

เส้นทางการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบชนิดใหม่ ที่มีวง 1,2,3-ไตรเอโซล และฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

The Synthetic Pathways of a New 1,2,3-Triazole-Containing Sorafenib Analogue and Its Cytotoxicity towards Cancer Cell Lines

โยธิน มาตะโก¹ คมสันต์ สุทธิสินทอง² จุฑาทิพ บุญสมบัติ³ จิตนภา ศิริรักษ์¹ และ ภาณุพันธ์ ลิ้มปชยาพร^{1*}

Yotin Matakko¹, Khomson Suttisingtong², Jutatip Boonsombat³, Jitnapa Sirirak¹ and Panupun
Limpachayaporn^{1*}

Received: 4 October 2019, Revised: 2 March 2020, Accepted: 19 March 2020

บทคัดย่อ

ซอราเฟนิบ (1) เป็นยารักษามะเร็งแบบจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งชนิดแรกที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกาให้ใช้รักษามะเร็งตับ มะเร็งไต และมะเร็งต่อมไทรอยด์ โดยซอราเฟนิบมีการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไคเนสหลายชนิด ส่งผลให้สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลากหลาย แต่ซอราเฟนิบมีผลข้างเคียงและข้อเสียทางเภสัชหลายประการ จึงมีนักวิจัยจำนวนมากสนใจออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบเพื่อแก้ปัญหาและค้นหาฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งต่างๆ งานวิจัยนี้เสนอเส้นทางที่ประสบความสำเร็จ 2 เส้นทางในการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ 2 ที่หมู่ฟิโคลินาไม่ถูกแทนที่ด้วยวง 1,2,3-ไตรเอโซลที่ต่อกับวงเบนซิล และทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง โดยเส้นทางแรกจะเริ่มจากการสังเคราะห์วง 1,2,3-ไตรเอโซลก่อนด้วยปฏิกิริยาคลิก แล้วตามด้วยการสร้างเอริลยูเรีย ซึ่งเหมาะสำหรับการสังเคราะห์ชุดโมเลกุลเลียนแบบ 14 ที่มีการเติมหมู่แทนที่

¹ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร เลขที่ 6 ถนนราชมรรคาใน ตำบลพระปฐมเจดีย์ อำเภอเมืองนครปฐม จังหวัดนครปฐม 73000

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, 6 Ratchamankha Nai Road, Phraphom Chedi, Mueang, Nakhon Pathom 73000, Thailand.

² ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (NANOTEC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) เลขที่ 111 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

² National Nanotechnology Center (NANOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 111 Thailand Science Park, Phahon Yothin Road, Klong Nueng, Klong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand.

³ ห้องปฏิบัติการผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ เลขที่ 54 ถนนกำแพงเพชร 6 แขวงตลาดบางเขน เขตหลักสี่ กรุงเทพมหานคร 10210

³ Laboratory of Natural Products, Chulabhorn Research Institute, 54 Kamphaeng Phet 6 Road, Talat Bang Khen, Laksi, Bangkok 10210, Thailand.

* ผู้รับผิดชอบประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): panupun.lim@gmail.com, limpachayaporn_p@silpakorn.edu
Tel: 0 3425 5797

ต่างๆ บนวงเอริล และเส้นทางที่สองทำได้โดยการสร้างยูเรียเพื่อเชื่อมต่อกับเอริลก่อน แล้วจึงสร้างวง 1,2,3-ไตรเอโซล ซึ่งเหมาะกับการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบ **2** และชุดโมเลกุลเลียนแบบ **15** ซึ่งมีหมู่แทนที่ต่างๆ กันบนวงเบนซิล จากการทดสอบด้วยเอ็มทีที (MTT assay) พบว่าโมเลกุลเลียนแบบ **2** ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดลิมโฟบลาสต์ (MOLT-3) เซลล์มะเร็งปอด (A549) และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (HuCCA-1) โดยมีค่า $IC_{50} > 100 \mu M$ แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลจากงานวิจัยนี้เสนอเป็นแนวทางสำคัญที่ใช้ในการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่มีวงไตรเอโซลที่มีหมู่แทนที่ต่างๆ บนวงเอริลที่ติดกับยูเรียและวงเบนซิลที่ต่อกับไตรเอโซล เพื่อพัฒนาให้เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ และเซลล์มะเร็งตับที่มีฤทธิ์สูงขึ้นต่อไป

คำสำคัญ: โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ, 1,2,3-ไตรเอโซล, ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง, สารยับยั้งเอนไซม์ไคเนส, ปฏิกริยาคลิก

ABSTRACT

Sorafenib (**1**) is a targeted cancer drug, which was approved by the Food and Drug Administration of the United States (US FDA) for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma, renal cell carcinoma and thyroid carcinoma. In addition, sorafenib shows ability to inhibit various cancer cell lines due to its multikinase-inhibitory activity. However, sorafenib exhibits several disadvantageous pharmacological properties resulting in many adverse effects. Hence, many researchers are interested in design and synthesis to overcome the problems, and to search for their anti-tumor activities. Herein, the triazole-containing sorafenib analogue **2** was successfully synthesized by two different pathways. In the former pathway, 1,2,3-triazole ring was constructed *via* click reaction followed by aryl urea formation, which was suitable for the synthesis of analogues **14** with various substituted aryl moieties. The latter pathway started with linking aryl with urea and then click reaction for the triazole ring generation which was suitable for the synthesis of analogue **2** and the serial preparation of the substituted benzyl analogues **15**. The study of biological activities towards cancer cell lines using MTT assay revealed that analogue **2** were inactive against MOLT-3, A549 and HuCCA-1 with $IC_{50} > 100 \mu M$. However, the obtained evidences will be an important guideline for the syntheses of the aryl- and benzyl-substituted analogues **14** and **15**, which can be potentially active towards various cancer cell lines including liver cancer cell lines.

Key words: sorafenib analogue, 1,2,3-triazole, cytotoxicity towards cancer cell lines, multikinase inhibitor, click reaction

บทนำ

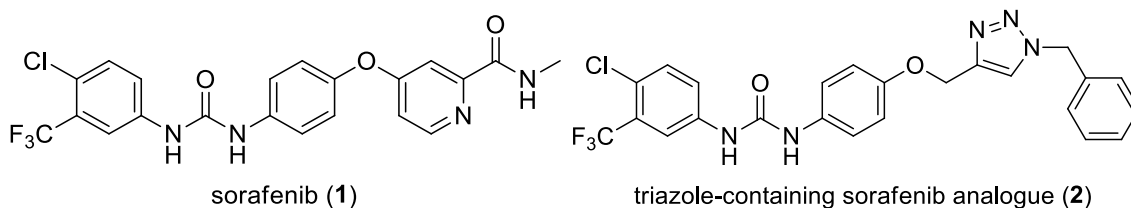
มะเร็ง (cancer) เป็นโรคร้ายแรงที่เกิดขึ้นกับอวัยวะหลายชนิด รักษาได้ยาก มีอัตราการตายสูง

และยังไม่ทราบสาเหตุที่ชัดเจน จึงเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญของคนทั่วโลก องค์การอนามัยโลก (International Agency for Research on Cancer,

