inhibitor side effects. *Clinical journal of oncology nursing* 2009, 13.
26. Chou, J.-W.; Cheng, K.-S.; Huang, C.-W., Sorafenib-induced acute pancreatitis: a case report and review of the literature. *Internal Medicine* 2016, 55 (6), 623-627.
27. Garcia, J. A.; Rini, B. I., Recent progress in the management of advanced renal cell carcinoma. *CA: a cancer journal for clinicians* 2007, 57 (2), 112-125.
28. Haider, S.; Alam, M. S.; Hamid, H., 1, 2, 3-Triazoles: scaffold with medicinal significance. *Inflamm Cell Signal* 2014, 1, e95.
29. Aher, N. G.; Pore, V. S.; Mishra, N. N.; Kumar, A.; Shukla, P. K.; Sharma, A.;

Bhat, M. K., Synthesis and antifungal activity of 1,2,3-triazole containing fluconazole analogues. *Bioorganic and medicinal chemistry letters* 2009, 19 (3), 759-63.

30. Raven, P. H., *Biology*. ninth edition ed.; The McGraw-Hill companies, Inc.: New York 2011.

31. protocol, H. l. h. c. c. a. t. HepG2 in Cell Culture. <http://www.hepg2.com/>.

32. cell, H. C. Huh-7 cell line. <https://huh7.com/>.

33. Wan, P. T.; Garnett, M. J.; Roe, S. M.; Lee, S.; Niculescu-Duvaz, D.; Good, V. M.; Project, C. G.; Jones, C. M.; Marshall, C. J.; Springer, C. J., Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell cycle* 2004, 116 (6), 855-867.

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

35. Bruix, J.; Tak, W.-Y.; Gasbarrini, A.; Santoro, A.; Colombo, M.; Lim, H.-Y.; Mazzaferro, V.; Wiest, R.; Reig, M.; Wagner, A., Regorafenib as second-line therapy for intermediate or advanced hepatocellular carcinoma: multicentre, open-label, phase II safety study. *European journal of cancer* 2013, 49 (16), 3412-3419.

36. Heo, Y. A.; Syed, Y. Y., Regorafenib: A Review in Hepatocellular Carcinoma. *Drugs* 2018, 78 (9), 951-958.

37. Personeni, N.; Pressiani, T.; Santoro, A.; Rimassa, L., Regorafenib in hepatocellular carcinoma: latest evidence and clinical implications. *Drugs in context* 2018, 7.

38. Cervello, M.; Bachvarov, D.; Lampiasi, N.; Cusimano, A.; Azzolina, A.; McCubrey, J. A.; Montalto, G., Molecular mechanisms of sorafenib action in liver cancer cells. *Cell cycle* 2012, 11 (15), 2843-2855.

39. Zhang, T.; Ding, X.; Wei, D.; Cheng, P.; Su, X.; Liu, H.; Wang, D.; Gao, H., Sorafenib improves the survival of patients with advanced hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of randomized trials. *Anti-cancer drugs* 2010, 21 (3), 326-332.

40. 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.

41. 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.
42. Liu, Z.; Wang, Y.; Lin, H.; Zuo, D.; Wang, L.; Zhao, Y.; Gong, P., Design, synthesis and biological evaluation of novel thieno [3, 2-d] pyrimidine derivatives containing diaryl urea moiety as potent antitumor agents. *European journal of medicinal chemistry* 2014, 85, 215-227.
43. 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.
44. 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.
45. Musumeci, F.; Radi, M.; Brullo, C.; Schenone, S., Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors: drugs and new inhibitors. *J Med Chem* 2012, 55 (24), 10797-822.
46. Lorusso, L.; Pieruzzi, L.; Biagini, A.; Sabini, E.; Valerio, L.; Giani, C.; Passannanti, P.; Pontillo-Contillo, B.; Battaglia, V.; Mazzeo, S.; Molinaro, E.; Elisei, R., Lenvatinib and other tyrosine kinase inhibitors for the treatment of radioiodine refractory, advanced, and progressive thyroid cancer. *Oncotargets therapy* 2016, 9, 6467-6477.
47. Hepgur, M.; Sadeghi, S.; Dorff, T. B.; Quinn, D. I., Tivozanib in the treatment of renal cell carcinoma. *Biologics* 2013, 7, 139-48.
48. Martins, P.; Jesus, J.; Santos, S.; Raposo, L.; Roma-Rodrigues, C.; Baptista, P.; Fernandes, A., Heterocyclic anticancer compounds: recent advances and the paradigm shift towards the use of nanomedicine's tool box. *Molecules* 2015, 20 (9), 16852-16891.
49. Vitaku, E.; Smith, D. T.; Njardarson, J. T., Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among US FDA approved pharmaceuticals: miniperspective. *Journal of medicinal chemistry* 2014, 57 (24), 10257-10274.
50. Lee, K.; Jeong, K.-W.; Lee, Y.; Song, J. Y.; Kim, M. S.; Lee, G. S.; Kim, Y.,

Pharmacophore modeling and virtual screening studies for new VEGFR-2 kinase inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* 2010, 45 (11), 5420-5427.

