

岐阜薬科大学博士（薬学）学位論文

腫瘍微小環境におけるエネルギー代謝とストレス応答を標的とする

抗腫瘍ビグアニドの開発研究

2021年

境 崇行

目 次

理論の部

序論.....	1
研究目的および研究方針.....	3
本論.....	4
第一章 アリールビグアニド誘導体の構造展開.....	4
第一節 分子設計.....	4
第二節 アリールビグアニド誘導体の合成.....	5
第一項 マイクロウェーブ反応によるビグアニド誘導体の合成.....	5
第二項 各種原料アミンの合成.....	5
第三節 アリールビグアニド誘導体の構造活性相関.....	9
第一項 スクリーニング評価系.....	9
第二項 HIF-1 及び UPR 転写活性化阻害作用.....	9
第三項 低栄養条件選択的細胞毒性.....	10
第四項 疎水性パラメーターの検討.....	14
第四節 アリールビグアニド誘導体種々の生物活性に関する評価.....	16
第一項 各種がん細胞における低栄養選択的細胞毒性.....	16
第二項 HIF-1 α および GRP78 タンパク質発現阻害.....	17
第三項 血管新生阻害作用.....	19
第四項 エネルギー代謝に与える影響.....	20
第五項 細胞死に関する解析.....	25
第五節 小括.....	26
第二章 光アフィニティラベルビグアニドプローブの開発に関する検討.....	26
第一節 光アフィニティラベルビグアニド.....	27
第二節 トリフルオロメチルジアジリン体 38 および 39 の合成戦略.....	28
第三節 トリフルオロメチルジアジリン体 38 および 39 の合成.....	299

第四節 アジド体 40 の合成の検討.....	33
第五節 ベンゾイル体 7e の合成の検討.....	34
第六節 小括.....	35
総括.....	36
謝辞.....	39

実 験 の 部

有機合成における General Procedure.....	42
第一章第二節第一項～三項に関する化合物の合成.....	43
第二章第二節に関する化合物の合成.....	59
R _m 値.....	66
生物学的評価.....	66
細胞培養.....	66
検定化合物溶液の調製.....	67
ストレス処理.....	67
ルシフェラーゼアッセイ.....	67
MTT アッセイ.....	68
Western Blot (HIF-1 α).....	68
Western Blot (GRP78).....	69
CAM アッセイ.....	69
細胞代謝アッセイ.....	70
細胞死解析.....	70
統計学的解析.....	71
Abbreviation list.....	71
引用文献.....	74
主論文の基礎となる公表論文.....	81

理論の部

序 論

代謝リプログラミングは、がんの新たな特徴として認識されており、がん治療薬開発のための腫瘍選択的ターゲットとして注目されている^{1,2}。腫瘍細胞は、正常細胞とは異なり、ミトコンドリアの活性が低下しているため (Warburg 効果)³、常酸素状態でも酸化的リン酸化 (OXPHOS) の代わりに解糖系を主要な ATP 産生源として利用していると考えられていた。しかし、最近の研究では、OXPHOS のアップレギュレーションについて多くのがん細胞種において研究されており、特に解糖能に障害を有するがん細胞は、バイオマスや生体エネルギー産生過程で OXPHOS に依存しているため、OXPHOS 阻害剤に対する感受性が極めて高い⁴⁻⁸。さらに、がんのミトコンドリアは、生存に必要な固有のエネルギーとその生合成に対する高い要求に対応するために、解糖系と OXPHOS を柔軟に切り替えることができる可塑性を有する⁹。したがって、OXPHOS 阻害剤のようなミトコンドリア代謝を標的とした治療戦略は有望と考えられ、大きな注目を集めている。現在、ミトコンドリア代謝を標的とした抗がん剤の開発が積極的に進められており (Figure 1)、新たながん治療薬としてのミトコンドリア代謝阻害の可能性を探るために、複数の前臨床試験または臨床試験が実施されている^{7,8,10-14}。

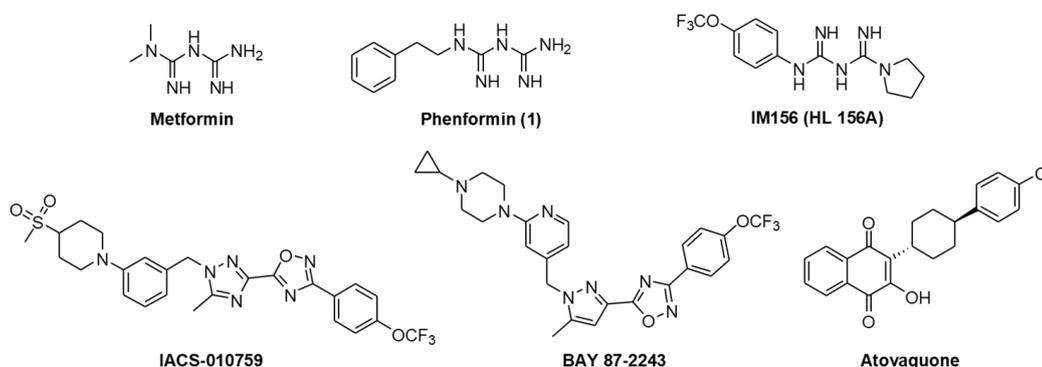


Figure 1. Anticancer drug targeting mitochondrial energy metabolism system⁷

フェンホルミン (1) やメトホルミンなどのビグアニド系薬剤 (Figure 1) は、ミトコンドリア呼吸鎖素複合体 I の強力な阻害剤である^{15,16}。ビグアニド系薬剤のがん治療への応用を評価するために、数多くの前臨床研究が行われている^{11,17,18}。さらに、臨床試験では、様々ながん種がメトホルミンに対して有意な臨床効果を示すことが示されている¹⁹。最近では、ビグアナイド誘導体は、グルコースが不足している腫瘍細胞に対して、小胞体ストレス応答 (Unfolded protein response: UPR) に関わるタンパク質の転写活性を低下させ、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) を活性化し、がん微小環境の腫瘍細胞に対する選択的な細胞毒性を引き起こすことが示されている^{20,21}。著者らは以前、グルコース欠乏条件に対する選択的細胞毒性をスクリーニング評価の指標とすること