World Health Organization; WHO) รายงานว่า ในปี พ.ศ. 2561 พบผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ทั่วโลก 18 ล้านราย โดยพบว่ามะเร็งที่พบในผู้ป่วยรายใหม่มากที่สุดได้แก่ มะเร็งปอด (11.6%) มะเร็งเต้านม (11.6%) มะเร็งลำไส้ (10.2%) ตามลำดับ และพบการเสียชีวิต 9.55 ล้านรายจากมะเร็งปอด (18.4%) มะเร็งลำไส้ (9.2%) มะเร็งกระเพาะอาหาร (8.2%) และมะเร็งตับ (8.2%) เป็นอันดับแรกๆ ตามลำดับ โดยมะเร็งตับมีอัตราการเสียชีวิตสูงที่สุด (International Agency for Research on Cancer, 2019) การรักษาโรคมะเร็งทำได้หลายวิธี นอกจากรักษาด้วยการผ่าตัด (surgery) การใช้เคมีบำบัด (chemotherapy) และการฉายรังสี (radiotherapy) แล้ว ปัจจุบันยังสามารถรักษาได้ด้วยยารักษามะเร็งแบบจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง (targeted cancer drug) ซึ่งจะเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาและมีความจำเพาะต่อชนิดของเซลล์มะเร็ง ทำให้มีผลข้างเคียงน้อยกว่าการใช้เคมีบำบัดและการฉายรังสี (Intaraprasong, 2018) ปัจจุบันจึงได้รับความสนใจจากนักเคมีทางการแพทย์ (medicinal chemist) และนักเคมีอินทรีย์ (organic chemist) ในการออกแบบ สังเคราะห์ และค้นหาฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็ง ตลอดจนการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อพัฒนาฤทธิ์ในการยับยั้ง ลดความเป็นพิษ และมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาในระดับโมเลกุลที่เหมาะสมเพื่อพัฒนาไปเป็นยารักษามะเร็งต่อไป

ยารักษามะเร็งแบบจำเพาะเจาะจงที่น่าสนใจในปัจจุบันคือ ซอราเฟนิบ (sorafenib, 1) ที่มีโครงสร้าง

ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยมีชื่อทางการค้าว่า Nexavar® เพราะเป็นยาที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration of the United States; US FDA) สำหรับใช้รักษามะเร็งตับระยะลุกลาม (advanced hepatocellular carcinoma; HCC) มะเร็งไต (advanced renal cell carcinoma; RCC) และมะเร็งต่อมไทรอยด์ (thyroid cancer) โดยซอราเฟนิบเป็นยายับยั้งเอนไซม์ไคเนสหลายชนิด (multikinase inhibitor) ในกลุ่มไทโรซีน เซอริน ทรีโอนีน ที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ (cell signaling) การแบ่งตัว (proliferation) การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) และการตายแบบปกติหรืออะพอพโทซิส (apoptosis) จึงทำให้สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลายชนิดอย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งมีความเป็นพิษและแนวโน้มที่จะดื้อยาต่ำ (Yao *et al.*, 2012) แต่ซอราเฟนิบมีความสามารถในการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดต่ำ (low bioavailability) มีผลข้างเคียงหลายประการ เช่น ความดันโลหิตสูง (hypertension) มีความผิดปกติที่ผิวหนัง ท้องร่วงและอ่อนเพลีย (Bayer Health Care Pharmaceuticals Inc., 2010) และซอราเฟนิบมีราคาสูง ผู้ป่วยส่วนมากจึงไม่สามารถเข้ารับการรักษาดูแลด้วยซอราเฟนิบได้ นอกจากนี้ยังพบว่ายารักษามะเร็งด้วยซอราเฟนิบสามารถยืดชีวิตผู้ป่วยได้นานขึ้นเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับยา (Cheng *et al.*, 2009)

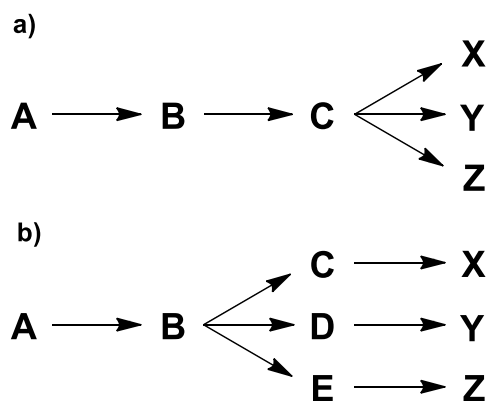


ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของซอราเฟนิบ (1) และ โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่มีวงไตรเอโซล (2)

ถึงแม้ว่าซอราเฟนิบจะมีข้อจำกัดในการใช้รักษามะเร็งหลายประการ แต่โครงสร้างของซอราเฟนิบเป็นที่สนใจของนักเคมีทางการแพทย์และนักเคมีอินทรีย์ เนื่องจากซอราเฟนิบเป็นยาที่ยังไคเนสได้หลายชนิดและเป็นยาชนิดแรกที่สามารถใช้รักษามะเร็งตับและมะเร็งชนิดอื่นได้ จึงสามารถพัฒนาโครงสร้างเพื่อให้มีสมบัติทางเภสัช (pharmacological properties) ให้เหมาะสมกับการรักษาและให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับและมะเร็งชนิดอื่นๆ ได้เทียบเท่าหรือดีกว่าซอราเฟนิบต้นแบบ จึงมีรายงานการปรับเปลี่ยนโครงสร้างและสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบและทดสอบฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งต่างๆ จำนวนมาก เช่น การปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยแทนที่พิโคลิโนไมด์ (picolinamide) วงเบนซีนแกนกลาง (benzene core) และวงเอริลยูเรีย (aryl urea) ของซอราเฟนิบด้วยหมู่แทนที่หรือวงแหวนอื่นๆ และพบว่าโมเลกุลเลียนแบบเหล่านั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งตับ (HepG2, PCL-PRF-5) เซลล์มะเร็งปอด (A549, H460) เซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231, MCF-7) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) เซลล์มะเร็งลำไส้ (HT29, HCT116, HCT-15) เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (PC-3) ฯลฯ โดยเฉพาะการแทนที่วงพิโคลิโนไมด์ด้วยเฮเทอโรไซเคิลต่างๆ (heterocycles) เช่น วงแหวนไพราซีน (pyrazine) นิโคตินาไมด์ (nicotinamide) ควินาโซลีน (quinazoline) ควินาซาไลน์ไดโอน (quinazalinedione) อิมิดาโซล (imidazole) และอินดาโซล (indazole) ฯลฯ ทำให้มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิดดีกว่าซอราเฟนิบต้นแบบ (Yao *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2018a; Sun *et al.*, 2018b; Džolić *et al.*, 2016; Khandan *et al.*, 2018; Kong *et al.*, 2015)

จากรายงานข้างต้น ทำให้การปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยการแทนที่วงพิโคลิโนไมด์ของซอราเฟนิบด้วยวงเฮเทอโรไซเคิลมีแนวโน้มทำให้มีฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งอื่นๆ ได้ดีขึ้น จึงมีความเป็นไปได้ในการแทนที่วงพิโคลิโนไมด์ด้วยวง 1,2,3-ไตรเอโซล (1,2,3-triazole) โดยมีแนวคิดที่ว่าวง 1,2,3-ไตรเอโซลจะสามารถสร้างแรงยึดเหนี่ยวที่สำคัญกับไคเนสได้หลายรูปแบบ เช่น อันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) อันตรกิริยาแบบไพ-ไพ (π - π interaction) และพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ได้ในบริเวณเดียวกับพิโคลิโนไมด์ นอกจากนี้วงไตรเอโซลยังมีความคล้ายกับกรดอะมิโนธรรมชาติฮิสทีดีน (Histidine) มีความเสถียรต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) และมีรายงานว่าโครงสร้างที่มีวงไตรเอโซลมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ด้านเชื้อรา (antifungal activity) ด้านเชื้อไวรัสเอชไอวี (anti-HIV activity) เป็นต้น (Guo *et al.*, 2015)