51. Zhang, Q.; Wang, J.; Wang, F.; Chen, X.; He, Y.; You, Q.; Zhou, H., Identification of type II inhibitors targeting BRAF using privileged pharmacophores. *Chemical biology drug design* 2014, 83 (1), 27-36.

52. Alam; Parvez Chaturvedi; Sumit Kumar Anwar; Tamanna Siddiqi; Mohammad Khursheed Ajmal; Mohd Rehan Badr; Gamal Mahmoud; Mohamed H Khan; Hasan, R., Biophysical and molecular docking insight into the interaction of cytosine β -D arabinofuranoside with human serum albumin. *Journal of Luminescence* 2015, 164, 123-130.

53. Yan, S.-J.; Liu, Y.-J.; Chen, Y.-L.; Liu, L.; Lin, J., An efficient one-pot synthesis of heterocycle-fused 1, 2, 3-triazole derivatives as anti-cancer agents. *Bioorganic medicinal chemistry letters* 2010, 20 (17), 5225-5228.

54. Ye, W.; Yao, Q.; Yu, S.; Gong, P.; Qin, M., Synthesis and Antitumor Activity of Triazole-Containing Sorafenib Analogs. *Molecules* 2017, 22 (10), 1759.

55. 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.

56. Wang, Y.-y.; Liu, J.-z.; Yu, X.-y.; Yang, D.-z.; Zhang, L.-n.; Zhao, G.-s., Design and synthesis of hydrazine and oxadiazole-containing derivatives of Sorafenib as antitumor agents. *Chemical Research in Chinese Universities* 2013, 29 (3), 454-459.

57. HEK293 Cell Line. <http://www.hek293.com>.

58. Kee, N.; Sivalingam, S.; Boonstra, R.; Wojtowicz, J., The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *Journal of neuroscience methods* 2002, 115 (1), 97-105.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ศรินทร์ญา ปาลคเชนทร์
วัน เดือน ปี เกิด	26 พฤษภาคม 2536
สถานที่เกิด	สุราษฎร์ธานี
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต(เคมี) เกียรตินิยมอันดับ 2 กำลังศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(เคมี)
ที่อยู่ปัจจุบัน	151 หมู่ที่ 6 ตำบลถ้ำสิงขร อำเภอคีรีรัฐนิคม จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84180
ผลงานตีพิมพ์	Publication -Suttisintong, K., Palakhachane, S., Athipornchai, A., Pimtong, W.,& Limpachayaporn, P. (2018). Synthesis and Evaluation of Anti-Tyrosinase Activity of Phenyl Benzyl Ether Derivatives: Effects of functional Groups and Their Positions. Science, Engineering and Health Studies (FORMER NAME" SILPAKORN UNIVERSITY SCIENCE AND TECHNOLOGY JOURNAL"), 12(2), 111-123. Oral presentation -“Synthesis and Evaluation of Antityrosinase Activity of Phenyl Benzyl Ether Derivatives in Zebrafish Embryos”. The 11th Conference on Science and Technology for Youths on 10-11 June 2016 at BITEC, Bangkok, Thailand Poster presentations -“Synthesis and Evaluation of Antityrosinase Activity of Phenyl Benzyl Ether Derivatives in Zebrafish Embryos”. The 11th Conference on Science and Technology for Youths on 10-11 June 2016 at BITEC, Bangkok, Thailand. -“Synthesis and Evaluation of Tyrosinase Inhibitory Activity of Phenyl Benzyl Ether Derivatives”. Pure and Applied Chemistry International Conference 2016 (PACCON 2016) on 9-11 February

2016 at BITEC, Bangkok, Thailand.

-“Synthesis and Tyrosinase Activity of Various Phenyl Benzyl Ether Analogues”. Pure and Applied Chemistry International Conference 2015 (PACCON2015) on 21-23 January 2015 at BITEC, Bangkok, Thailand.

รางวัลที่ได้รับ

Scholarships and Academic Achievements

2012 to present

Development and Promotion of Science and Technology

Talents Project (DPST)

2015

Young Scientist and Technologist Program (YSTP)

2014

Have been selected for POSN SCIENCE CAMP 2014