で、フェンホルミンよりも高い種々の抗がん活性を持つビグアニド誘導体を開発した²²。これらのビグアニド誘導体は、低酸素誘導因子-1 (HIF-1) および UPR 依存性の転写活性化、様々な ER ストレス関連タンパク質や c-Myc の発現、血管新生を有意に抑制することができた²¹⁻²⁵。がん細胞は、HIF-1 や UPR シグナル伝達経路を含む様々な適応応答系を有しており、腫瘍微小環境 (TME)²⁶において低酸素や低栄養ストレス下での生存を可能にしている。そのため、ビグアニド誘導体は、ミトコンドリアを標的とした抗がん剤の候補としてだけでなく、腫瘍組織のがん微小環境を標的とした抗がん剤の創薬シーズとしても有望視されている。

研究目的および研究方針

OXPHOS 阻害剤のようなミトコンドリア代謝を標的とした治療戦略は有望と考えられ、フェンホルミンはメトホルミンよりも強い OXPHOS 阻害作用を示す。さらに、ビグアニド誘導体は、ブドウ糖欠乏性の腫瘍細胞において、UPR 転写の阻害、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の活性化および選択的な細胞毒性を引き起こすことが示されている^{20,27}。そこで、我々はアリアルビグアニドスキュフォールドに着目し、高生理活性のアリアルビグアニド誘導体を創製し、ビグアニド化合物の持つミトコンドリアのエネルギー代謝阻害作用について検討を行うこととした。第一章では、TME やミトコンドリアのエネルギー代謝を標的としたがん治療薬としてのアリアルビグアニド誘導体の開発について述べる。アリアルビグアニド化合物の芳香環やビグアニド基への置換基の導入およびアルキレンリンカー鎖長のホモロゲーションを行うことで、TME のストレス因子やミトコンドリアのエネルギー代謝を標的とする生理活性が高いアリアルビグアニド誘導体を創製した。また、見出した高活性アリアルビグアニド誘導体が、がん細胞のミトコンドリア呼吸に対してどのような影響を及ぼすかについて検討すること、および細胞死について解析を行うことは、ビグアニド類が示す抗がん効果のメカニズムの一部を明らかにすることができると考えられ、意義深いと思われた。そこで、フラックスアナライザーを用いてアリアルビグアニド化合物が種々のがん細胞の代謝系に与える影響についての詳細な検討を行うと同時に、フローサイトメーターを用いて Annexin V-fluorescein isothiocyanate (Annexin V-FITC) および Propidium iodide (PI) で染色した細胞の測定を行うことで細胞死についての解析を行った。

また、ビグアニド化合物の抗がん効果に関わる標的タンパク質については未だに明らかになっておらず、また、呼吸阻害の標的と考えられているミトコンドリア呼吸鎖複合体 I との相互作用の詳細についても未だに不明である²⁸。そこで、第二章では、まず、アリアルビグアニド化合物を用いた標的を同定する方法について考察した。ビグアニド基は酸性条件下でアルデヒドやケトンと反応してデヒドロトリアジン環を、塩基性条件下でエステルと反応してトリアジン環をそれぞれ形成するという特性があり、新しいクリックケミストリーとして応用することが期待できた。よって、アルデヒド、ケトンまたはエステル部位とビオチンなどの標識部位を持つ化合物、および標的タンパク質と共有結合を形成できる標識性ビグアニド化合物を合成すれば、標的タンパク質の同定が可能であると考えた。そこで今回、標的タンパク質と共有結合するビグアニドの合成を目指し、光反応標識部位を持つアリアルビグアニド誘導体の合成を目指し、トリフルオロメチルジアジリン基、アジド基、およびベンゾフェノン体の合成を試みることにした。

本 論

第一章 アリールビグアニド誘導体の構造展開

第一節 分子設計

富田らのグループによりビグアニド系化合物が UPR 阻害作用およびグルコース欠乏条件下特異的な細胞毒性を有することが報告された²⁹。我々はこれまでに、フェンホルミンの構造に着目して構造展開を行い、フェニル基の *o* 位、*m* 位、*p* 位にクロロ基やメチル基を導入することで、フェンホルミンの抗がん活性が大幅に向上することを見出し、グルコース欠乏条件下では、Cl 基と Me 基の *o*-置換誘導体が最も高いグルコース欠乏条件下選択的な細胞毒性の活性を示すこと、また、ビグアニド部位を含窒素ヘテロ環や、生物学的等価体であるカルボニルアナログの、ウレア、チオウレア、グアニジノ基等に変換した場合、活性が低下または消失したことから、ビグアニド基が活性の発現に必須であることが明らかにした²²。そこで、アリールビグアニドスキファールドに着目した構造展開として、芳香環への置換基の導入、アルキレンリンカーのホモロジーション、ビグアニド部位の N1 または N5 位への置換基の導入を行うこととした (**Figure 2**)。これらのアリールビグアニド誘導体は、対応する第一級または第二級アミンとジシアンジアミドから、Mayer らの方法³⁰を参考にしてマイクロウェーブ反応装置を用いた多様性指向合成により、効率的に得ることができると考えた。