นอกจากนี้ในกระบวนการค้นพบยาจะต้องมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องสังเคราะห์ชุดโมเลกุลเลียนแบบที่มีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างให้มีหมู่แทนที่แตกต่างกันและมีความหลากหลาย ดังนั้นเส้นทางการสังเคราะห์จึงมีความสำคัญที่ทำให้การสังเคราะห์ชุดโมเลกุลมีประสิทธิภาพ โดยจะต้องเลือกเส้นทางที่มีการสังเคราะห์ชุดโมเลกุลเป็นเส้นตรงให้ได้สารมัธยันต์ (intermediate) ตัวสำคัญตัวเดียวก่อน แล้วในขั้นตอนสุดท้ายจึงจะมีการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่มีหมู่แทนที่ที่หลากหลายดังเส้นทางในภาพที่ 2a) หากสังเคราะห์ตามเส้นทางดังแสดงในภาพที่ 2b) จะทำให้ต้องทำปฏิกิริยาหลายขั้นตอน ซึ่งเป็นการสูญเสียเวลา แรงงาน และงบประมาณ



ภาพที่ 2 แสดงเส้นทางการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบที่เป็นไปได้

งานวิจัยนี้จึงได้ออกแบบโมเลกุลเลียนแบบชอราเฟนิบที่วงพิโคลินาไมด์ของชอราเฟนิบถูกแทนที่ด้วย 1,2,3-ไตรเอโซล ซึ่งเป็นตัวแทนของชุดโมเลกุลและศึกษาเส้นทางการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบที่มีประสิทธิภาพเหมาะสมกับการสังเคราะห์ชุดโมเลกุลที่มีการเปลี่ยนแปลงหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งแตกต่างกัน นอกจากนี้จะทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ของโมเลกุลที่สังเคราะห์ได้ในเบื้องต้นเพื่อเป็นแนวทางในการออกแบบโครงสร้างของโมเลกุลเลียนแบบชอราเฟนิบที่มีวงไตรเอโซลเป็นองค์ประกอบในชุดต่อไปให้มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงขึ้น

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี วัสดุ และวิธีการ

สารตั้งต้น รีเอเจนต์ และสารเคมีอื่นๆ ซื้อจากบริษัท Tokyo Chemical Industry (TCI) Sigma-Aldrich และ Acros Organics ตัวทำละลายที่มีความบริสุทธิ์สูง (p.a. หรือ analytical grade) ซื้อจากบริษัท RCI Labscan และ Sigma Aldrich และตัวทำละลายสำหรับการทำสารให้บริสุทธิ์ใช้ระดับ commercial grade มาจาก RCI Labscan และ Carlo Erba ได้แก่ เฮกเซน (hexane), เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate; EtOAc), ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane;

DCM) เอ็น-บิวทานอล (*n*-butanol) และเมทานอล (methanol) โดยตัวทำละลายเหล่านี้จะถูกกลั่นอย่างง่ายก่อนใช้ น้ำกลั่นที่ใช้ผ่านกระบวนการรีเวอร์ส-ออสโมซิส (Reverse Osmosis; RO) การวิเคราะห์ติดตามและตรวจสอบสารและการดำเนินไปของปฏิกิริยาใช้ทีแอลซี (Thin Layer Chromatography; TLC) ชนิด silica gel 60 F₂₅₄ บนแผ่นอะลูมิเนียมจากบริษัท Merck ซึ่งสามารถติดตามสารบนทีแอลซีได้ภายใต้รังสี UV ที่ความยาวคลื่น (λ) 254 nm

2. การตรวจสอบโครงสร้าง

ข้อมูลนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance; NMR) ของ ^1H , ^{13}C และ ^{19}F ไอโซโทปของโมเลกุลถูกบันทึกด้วยเครื่อง Bruker AVANCE 300 spectrometer (300 MHz สำหรับ ^1H NMR, 75 MHz สำหรับ ^{13}C NMR และ 282 MHz สำหรับ ^{19}F NMR) โดยใช้ CDCl_3 , acetone- d_6 และ $\text{DMSO}-d_6$ แสดง chemical shift ในหน่วย ppm ค่า coupling constant (J) แสดงในหน่วย Hertz (Hz) และ multiplicity ถูกอธิบายด้วย s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad โดยตัวทำละลาย CDCl_3 ใช้ TMS เป็น internal standard สำหรับ ^1H และ ^{13}C -NMR กำหนดค่า chemical shift ที่ 0 ppm ตัวทำละลาย $\text{DMSO}-d_6$ กำหนดค่า chemical shift ที่ 2.51 ppm และ 39.5 ppm

สำหรับ ^1H และ ^{13}C NMR ตามลำดับ ใช้ CF_3COOH เป็น internal standard สำหรับ ^{19}F NMR กำหนดค่า chemical shift ที่ -76.55 ppm และตัวทำละลาย acetone- d_6 กำหนดค่า chemical shift ที่ 2.06 ppm และ 29.9 ppm สำหรับ ^1H และ ^{13}C NMR ตามลำดับ

ข้อมูลมวลโมเลกุลถูกบันทึกด้วยเครื่อง Bruker Daltonics - micrOTOF โดยใช้ ESI positive mode ค่าที่แสดงคือ มวลต่อประจุ (mass/charge; m/z)

จุดหลอมเหลว (melting point) ของผลิตภัณฑ์ที่เป็นของแข็งหาได้จากเครื่องหาจุดหลอมเหลว Stuart scientific melting point apparatus SMP2

1) การสังเคราะห์เบนซิลเอไซด์ (benzyl azide; 4) (Wilkening *et al.*, 2011)

กวนสารละลายเบนซิลโบรไมด์ (benzyl bromide; 3) (0.5 mL, 4.20 mmol, 1.0 eq) และ โซเดียมเอไซด์ (sodium azide) (0.33 g, 5.11 mmol, 1.2 eq) ในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO) (8.0 mL) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 19 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมน้ำ (20 mL) ลงไปช้าๆ แล้วกวนต่อประมาณ 10 นาที สกัดของผสมด้วยไดคลอโรมีเทน (dichloromethane; DCM) (3 $\times$ 50 mL) โดยรวมชั้นตัวทำละลายอินทรีย์แล้วเติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) จากนั้นกรองแล้วนำสารละลายใสไประเหยแบบลดความดัน จะได้ของเหลวใสสีเหลืองของเบนซิลเอไซด์ (4) (0.61 g, 4.58 mmol, quantitative yield). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.32 (s, 2H), 7.10-7.40 (m, 5H).

2) การสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบ 2 เส้นทางที่ 1

2.1) เอ็น-อะเซทิล-4-อะมิโน-1-โพรพอกซีออกซีเบนซีน (*N*-acetyl-4-amino-1-propargyloxy benzene; 6) (Hansen *et al.*, 2005)

กวนสารละลาย เอ็น-อะเซทิล-4-อะมิโนฟีนอล (*N*-acetyl-4-aminophenol; 5) (0.15 g, 0.99 mmol, 1.0 eq) และโพแทสเซียมคาร์บอเนต (potassium carbonate; K_2CO_3) (0.17 g, 1.25 mmol, 1.3 eq) ใน เอ็น,เอ็น'-ไดเมทิลฟอร์มามิด (DMF) (5 mL) ที่อุณหภูมิ 0°C หลังจากนั้นเติมโพรพอกซิลโบรไมด์ (propargyl bromide) (0.1 mL, 1.20 mmol, 1.2 eq) ลงไปช้าๆ และกวนสารละลายต่อไปจนมีอุณหภูมิห้อง แล้วเติมโพรพอกซิลโบรไมด์ (propargyl bromide) (0.1 mL, 1.20 mmol, 1.2 eq) ช้าๆ ซ้ำอีกครั้ง แล้วทำการกวนทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมน้ำ (20 mL) ทำการสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether; Et_2O) (3 $\times$ 30 mL) แล้วรวมชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาสกัดด้วยน้ำเกลืออิ่มตัว (brine) (1 $\times$ 30 mL) จากนั้นนำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาเติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na_2SO_4) กรอง แล้วนำไประเหยแบบลดความดัน และนำสิ่งที่เหลือไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ซิลิกาเจล (silica gel) (60% EtOAc/hexane) จะได้ของแข็งสีขาวของ เอ็น-อะเซทิล-4-อะมิโน-1-โพรพอกซีออกซีเบนซีน (6) (96.3 mg, 0.51 mmol, 77%). Mp. = 121-124 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.10 (s, 3H), 2.52 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 4.64 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 6.88 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.40 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.13 (br s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 24.1, 56.1, 75.6, 78.6, 115.3 (2C), 122.0 (2C), 132.0, 154.3, 168.9.

2.2) เอ็น-(4-((1-เบนซิล-1*H*-1,2,3-ไตรเอโซล-4-อิล) เมทอกซี)ฟีนิล)อะเซตามิด (*N*-(4-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl) acetamide; 7) (Hansen *et al.*, 2005)

กวนสารละลาย เอ็น-อะเซทิล-4-อะมิโน-1-โพรพาแกอออกซีเบนซีน (6) (94.9 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) เบนซิลเอไซด์ (benzyl azide, 4) (66.9 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) โซเดียมแอสคอร์เบต (sodium ascorbate) (5.2 mg, 26 μ mol, 0.05 eq) และ สารละลาย 1 โมลลาร์ คอปเปอร์ซัลเฟต (1 M copper sulfate; 1 M CuSO₄) (25 μ L, 25 μ mol, 0.05 eq) ใน ตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำ:เอ็น-บิวทานอล (H₂O:n-BuOH, 1:1, 1 mL) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมน้ำแข็งลงไป (10 mL) และ 10% v/v สารละลายแอมโมเนีย (1.5 mL) กวนต่อไปประมาณ 5 นาที จะตกตะกอน กรอง และล้างด้วยน้ำเย็น จะได้สารผลิตภัณฑ์ เอ็น-(4-((1-เบนซิล-1*H*-1,2,3-ไตรเอโซล-4-อิล)เมทอกซี)ฟีนิล)อะเซตาไมด์ (7) ที่เป็นของแข็งสีขาว (152.6 mg, 0.47 mmol, 95%). Mp. = 137-139 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-*d*₆) δ (ppm): 2.93 (s, 3H), 5.14 (s, 2H), 5.65 (s, 2H), 6.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.30-7.42 (m, 5H), 7.56 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.06 (s, 1H), 9.09 (br s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, acetone-*d*₆) δ (ppm): 24.1, 54.2, 62.6, 114.6 (2C), 121.5 (2C), 124.7, 128.9 (2C), 129.1, 129.7 (2C), 134.1, 137.0, 144.8, 155.4, 168.6.

2.3) 4-((1-เบนซิล-1*H*-1,2,3-ไตรเอโซล-4-อิล) เมทอกซี)อะนิลีน (4-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)aniline; 8)

กวนสารละลาย เอ็น-(4-((1-เบนซิล-1*H*-1,2,3-ไตรเอโซล-4-อิล)เมทอกซี)ฟีนิล)อะเซตาไมด์ (7) (91.9 mg, 0.29 mmol, 1.0 eq) ในสารละลาย 2 โมลลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (2 M sodium hydroxide; 2 M NaOH) (6 mL) ที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำสารละลายให้เย็นลงจนถึง อุณหภูมิห้อง เติมน้ำ กรดไฮโดรคลอริก (2 M hydrochloric acid, 2 M HCl) (6 mL) อย่าง

ระมัดระวัง สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate; EtOAc) (3 $\times$ 30 mL) รวมชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มา สกัดด้วยน้ำเกลืออิ่มตัว (brine) (30 mL) แล้วเติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na₂SO₄) กรอง และนำสารละลายไประเหยแบบลดความดันและ นำสิ่งที่เหลือไปแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ซิลิกาเจล (silica gel) (80% EtOAc/hexane) จะได้สาร 4-((1-เบนซิล-1*H*-1,2,3-ไตรเอโซล-4-อิล)เมทอกซี)อะนิลีน (8) เป็นของแข็งสีขาว (71.3 mg, 0.22 mmol, 82%). Mp. = 115-117 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.05 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 6.57 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.76 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.20-7.23 (m, 2H), 7.25-7.37 (m, 3H), 7.49 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 54.0, 62.8, 116.1 (2C), 116.3 (2C), 122.7, 128.1 (2C), 128.7, 129.0 (2C), 134.6, 140.7, 144.9, 151.2; HRMS (ESI+, MeOH): *m/z* = 281.1397 [M+H]⁺ calcd. 281.1397 for C₁₆H₁₇N₄O₁.

2.4) 1-(4-((1-เบนซิล-1*H*-1,2,3-ไตรเอโซล-4-อิล)เมทอกซี)ฟีนิล)-3-(4-คลอโร-3-(ไตรฟลูออโรเมทิล)ฟีนิล)ยูเรีย (1-(4-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea; 2) (Džolić *et al.*, 2016)

กวนสารละลาย 4-((1-เบนซิล-1*H*-1,2,3-ไตรเอโซล-4-อิล)เมทอกซี)อะนิลีน (8) (60.3 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq) กับ 4-คลอโร-3-(ไตรฟลูออโรเมทิล)ฟีนิลไอโซไซยาเนต (4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate; 9) (61.1 g, 0.28 mmol, 1.3 eq) ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (dichloromethane; DCM) (4 mL) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายไประเหยแบบลดความดัน จากนั้นแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ซิลิกาเจล (silica gel) (50%

EtOAc/hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์ 1-(4-((1-เบนซิล-1*H*-1,2,3-ไตรเอโซล-4-อิล)เมทอกซี)ฟีนิล)-3-(4-คลอโร-3-(ไทรฟลูออโรเมทิล)ฟีนิล)ยูเรีย (**2**) เป็นของแข็งสีน้ำตาลอ่อน (82.1 mg, 0.16 mmol, 75%). Mp. = 204-206 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5.09 (s, 2H), 5.61 (s, 2H), 6.97 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.25-7.50 (m, 7H), 7.59 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 9.10 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 52.9, 61.3, 115.0 (2C), 116.7 (q, ³*J*_{CF} = 6.0 Hz), 120.5 (2C), 122.1 (q, ³*J*_{CF} = 2.4 Hz), 122.8 (q, ¹*J*_{CF} = 271.5 Hz), 122.9, 124.6, 126.3 (q, ²*J*_{CF} = 30.0 Hz), 127.9 (2C), 128.1, 128.8 (2C), 131.9, 132.5, 136.0, 139.6, 143.2, 152.6, 153.6; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): -63.83.