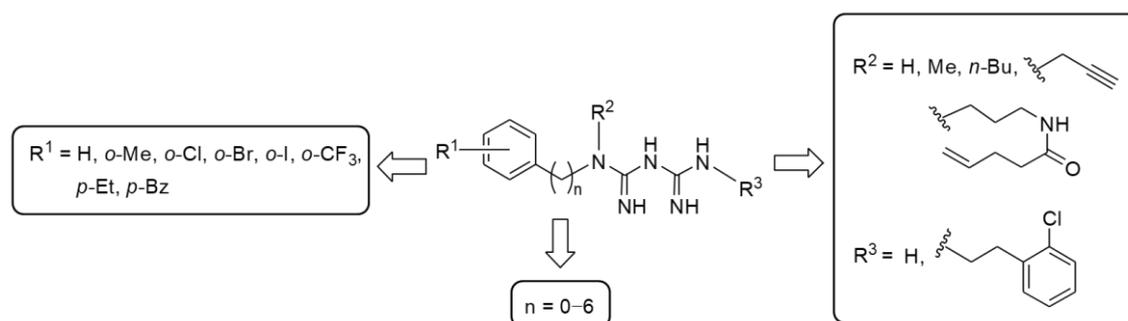
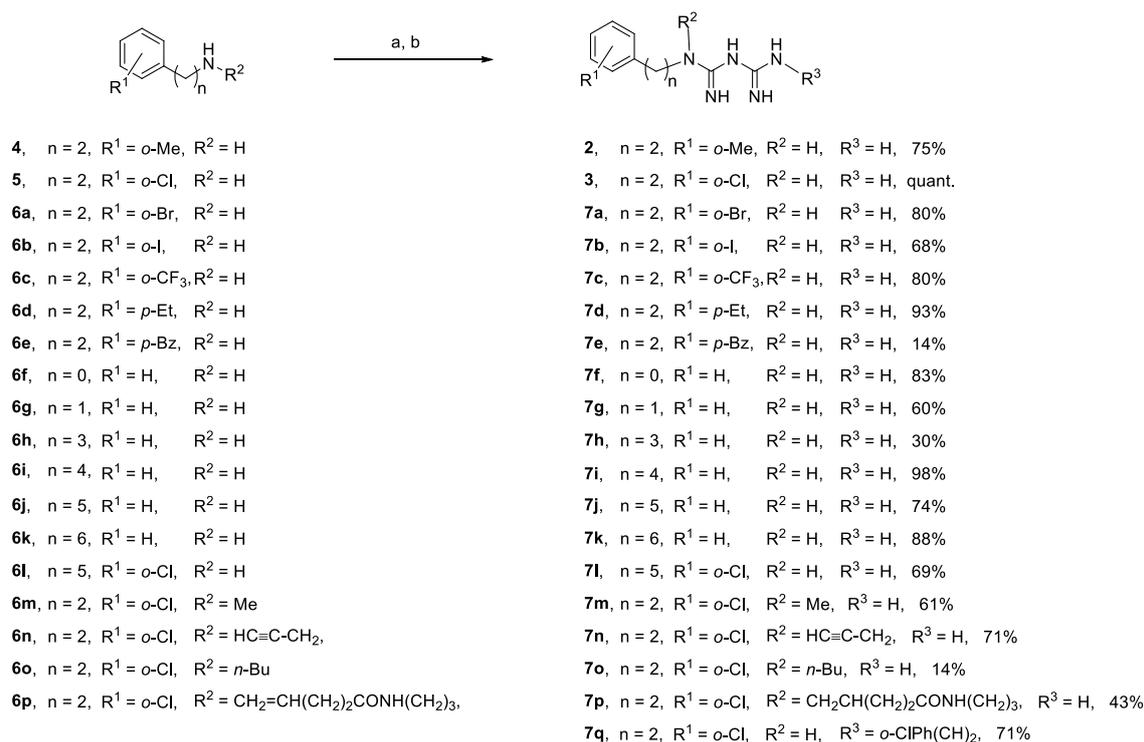


Figure 2. Structural modifications based on the aryl biguanide scaffold.

第二節 アリールビグアニド誘導体の合成

第一項 マイクロウェーブ反応によるビグアニド誘導体の合成

ビグアニドの合成は Mayer らの方法³⁰を参考にし、Scheme 1 に示すように、第一級アミン **4**、**5** および **6a–6d** と cyanoguanidine を用い、dry CH₃CN 中、TMSCl を加え、マイクロウェーブ反応を行った後、*i*PrOH を加えて、さらにマイクロウェーブ反応を行うことで、目的の各種誘導体を得ることに成功した。**7e** の合成については第 2 章で述べる。

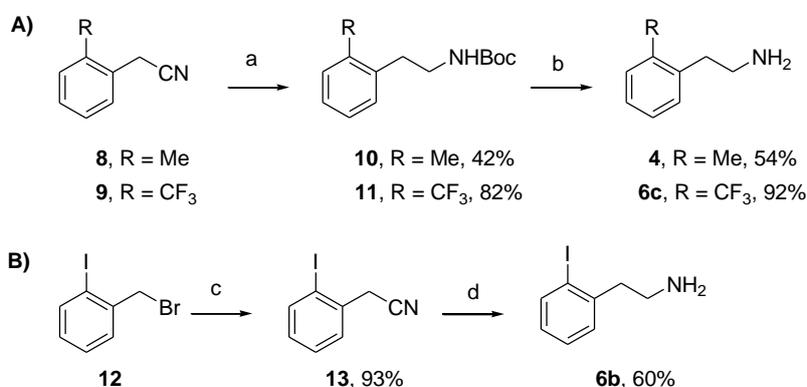


Scheme 1. Synthesis of a series of biguanides via microwave-assisted reactions. Reagents and conditions: (a) dicyandiamide, TMSCl, CH₃CN, 130 °C or 150 °C under microwave irradiation, 5–15 min; (b) *i*PrOH, 125 °C under microwave irradiation, 1 min.