3) การสังเคราะห์โพลิเมอร์แบบ 2 เส้นทางที่ 2

3.1) 1-(4-คลอโร-3-(ไทรฟลูออโรเมทิล)ฟีนิล)-3-(4-ไฮดรอกซีฟีนิล)ยูเรีย (1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)urea; **12**) (Džolić *et al.*, 2016)

กวนสารละลาย 4-อะมิโนฟีนอล (4-amino phenol; **11**) (0.22 g, 2.0 mmol, 1.0 eq) และ 4-คลอโร-3-(ไทรฟลูออโรเมทิล)ฟีนิลไอโซไซยาเนต (4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate; **9**) (0.57 g, 2.5 mmol 1.3 eq) ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (dichloromethane; DCM) (14 mL) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายไประเหยแบบลดความดัน จากนั้นแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ซิลิกาเจล (silica gel) (60% EtOAc/hexane) จะได้ 1-(4-คลอโร-3-(ไทรฟลูออโรเมทิล)ฟีนิล)-3-(4-ไฮดรอกซีฟีนิล)ยูเรีย (**12**) เป็นของแข็งสีขาว (0.56 g, 1.70

mmol, 85%). Mp. = 223-225 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 6.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.23 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J* = 9.0, 1.8 Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 9.13 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 115.7 (2C), 117.1 (q, ³*J*_{CF} = 6.0 Hz), 121.7 (2C), 122.5 (q, ³*J*_{CF} = 2.4 Hz), 123.3, 123.3 (q, ¹*J*_{CF} = 271.5 Hz), 127.1 (q, ²*J*_{CF} = 30.0 Hz), 130.8, 132.4, 140.0, 153.2, 153.4; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): -63.13; HRMS (ESI+, MeOH): *m/z* = 353.0275 [M+Na]⁺ calcd. 353.0281 for C₁₄H₁₀ClF₃N₂O₂Na.

3.2) 1-(4-คลอโร-3-(ไทรฟลูออโรเมทิล)ฟีนิล)-3-(4-(พรอพ-2-ไอน์-1-อิลอกซี)ฟีนิล)ยูเรีย (1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)urea; **13**) (Hansen *et al.*, 2005)

กวนสารละลาย 1-(4-คลอโร-3-(ไทรฟลูออโรเมทิล)ฟีนิล)-3-(4-ไฮดรอกซีฟีนิล)ยูเรีย (**12**) (0.52 g, 1.58 mmol, 1.0 eq) โพรพากิลโบรไมด์ (propargyl bromide) (1.5 mL, 1.68 mmol, 1.1 eq) และ โพแทสเซียมคาร์บอเนต (potassium carbonate; K₂CO₃) (0.24 g, 1.75 mmol, 1.1 eq) ในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO) (5 mL) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมน้ำแข็งลงไป (10 mL) แล้วกวนต่อจนถึงอุณหภูมิห้อง สกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether; Et₂O) (3 × 30 mL) รวมชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาเติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous Na₂SO₄) กรอง แล้วนำสารละลายใส่ไประเหยแบบลดความดัน จากนั้นแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ซิลิกาเจล (silica gel) (20% EtOAc/hexane) จะได้ผลิตภัณฑ์ 1-(4-คลอโร-3-(ไทรฟลูออโรเมทิล)ฟีนิล)-3-(4-(พรอพ-2-ไอน์-1-อิลอกซี)

ฟีนิล)ยูเรีย (13) เป็นของแข็งสีขาว (0.39 g, 1.05 mmol, 80%). Mp. = 195-197 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3.54 (t, J = 2.1 Hz, 1H), 4.75 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 6.93 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.63 (dd, J = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 9.09 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 55.6, 78.1, 79.6, 115.3 (2C), 116.7 (q, $^3J_{CF}$ = 6.0 Hz), 120.6 (2C), 122.2 (q, $^3J_{CF}$ = 2.4 Hz), 122.9 (q, $^1J_{CF}$ = 271.5 Hz), 123.0, 126.7 (q, $^2J_{CF}$ = 30.0 Hz), 132.1, 133.0, 139.6, 152.7, 152.8; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): -63.03; HRMS (ESI+, MeOH): m/z = 391.0432 [M+Na] $^+$ calcd. 391.0437 for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}$.

3.3) 1-(4-((1-เบนซิล-1*H*-1,2,3-ไตรเอโซล-4-อิล)เมทอกซี)ฟีนิล)-3-(4-คลอโร-3-(ไตรฟลูออโรเมทิล)ฟีนิล)ยูเรีย (1-(4-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea; 2) (Hansen *et al.*, 2005)

กวนสารละลาย 1-(4-คลอโร-3-(ไตรฟลูออโรเมทิล)ฟีนิล)-3-(4-(พรอพ-2-ไอน์-1-อิลอกซี)ฟีนิล)ยูเรีย (13) (0.16 g, 0.43 mmol, 1.0 eq) และเบนซิลเอไซด์ (benzyl azide, 4) (70.3 mg, 0.53 mmol, 1.2 eq) ในตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำ:เอ็่น-บิวทานอล (H_2O :*n*-BuOH, 1:1, 1.6 mL) ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมโซเดียมแอสคอร์เบต (sodium ascorbate) (4.4 mg, 22 μmol , 0.05 eq) และสารละลาย 1 โมลลาร์ คอปเปอร์ซัลเฟต (1 M copper sulfate; 1 M CuSO_4) (22 μL , 22 μmol , 0.05 eq) ลงไปแล้วกวนต่อไปที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมน้ำแข็งลงไป (10 mL) และ 10% v/v สารละลายแอมโมเนีย (1.5 mL) ตามลำดับ กวนต่อไปประมาณ 5 นาที จนตกตะกอน แล้วกรอง และนำของแข็งไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โคร

มาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ซิลิกาเจล (silica gel) (60% EtOAc/hexane) จะได้สารผลิตภัณฑ์ 1-(4-((1-เบนซิล-1*H*-1,2,3-ไตรเอโซล-4-อิล)เมทอกซี)ฟีนิล)-3-(4-คลอโร-3-(ไตรฟลูออโรเมทิล)ฟีนิล)ยูเรีย (2) เป็นของแข็งสีเทา (0.19 g, 0.38 mmol, 89%). Mp. = 204-206 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 5.09 (s, 2H), 5.62 (s, 2H), 6.97 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.25-7.50 (m, 7H), 7.59 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.63 (dd, J = 6.9, 2.1 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 9.14 (s, 1H; HRMS (ESI+, MeOH): m/z = 524.1072 [M+Na] $^+$ calcd. 524.1072 for $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{ClF}_3\text{N}_5\text{O}_2\text{Na}$

หมายเหตุ ^1H NMR ของโมเลกุลเลียนแบบ 2 สอดคล้องกับโมเลกุลเลียนแบบ 2 ที่สังเคราะห์ได้จากเส้นทางที่หนึ่ง อีกทั้งยืนยันโครงสร้างด้วย High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS)

3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

นำ 1-(4-((1-เบนซิล-1*H*-1,2,3-ไตรเอโซล-4-อิล)เมทอกซี)ฟีนิล)-3-(4-คลอโร-3-(ไตรฟลูออโรเมทิล)ฟีนิล)ยูเรีย (2) ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดลิมโฟบลาสต์ (MOLT-3) เซลล์มะเร็งปอด (A549) และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (HuCCA-1) ในหลอดทดลองด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay) โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

เติมเซลล์มะเร็งจำนวนประมาณ 2×10^4 เซลล์ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ใน 10% FBS ในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well plate) บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุม แล้วเติมสารละลาย 0.1% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO) ของ 1-(4-((1-เบนซิล-1*H*-1,2,3-ไตรเอโซล-4-อิล)เมทอกซี)ฟีนิล)-3-(4-คลอโร-3-(ไตรฟลูออโรเมทิล)ฟีนิล)ยูเรีย (2) หรือ Etoposide

หรือ Doxorubicin hydrochloride เป็นชุดควบคุมที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS (0.5 mL) และเติม 0.04 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก (0.04 M hydrochloric acid; 0.04 M HCl) ในไอโซโพรพานอล (isopropanol) (0.5 mL) เติมน้ำละลาย 0.5 mg/mL MTT (50 µL) ในหลุมเซลล์ บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำสารละลาย MTT ออกและละลายผลึกที่เกิดขึ้นด้วยไอโซโพรพานอล (isopropanol) (0.5 mL) และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 570-590 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาค่า IC_{50} เพื่อวัดค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของแต่ละตัวอย่าง โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (Stoddart, 2011)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

งานวิจัยนี้เสนอการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบชอราเฟนิบ 2 ที่มีวง 1,2,3-ไตรเอโซลที่เชื่อมกับหมู่เบนซิล โดยศึกษาการสังเคราะห์ 2 เส้นทางที่เหมาะสมกับการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบ 2 และเพื่อเป็นแนวทางในการสังเคราะห์ชุดโมเลกุลเลียนแบบชนิดนี้ที่มีการแทนที่บนวงเอริลและเบนซิลที่แตกต่างกัน โดยเส้นทางที่หนึ่งจะเป็นการสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมาย 2 ด้วยการทำปฏิกิริยาคลิกก่อนแล้วตามด้วยการสร้างส่วนยูเรียเพื่อเชื่อมต่อกับวงเอริล (ภาพที่ 3) ส่วนเส้นทางที่สองเป็นการสังเคราะห์ 2 โดยการสร้างยูเรียก่อนแล้วจึงนำมาทำปฏิกิริยาคลิกเพื่อเชื่อมต่อกับวงเบนซิล (ภาพที่ 4) ซึ่ง โมเลกุลของสารที่สังเคราะห์ได้จะยืนยันโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโคปี (Nuclear Magnetic Resonance; NMR) และโมเลกุล

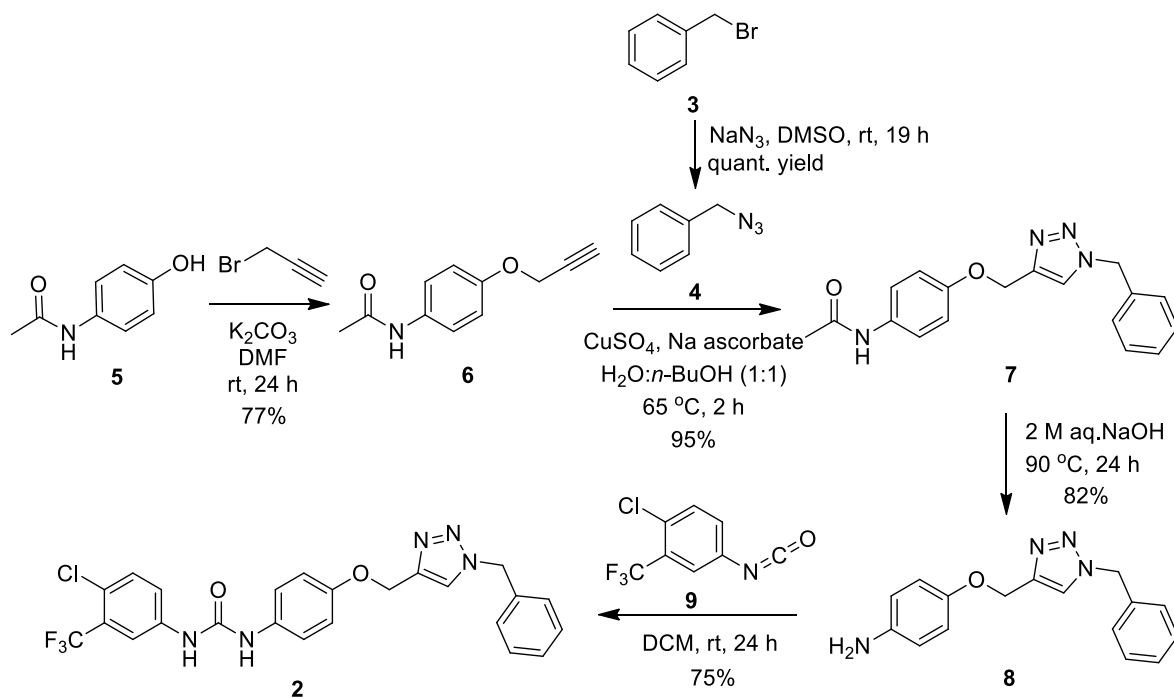
เป้าหมายจะใช้เมสสเปกโตรเมตรี (High-Resolution Mass Spectrometry; HRMS) ร่วมด้วย

เส้นทางที่หนึ่ง โมเลกุลเลียนแบบชอราเฟนิบ 2 ถูกสังเคราะห์ด้วยเส้นทางที่ยาวที่สุด (longest linear sequence) ด้วยปฏิกิริยา 4 ขั้นตอน ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยสามารถเริ่มได้จากการนำ เอ็น-อะเซทิล-4-อะมิโนฟีนอล (5) มาทำปฏิกิริยาโพรพาเกิลเลชันด้วยโพรพาเกิลโบรไมด์ (Hansen *et al.*, 2005) จะได้สารประกอบอัลไคน 6 ด้วยผลผลิตร้อยละ 77 แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับเบนซิลเอไซด์ (4) ซึ่งสังเคราะห์มาจากเบนซิลโบรไมด์ (3) และโซเดียมเอไซด์ (Wilkening *et al.*, 2010) ทำให้เกิดปฏิกิริยาคลิกสร้างวงไตรเอโซลในสถานะที่มีคอปเปอร์ (II) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยจะเกิดผ่านสuszเจน 1,3-ไดโพลาร์ไซโคลแอดดิชัน (Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition) (Hansen *et al.*, 2005) ทำให้ได้สารประกอบที่มีวงไตรเอโซล 7 ที่ต้องการด้วยผลผลิตร้อยละ 95 หลังจากนั้นทำการเอาหมู่ปกป้องอะเซทิลออกในสถานะเบสจะได้อะนีน 8 อย่างราบรื่นด้วยผลผลิตร้อยละ 82 และนำไปทำปฏิกิริยาการเติมด้วยนิวคลีโอไฟล์ (nucleophilic addition) กับไอโซไซยานต 9 (Džolić *et al.*, 2016) เพื่อสร้างยูเรียเชื่อมระหว่างส่วนของเอริลและไตรเอโซล จะได้โมเลกุลเลียนแบบชอราเฟนิบเป้าหมาย 2 ด้วยผลผลิตร้อยละ 75 ซึ่งการสังเคราะห์เส้นทางนี้เริ่มต้นจากอะมิโนฟีนอลที่ได้รับการปกป้องด้วยอะเซทิล 5 โดยเส้นทางที่ยาวที่สุดใช้ปฏิกิริยา 4 ขั้นตอน ด้วยผลผลิตรวมร้อยละ 45