第二項 各種原料アミンの合成

Scheme 1 における各種一級アミンのうち、**5**、**6a**、**6d**、**6f**、**6g**、**6h** および **6i** に関しては東京化成工業から購入したものを使用した。アミン **4** および **6c** に関しては、還元後速やかにアミンの Boc 保護ができる Butini らの方法³¹を参考にし、ニトリル体の **8** および **9** の還元反応を行い、**10** および **11** を得た。最後に、4 M HCl/EtOAc を用いて脱保護を行った後、NH シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる脱塩を行い、**4** および **6c** をそれぞれ定量的に得た。**6b** の合成に関しては、Landge らの方法³²に従ってプロモ体 **12** を KCN 存在下で還流させ、ニトリル体 **13** を得た。さらに、Wyffels らの方法³³を

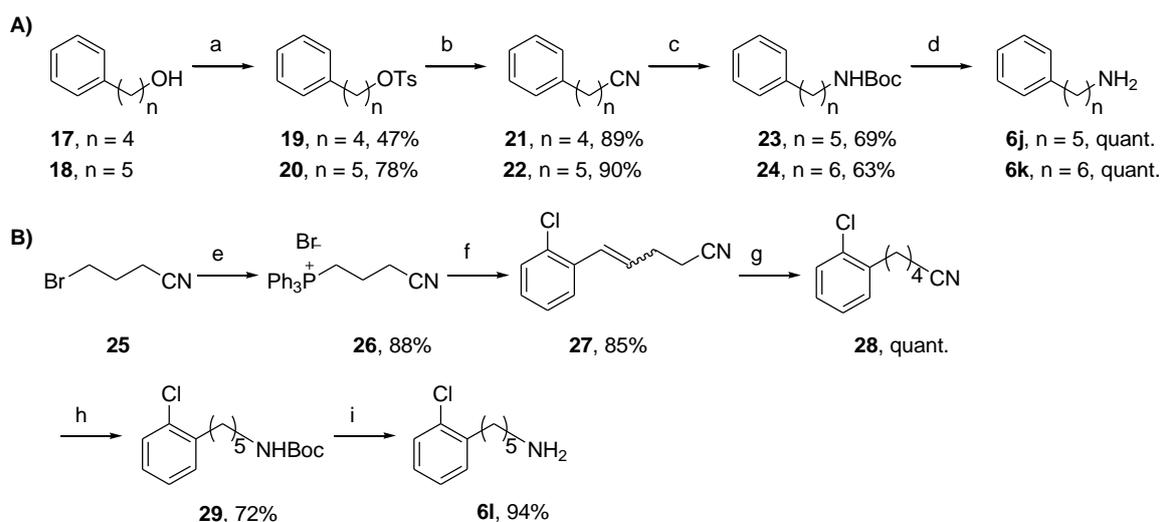
参考にニトリル体 **13** を $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ で還元し、**6b** を得た。**6e** の合成については第 2 章で述べる。



Scheme 2. Synthesis of amines **4**、**6c** and **6b**.

Reagent and conditions: A) (a) i) $(\text{Boc})_2\text{O}$, NiCl_2 , NaBH_4 , dry MeOH, 0°C to rt; ii) diethylenetriamine, rt; (b) i) 4 M HCl/EtOAc, EtOAc, rt; ii) NH silica gel column chromatography. B) (c) KCN, EtOH, reflux; (d) 0.93 M $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$, dry THF, 0°C to reflux.