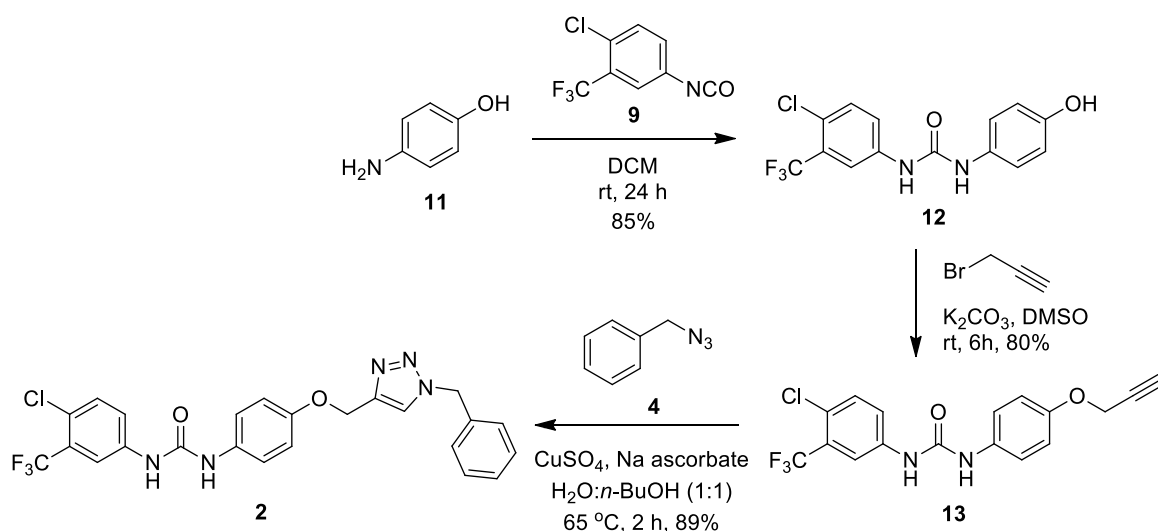
เส้นทางที่สอง โมเลกุลเลียนแบบชอราเฟนิบ 2 ถูกสังเคราะห์ด้วยเส้นทางที่ยาวที่สุดด้วยปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน ดังแสดงในภาพที่ 4 โดยเริ่มจากการนำ 4-อะมิโนฟีนอล (11) มาสร้างสะพานยูเรียกับไอโซไซยานต 9 (Džolić *et al.*, 2016) จะได้สารประกอบยูไรโดฟีนอล 12 ด้วยผลผลิตร้อยละ 85 หลังจากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับโพรพาเกิลโบรไมด์ในสถานะเบส

(Hansen *et al.*, 2005) จะได้สารประกอบอัลไคน์ **13** ด้วยผลผลิตร้อยละ 80 และขั้นตอนสุดท้ายจะนำอัลไคน์ **13** และเบนซิลเอไซด์ (**4**) มาสร้างวง 1,2,3-ไตรเอโซลระหว่างกันในสถานะที่มีคอปเปอร์ (II) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยจะเกิดผ่านสุชเคน 1,3-ไดโพลาร์ไฮโคลแอคดิชัน (Huisgen 1,3-dipolar

cycloaddition) (Hansen *et al.*, 2005) จะได้โมเลกุลเลียนแบบฮอร์โมน **2** ที่ต้องการด้วยผลผลิตร้อยละ 89 ซึ่งการสังเคราะห์ด้วยเส้นทางนี้เริ่มต้นจาก 4-อะมิโนฟีโนล **11** โดยเส้นทางที่ยาวที่สุดใช้ปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน ด้วยผลผลิตร้อยละ 61



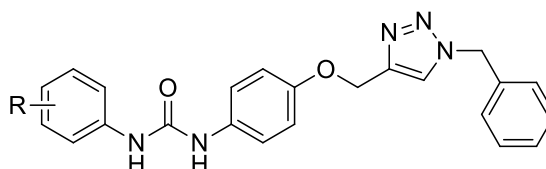
ภาพที่ 3 เส้นทางที่หนึ่งสำหรับการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบฮอร์โมน **2** และร้อยละผลผลิต



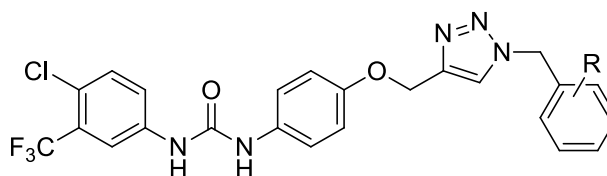
ภาพที่ 4 เส้นทางที่สองสำหรับการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบฮอร์โมน **2** และร้อยละผลผลิต

จากผลการทดลอง พบว่าทั้งสองเส้นทางประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ 2 โดยใช้สารตั้งต้นและรีเอเจนต์คล้ายกัน แต่มีลำดับปฏิกิริยาและร้อยละผลผลิต

ต่างกัน และคาดว่าวิธีการสังเคราะห์ทั้งสองเส้นทางจะสามารถใช้สังเคราะห์ชุดโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ 14 และ 15 (ภาพที่ 5) ที่มีการแทนที่ด้วยหมู่แทนที่ต่างๆ บนวงเอริลและเบนซิลได้ด้วย



triazole-containing sorafenib analogue (14)



triazole-containing sorafenib analogue (15)

ภาพที่ 5 โครงสร้างโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่มีวงไตรเอโซล 14 และ 15 ที่เหมาะสำหรับการสังเคราะห์ชุดโมเลกุลด้วยเส้นทางที่หนึ่งและสอง ตามลำดับ

หากพิจารณาจากความต้องการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบ 2 เพียงโครงสร้างเดียว จะพบว่าการสังเคราะห์ 2 ด้วยเส้นทางที่สอง จะมีประสิทธิภาพสูงกว่า เนื่องจากมีจำนวนขั้นของปฏิกิริยาน้อยกว่า และมีร้อยละผลผลิตรวมสูงกว่า แต่หากต้องการสังเคราะห์ชุดโมเลกุลเลียนแบบ 14 ซึ่งมีหมู่แทนที่ที่แตกต่างกันบนวงเอริล และ 15 ซึ่งมีหมู่แทนที่ที่แตกต่างกันบนวงเบนซิลแล้ว ต้องพิจารณาลำดับการสังเคราะห์อย่างละเอียดเพื่อให้การสังเคราะห์มีประสิทธิภาพสูงสุดดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งเส้นทางที่หนึ่งเหมาะสำหรับเป็นแนวทางในการสังเคราะห์ชุดโมเลกุลเลียนแบบ 14 ที่มีการแทนที่บนวงเอริลที่ต่อกับยูเรียด้วยหมู่แทนที่ที่แตกต่างกัน โดยปฏิกิริยาในขั้นตอนสุดท้ายใช้ไอโซไซยาเนตที่มีหมู่แทนที่ต่างกันทำปฏิกิริยากับอะมิโน 8 จะได้ชุดโมเลกุลเลียนแบบ 14 ที่ต้องการ ส่วนเส้นทางที่สองเหมาะ

สำหรับเป็นแนวทางในการสังเคราะห์ชุดโมเลกุลเลียนแบบ 15 ที่มีการแทนที่บนวงเบนซิลที่ต่อกับไตรเอโซลด้วยหมู่แทนที่แตกต่างกัน โดยในขั้นตอนสุดท้ายใช้เบนซิลเอไซด์ที่มีหมู่แทนที่ต่างๆ ทำปฏิกิริยากับอัลไคน 13 จะได้ชุดโมเลกุลเลียนแบบ 15 ที่ต้องการ

หลังจากประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ 2 แล้ว ได้นำ 2 ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดในหลอดทดลอง (Stoddart, 2011) ได้แก่ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดลิมโฟบลาสต์ (MOLT-3) เซลล์มะเร็งปอด (A549) และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (HuCCA-1) ด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay) ได้ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่แสดงด้วยค่า IC_{50} (half-maximal inhibitory concentration) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองที่แสดงด้วยค่า IC_{50} (half-maximal inhibitory concentration) ในหน่วยไมโครโมลลาร์ (μM) ของโมเลกุลเลียนแบบเป้าหมาย 2