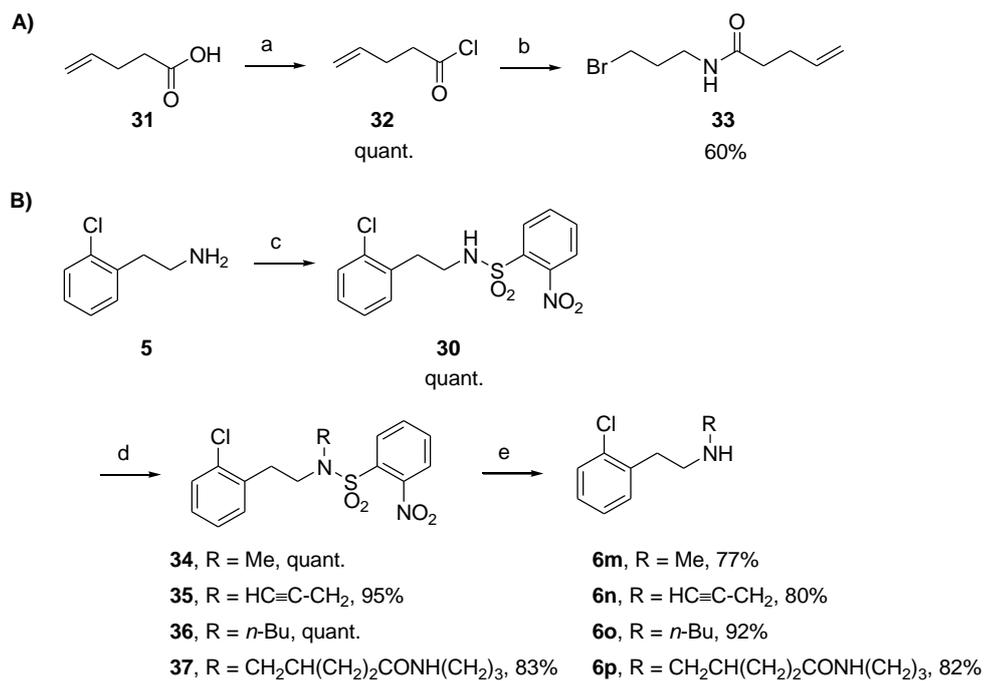
6j および **6k** に関しては、**Scheme 2** に示すように、アルコール体 **17**、**18** を出発原料として合成を行った。まず、Moussa らの方法³⁴に従い、pyridine 存在下にて、トシル化を行い、**19** および **20** を得た。続いて、Barker らの方法³⁵に従い、DMSO 中 120°C で KCN との反応を行い、ニトリル体の **21** および **22** を得た。その後の化合物 **21** から **6j** および **22** から **6k** の合成は、それぞれ **Scheme 2A** と同様の方法で行った。また、**6l** に関しては、まず Leach らの方法³⁶を参考に、Wittig 反応とオレフィンの還元を行った。 PPh_3 と 4-bromobutyronitrile **25** を toluene 中、窒素雰囲気下、加熱還流することで **26** を 88% の収率で得た。さらに、氷冷下、dry THF に sodium hydride を加えた後、**26** をゆっくり加え、窒素雰囲気下、室温で 15 min 攪拌した。その後、dry DMSO を加え、室温で 2 h 攪拌した後、2-chlorobenzaldehyde をゆっくり滴下し、さらに室温で 4 h 攪拌することで、5-(2-chlorophenyl)pent-4-enitrile の EZ 混合物 **27** を 85% の収率 (*E* 体 : *Z* 体 = 1 : 4) で得た。EZ の混合比率は $^1\text{H NMR}$ による分析にて決定した。次に、オレフィンの還元では、混合溶媒 (EtOAc : 1,4-dioxane = 4 : 1) に **27** を加え、水素雰囲気下、Pd/C 存在下、室温で 8 h 攪拌することで、**28** を定量的に得た。その後の **28** から **6l** の合成は、**Scheme 2A** と同様の方法で行った。



Scheme 3. Synthesis of amines **6j**, **6k** and **6l**.

Reagent and conditions: A) (a) TsCl, pyridine, dry CH₂Cl₂, 0 °C to rt; (b) KCN, DMSO, 120 °C; (c) i) (Boc)₂O, NiCl₂, NaBH₄, dry MeOH, 0 °C to rt; ii) diethylenetriamine, rt; (d) i) 4 M HCl/EtOAc, EtOAc, rt; ii) NH silica gel column chromatography. B) (e) PPh₃, toluene, reflux, under N₂; (f) NaH, 2-chlorobenzaldehyde, dry THF, dry DMSO, 0 °C to rt, (*E* form : *Z* form = 1 : 4); (g) Pd/C, EtOAc, 1,4-dioxane, under H₂, quant.; (h) i) (Boc)₂O, NiCl₂·6H₂O, NaBH₄, dry MeOH, 0 °C to rt; ii) diethylenetriamine, rt; (i) i) 4M HCl/EtOAc, EtOAc, rt; ii) NH silica gel column chromatography.

まず、**6p**の合成に用いるハロゲン化アルキルアミド**33**の合成に関しては、**31**と thionyl chloride を反応させ、カルボン酸塩化物**32**を定量的に得、続いて、**32**とハロゲン化アルキルアミンを用いて**33**を得た (Scheme 4A)。また、第二級アミンの合成に関しては Fukuyama らの方法³⁷を参考に一級アミン**5**を 2-nitrobenzenesulfonyl chloride を用いてノシル保護し、**30**を定量的に得た。続いて、各種ハロゲン化アルキルおよび K₂CO₃を用いて**34–37**を得た。最後に、10 M KOH aq. 及び PhSH を用いて Ns 基を脱離させることにより二級アミン**6m–6p**を得た。



Scheme 4. Synthesis of secondary amines.

Reagent and conditions: A) (a) thionyl chloride, under N₂, 55 to 80 mmHg, rt to 80 °C; (b) 3-bromopropylamine, dry Et₃N, dry CH₂Cl₂, 0 °C. B) (c) 2-nitrobenzenesulfonyl chloride, Et₃N dry CH₂Cl₂, under N₂, rt; (d) RBr, RI, or **37**, K₂CO₃, dry DMF, 60 °C; (e) PhSH, KOH, CH₃CN, 50 °C.

第三節 アリールビグアニド誘導体の構造活性相関

第一項 スクリーニング評価系

得られた化合物の生物活性のスクリーニング評価系として、がん微小環境を模倣した *in vitro* における、ルシフェラーゼアッセイおよび細胞毒性試験を行った。まず、それぞれ低酸素・低栄養条件下において誘導される HIF-1 転写活性化、UPR 活性化への影響を低酸素応答ルシフェラーゼアッセイ及び UPR 応答ルシフェラーゼアッセイにて評価した。前者は、以前に確立された HEK293 細胞へ DNA エlement として、HRE (Hypoxia Response Element) を含むルシフェラーゼ発現レポータープラスミドベクター p2.1 をトランスフェクションした安定な形質転換体を使用して行った^{22,38}。その HEK293 細胞を様々な濃度の試験化合物と正常または低酸素 (1% O₂) 条件下で 24 h インキュベートした後に、アッセイキットの手順に従ってルシフェラーゼ活性を評価し、半数阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。後者では、以前に確立された HEK293 細胞へ DNA エlement として ERSE (ER stress responsive element) を有するルシフェラーゼ発現 pGRP78pro160-luc レポータープラスミドベクター³⁹ を pcDNA3.1 ベクターと共にトランスフェクションした安定な形質転換体を使用して行った。その HEK293 細胞を様々な濃度の試験化合物と正常または 0.3 mM の 2-deoxy-D-glucose (2-DG) 処理条件下で 24 h インキュベートした後にアッセイキットの手順に従ってルシフェラーゼ活性を評価し、IC₅₀ を算出した。がん細胞株に対する細胞毒性試験では、正常またはグルコース欠乏条件下で、様々な濃度の試験化合物で処理し、48 h インキュベートした後にミトコンドリアを正常化させる目的で、培地交換を行い、正常条件に戻し、さらに 16 h インキュベートした。その細胞毒性効果は MTT 試薬 [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] を使用した細胞生存率アッセイによって評価し、IC₅₀ を算出した。

第二項 HIF-1 及び UPR 転写活性化阻害作用

アリールビグアニド誘導体のうち芳香環のオルト位にメチル (2)、塩素 (3)、臭素 (7a)、ヨウ素 (7b) トリフルオロメチル (7c) を用いた場合、およびパラ位にエチル (7d) を導入した誘導体はいずれも HIF-1 および UPR 転写活性への阻害はフェンホルミン (1) に比べて高かった (Table 1, Entry 2-7)。一方で、パラ位のベンゾイル (Bz) (7e, Entry 8) では UPR 阻害活性がフェンホルミン (1) と同程度であり、また、以前合成した *t*-Bu [IC₅₀ (HIF-1); 14.4 μM, IC₅₀ (UPR); >100]²² の置換体では、HIF-1 及び UPR の転写活性化阻害効果が、フェンホルミン (1) と同程度か、より低かった。アリールへのかさ高い置換基の導入は HIF-1 および UPR 転写活性への阻害を低くすることが分かった。

アリール-(CH₂)_n-ビグアニドの相同系列 (n = 0-6) では、疎水性が増加し、アルキレ

ンリンカーの長さが増加するにつれて HIF-1 及び UPR 転写活性化阻害作用が強くなる傾向にあり、**7j** (n = 5)、**7k** (n = 6) および *o*-クロルフェニルアナログ **7l** (n = 5) は、HIF-1 および UPR を介した転写活性化の両方に対して強力な阻害作用を示した [Table 1 (Entry 9–15), Figure 3]。

ビグアニド基にアルキル基を導入した **7m**、**7n** および **7o** は、それほど強力ではないものの、HIF-1 および UPR 阻害作用を示したが、かさ高いアルキルを含む置換基を導入した **7p** ではそれらの活性が消失した [Table 1 (Entry 16–20), Figure 3]。

第三項 低栄養条件選択的細胞毒性

アリールビグアニド誘導体のうち芳香環のオルト位のハロゲン置換基として臭素 (**7a**) またはヨウ素 (**7b**) を用いた場合、グルコース欠乏条件における選択的な細胞毒性は塩素置換基を用いた場合よりも弱かった (Table 1, Entry 3–5)。これまでの、ビグアニド誘導体の構造活性相関研究では、立体パラメータ ν ⁴⁰ は低グルコース条件下における細胞毒性と高い相関を示した²²。今回の構造展開により置換基 0.55 (Cl)、0.65 (Br)、0.78 (I)、0.91 (CF₃)、0.52 (Me) および 0.56 (Et) の ν 値を考慮すると、グルコース欠乏条件下での細胞毒性は、置換位置にかかわらず、ハロゲンまたは ν 値が 0.5 から 0.8 の比較的小さなアルキル基が芳香環に置換することで増強されることが分かった (Table 1, Entry 1–8)。一方、Bz (**7e**, Entry 8) およびパラ位の *t*-Bu [ν ; 1.24, IC₅₀ (Glc -); 23.4 μ M]²²などの、よりかさ高い置換基の導入により、グルコース欠乏条件下の細胞毒性は有意に低下した。これらのことから、アリールビグアニド類の芳香環の置換基に関しては電子的な効果よりも立体効果が細胞毒性の活性に寄与しており、適切な大きさの置換基の導入はグルコース欠乏条件選択的な細胞毒性の活性を向上させるということが明らかとなった。

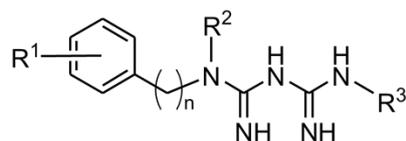
アリール-(CH₂)_n-ビグアニドのホモロゲーションでは、リンカー鎖長の伸長に従い疎水性が増加する (Table 1, Figure 4)。アルキレンリンカーの長さで細胞毒性の活性は (n = 0, 3–6) では正の相関を示したが、n = 1 および 2 では正の相関を示さなかった [Table 1 (Entry 9–14), Figure 3]。ホモロゲーションによりさらに疎水性が向上したことで、n = 0, 3–6 では細胞膜透過性と細胞毒性の関係が正の相関を示すようになったと考えられる。特に、**7j** (n = 5)、**7k** (n = 6) および *o*-クロルフェニルアナログ **7l** (n = 5) は、グルコース欠乏条件下ではグルコース存在下に対し、高い選択的細胞毒性を示した [Table 1 (Entry 13–15)]。

N1 または N5 位に置換基を有する二置換ビグアニドについては、Table 1 に示す **7m**、**7n** および **7o** は、フェンホルミンと同程度の低グルコース選択的な細胞毒性を示した [Table 1 (Entry 16–18), Figure 3]。また、かさ高いアルキル置換基を導入した **7p** および **7q** ではグルコース欠乏条件下に対する選択的な細胞毒性が消失した [Table 1 (Entry

19, 20), **Figure 3**]

これまでの検討より、アリールビグアニド類のビグアニド基をウレア基やチオウレア基のようなビグアニド基よりも塩基性の低いバイオイソスター置換基に変換したことでグルコース欠乏条件下選択的な細胞毒性の活性が消失することが分かっていた²²。今回、ビグアニド基の窒素への置換基の導入によってグルコース欠乏条件下選択的な細胞毒性の活性が低下または消失し、また、前項で述べたとおり、HIF-1 および UPR 阻害活性も同様に低下または消失した。以上により、これらの生理活性にはビグアニド基が必須であり、かつ、ビグアニド基への置換基の導入においても同様に生理活性を消失させることが明らかとなった。

Table 1.