เซลล์มะเร็ง	IC_{50} (μM)
MOLT-3	>100
A549	>100
HuCCA-1	>100

จากผลการทดลองพบว่า โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ 2 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้งสามชนิด โดยมีค่า $IC_{50} > 100 \mu M$ อย่างไรก็ตาม โมเลกุลเลียนแบบ 2 มีความน่าสนใจจะนำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งตับและยังสามารถพัฒนาโครงสร้างให้มีหมู่แทนที่บนวงเอริลและเบนซิล (ชุดโมเลกุลเลียนแบบ 14 และ 15) ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะเพิ่มประสิทธิภาพแรงยึดเหนี่ยวกับบริเวณยึดจับ (binding site) ของเป้าหมายกับโมเลกุลที่สังเคราะห์ขึ้น ส่งผลต่อฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งให้ดีขึ้นได้ ซึ่งการสังเคราะห์ชุดโมเลกุลเลียนแบบ 14 และ 15 สามารถใช้แนวทางการสังเคราะห์ที่ได้นำเสนอไว้ข้างต้น

สรุป

โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ 2 ที่มีหมู่ไธโรเอโซลที่เชื่อมต่อกับเบนซิลเป็นโครงสร้างใหม่ที่ถูกออกแบบเพื่อใช้ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งและถูกสังเคราะห์ได้ด้วย 2 เส้นทางที่มีลำดับปฏิกิริยาแตกต่างกัน ซึ่งทั้งสองเส้นทางสามารถสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมาย 2 ได้สำเร็จ โดยเส้นทางที่หนึ่ง (ปฏิกิริยาคลิกแล้วตามด้วยการสร้างยูเรีย) เหมาะสำหรับการสังเคราะห์ชุดโมเลกุลเลียนแบบ 14 ซึ่งมีหมู่แทนที่บนวงเอริลที่แตกต่างกัน ส่วนเส้นทางที่สอง (สร้างยูเรียแล้วตามด้วยปฏิกิริยาคลิก) เหมาะสำหรับการสังเคราะห์ 2 มากกว่าเส้นทางที่หนึ่งด้วยขั้นตอนที่น้อยกว่าและร้อยละ

ผลผลิตรวมสูงกว่า และเส้นทางนี้ยังเหมาะสำหรับเป็นแนวทางในการสังเคราะห์ชุดโมเลกุลเลียนแบบ 15 ซึ่งมีหมู่แทนที่บนเบนซิลที่แตกต่างกันอีกด้วย อย่างไรก็ตาม โมเลกุลเป้าหมาย 2 ที่สังเคราะห์ได้ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดลิมโฟบลาสต์ (MOLT-3) เซลล์มะเร็งปอด (A549) และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (HuCCA-1) ซึ่งสามารถถูกพัฒนาโครงสร้างด้วยการเติมหมู่แทนที่บนวงเอริลและเบนซิลซึ่งคาดว่าจะเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งต่างๆ รวมทั้งเซลล์มะเร็งตับต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนวิจัยสำหรับบัณฑิต พสวท. แรกบรรจุ สัญญาเลขที่ 19/2558 และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สำหรับงบประมาณ วัสดุ และเครื่องมือในการดำเนินการวิจัย และการสนับสนุนทุนการศึกษาของนายโยธิน มาตะไกรหัสผู้รับทุน TG-55-16-59-034M จากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติตามสัญญาสนับสนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา โครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (Thailand Graduate Institute of Science and Technology; TGIST) เลขที่ SCA-CO-2559-2316-TH ขอขอบคุณคุณสมคิด สิทธิมนต์ชัย คุณผกามาศ อินทโชติ คุณสุชาดา เสี่ยงใส และคุณบุญกร ทรายมณี จากสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ สำหรับ

ความช่วยเหลือในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ขอขอบคุณนักวิจัยที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และ ศาสตราจารย์ นพ.พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านโรคตับอักเสบและมะเร็งตับ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- Bayer Health Care Pharmaceuticals Inc. 2010. **Patient Information: NEXAVAR® (NEX-A-VAR) (sorafenib) tablets, oral.** Available Source: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/021923s008s0091bl.pdf, October 4, 2019.
- Cheng, A.L., Kang, Y.K., Chen, Z., Tsao, C.J., Qin, S., Kim, J.S., Luo, R., Feng, J., Ye, S., Yang, T.S., Xu, J., Sun, Y., Liang, H., Liu, J., Wang, J., Tak, W.Y., Pan, H., Burock, K., Zou, J., Voliotis, D. and Guan, Z. 2009. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet Oncology** 10(1): 25-34.
- Džolić, Z.R., Perković, I., Pavelić, S.K., Sedić, M., Ilić, N., Schols, D. and Zorc, B. 2016. Design, synthesis, and cytostatic activity of novel pyrazine sorafenib analogs. **Medicinal Chemistry Research** 25(12): 2729-2741.
- Guo, Z., Yan, Z., Zhou, X., Wang, Q., Lu, M., Liu, W., Zhou, H., Yang, C. and McClain, E.J. 2015. Synthesis and biological evaluation of novel 1,2-benzisothiazol-3-one-derived 1,2,3-triazoles as caspase-3 inhibitors. **Medicinal Chemistry Research** 24(5): 1814-1829.
- Hansen, T.V., Wu, P., Sharpless, W.D. and Lindberg, J.G. 2005. Just Click It: Undergraduate Procedures for the Copper(I)-Catalyzed Formation of 1,2,3-Triazoles from Azides and Terminal Acetylenes. **Journal of Chemical Education** 82(12): 1833-1836.
- Intaraprasong, P. 2018. New therapy including combination. **Thai Journal of Hepatology** 1(2): 33-36. (in Thai)
- International Agency for Research on Cancer. 2019. **All cancers.** Global Cancer Observatory. Available Source: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>, March 15, 2019.
- Khandan, M., Rizi, S.S., Khodarahmi, G. and Hassanzadeh, F. 2018. Synthesis and cytotoxic evaluation of some novel quinoxalinedione diarylamide sorafenib analogues. **Research in Pharmaceutical Sciences** 13(2): 168-176.
- Kong, X., Yao, Z., He, Z., Xu, W. and Yao, J. 2015. Design, synthesis and biological evaluation of thiourea and nicotinamide-containing sorafenib analogs as antitumor agents. **Medicinal Chemistry Communications** 6(5): 1-5.
- Stoddart, M.J. 2011. **Mammalian Cell Viability Method and Protocols.** Humana Press, New York. doi: 10.1007/978-1-61779-108-6.

- Sun, S., He, Z., Huang, M., Wang, N., He, Z., Kong, X. and Yao, J. 2018a. Design and discovery of thioether and nicotinamide containing sorafenib analogs as multikinase inhibitors targeting B-Raf, B-RafV600E and VEGFR-2. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** 26(9): 2381-2391.
- Sun, S., Zhang, J., Wang, N., Kong, X., Fu, F., Wang, H., and Yao, J. 2018b. Design and Discovery of Quinazoline- and Thiourea-Containing Sorafenib Analogs as EGFR and VEGFR-2 Dual TK Inhibitors. **Molecules** 23(24): 1-14.
- Wilkening, I., Signore, G.D. and Hackenberger, C.P.R. 2011. Synthesis of Phosphoramidate Peptides by Staudinger Reactions of Silylated Phosphinic Acids and Esters. **Chemical Communication** 47: 349-351.
- Yao, J., He, Z., Chen, J., Chen, D., Sun, W. and Xu, W. 2012. Design, Synthesis and Antiproliferative Activities of Diaryl Thiourea Derivatives as Anticancer Agents. **Chinese Journal of Chemistry** 30(10): 2423-2430.