Entry	Compd.	n	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ of transactivation (μM)		IC ₅₀ of cytotoxicity (μM) ^c		Selectivity ^d Glc+/Glc-	R _m	c log D ^f (pH 7.4)
						HIF-1 ^a	UPR ^b	Glc+	Glc-			
1	1	2	H	H	H	27.4 ± 6.1 ^g	107.8 ± 9.4 ^g	972.6 ± 95.0 ^g	46.2 ± 9.2 ^g	21.1 ^g	-0.010	-6.64 ^g
2	2	2	<i>o</i> -Me	H	H	6.0 ± 0.1 ^g	87.9 ± 4.9 ^g	403.1 ± 31.2 ^g	7.2 ± 3.5 ^g	56 ^g	0.092	-6.50
3	3	2	<i>o</i> -Cl	H	H	5.8 ± 0.3 ^g	37.4 ± 3.1 ^g	350.4 ± 11.9 ^g	5.2 ± 0.7 ^g	67.4 ^g	0.15	-6.39
4	7a	2	<i>o</i> -Br	H	H	3.1 ± 0.4	29.9 ± 9.4	217.6 ± 11.2	7.3 ± 0.5	29.8	0.41	-6.32
5	7b	2	<i>o</i> -I	H	H	4.6 ± 0.4	23.6 ± 1.4	230.3 ± 48.8	14.1 ± 1.1	16.3	0.48	-6.16
6	7c	2	<i>o</i> -CF ₃	H	H	5.0 ± 0.3	89.2 ± 4.5	316.6 ± 10.6	15.8 ± 0.7	20	N.D.	-6.02
7	7d	2	<i>p</i> -Et	H	H	3.0 ± 0.3	41.3 ± 6.8	80.3 ± 4.4	6.1 ± 1.1	13.2	0.46	-6.52
8	7e	2	<i>p</i> -Bz	H	H	4.6 ± 0.6	92.1 ± 11.4	217.5 ± 13.8	28.7 ± 2.7	7.6	0.63	-5.94
9	7f	0	H	H	H	> 100	> 100	> 1000	> 1000	N.D.	N.D.	-4.83
10	7g	1	H	H	H	54.7 ± 8.6	126.6 ± 19.8	105.3 ± 10.1	31.0 ± 7.8	3.4	-0.036	-6.73
11	7h	3	H	H	H	27.7 ± 6.1	86.8 ± 22.3	407.4 ± 80.8	86.9 ± 9.4	4.7	0.28	-6.57
12	7i	4	H	H	H	9.4 ± 0.4	38.8 ± 4.2	228.8 ± 13.8	12.3 ± 2.3	18.6	0.43	-6.49
13	7j	5	H	H	H	2.0 ± 0.1	9.6 ± 0.3	84.3 ± 11.7	3.0 ± 1.1	28.1	0.58	-6.40
14	7k	6	H	H	H	1.3 ± 0.2	5.5 ± 0.6	27.1 ± 1.3	1.9 ± 0.3	14.3	0.80	-6.30
15	7l	5	<i>o</i> -Cl	H	H	1.0 ± 0.1	7.5 ± 0.1	24.0 ± 1.4	1.9 ± 0.1	12.6	0.57	-6.05
16	7m	2	<i>o</i> -Cl	Me	H	29.0 ± 3.0	116.3 ± 13.1	224.7 ± 72.9	43.0 ± 7.9	5.2	0.36	-4.70
17	7n	2	<i>o</i> -Cl		H	48.5 ± 2.4	148.2 ± 31.7	94.1 ± 9.3	24.2 ± 5.6	3.9	0.63	-4.20
18	7o	2	<i>o</i> -Cl	<i>n</i> -Bu	H	40.7 ± 6.4	96.6 ± 19.6	42.4 ± 14.6	21.7 ± 4.1	2.0	0.55	-4.05
19	7p	2	<i>o</i> -Cl		H	> 100	> 100	> 300	> 300	N.D.	-0.010	-3.76
20	7q	2	<i>o</i> -Cl	H		N.D.	N.D.	17.6 ± 1.0	18.2 ± 1.7	1.0	N.D.	-5.09

Inhibitory activities for HIF-1- and UPR-mediated transcriptional activation and cytotoxicity of biguanides. ^aIC₅₀, 50% inhibitory concentration (mean ± SD, n = 3). Determined by luciferase assay using HEK293 p2.1 #3 cells following 24 h of drug treatment under hypoxia. ^bDetermined by luciferase assay using HEK293 GRP78 #85 cells following 24 h of drug treatment with 0.3 mM 2-DG. ^cDetermined by MTT assay on HT29 cells following 48 h of drug treatment in the presence (Glc +) or absence (Glc -) of glucose. ^dCalculated by IC₅₀ (Glc +)/IC₅₀ (Glc -). ^eR_m, hydrophobic parameter^{29,30} calculated as described in the Experimental Section. ^fCalculated by DS Accord for Excel ver. 7.1.5 (Accelrys Software, Inc., Santa Clara, CA, USA). ^gData from ref. ²². N.D., not determined. Concentration response curves for biguanide **2**, **3** and **7l** can be found in the **Figure 5A**.

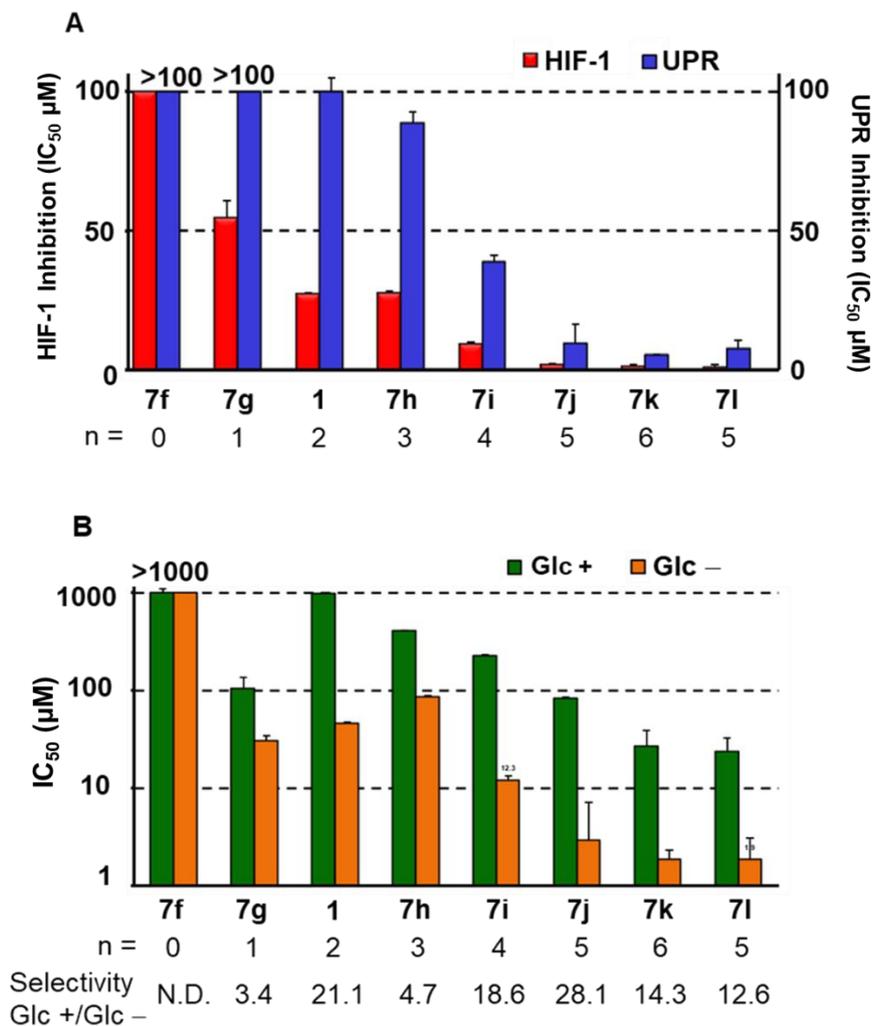


Figure 3. (A) IC₅₀ for HIF-1- and UPR-dependent transcriptional activation of biguanides with different alkylene linker chain lengths. HEK293 p2.1 #3 and HEK293 GRP78 #85 cells were treated with **7f–7l** for 24 hours under hypoxic or 0.3 mM 2-DG conditions, respectively. (B) IC₅₀ of cytotoxicity on HT29 by treatment with biguanides. Cells were treated with **7f–7l** for 48 h in the presence (Glc +) or absence (Glc -) of glucose.

第四項 疎水性パラメータの検討

オクチルシリル化シリカゲルプレート (60RP-8F₂₅₄S)^{41,42}を用いて、TLC 相関係数 (R_f) から算出した R_m 値により評価し、生理的 pH での分布係数である $\log D$ ($\text{clog } D$) も算出した。Figure 4 に示す通り相同性系列データの回帰分析の結果、アルキレンリンカーのメチレン数と疎水性パラメータ (R_m ; $R^2=0.9758$, $\text{clog } D$; $R^2=0.9971$) との間には、非常に高い正の相関があり、 R_m と $\text{clog } D$ の値 ($R^2 = 0.9699$) の間にも、非常に高い正の相関があった。71 の R_m 値は、回帰直線上では同じリンカー長 ($n=5$) の 7k とほぼ等しかったが、その $\text{clog } D$ は疎水性側への回帰直線から大きく外れていた。そこで、疎水性パラメータとしては実測値の R_m 値を選択し、一置換ビグアニド類について各生物活性の IC_{50} と R_m 値との相関を解析した [Table 1 (Entry 1–15)]。興味深いことに、UPR 媒介転写活性化阻害活性の IC_{50} は R_m 値と相関していた ($R^2 = 0.8653$, Figure 4B)。しかし、HIF-1 介在性転写活性化および細胞毒性 ($G +$ および $G -$) の IC_{50} は、いずれの場合も R_m 値との相関は低かった ($R^2=0.5-0.7$, Figure 3, 4B–D)。メトホルミンを含むアルキルビグアニド類は中性 pH では正に帯電しており、疎水性が低いため、細胞内への取り込みを促進するために有機カチオン輸送体 (OCT) を必要とする⁴³。一方、メトホルミンよりも疎水性の高いフェンホルミンは一部 OCT を介さず、細胞膜を直接浸透する取り込み経路が報告されている⁴⁴。これに対して、ここで示したビグアニド類の多くは、 R_m 値から予測されるようにフェンホルミンよりも疎水性が高く、直接拡散によって細胞膜を透過することが示唆された。したがって、がん微小環境を標的としたこれらの生物学的活性において、疎水性因子は重要な意味を持つと考えられる。

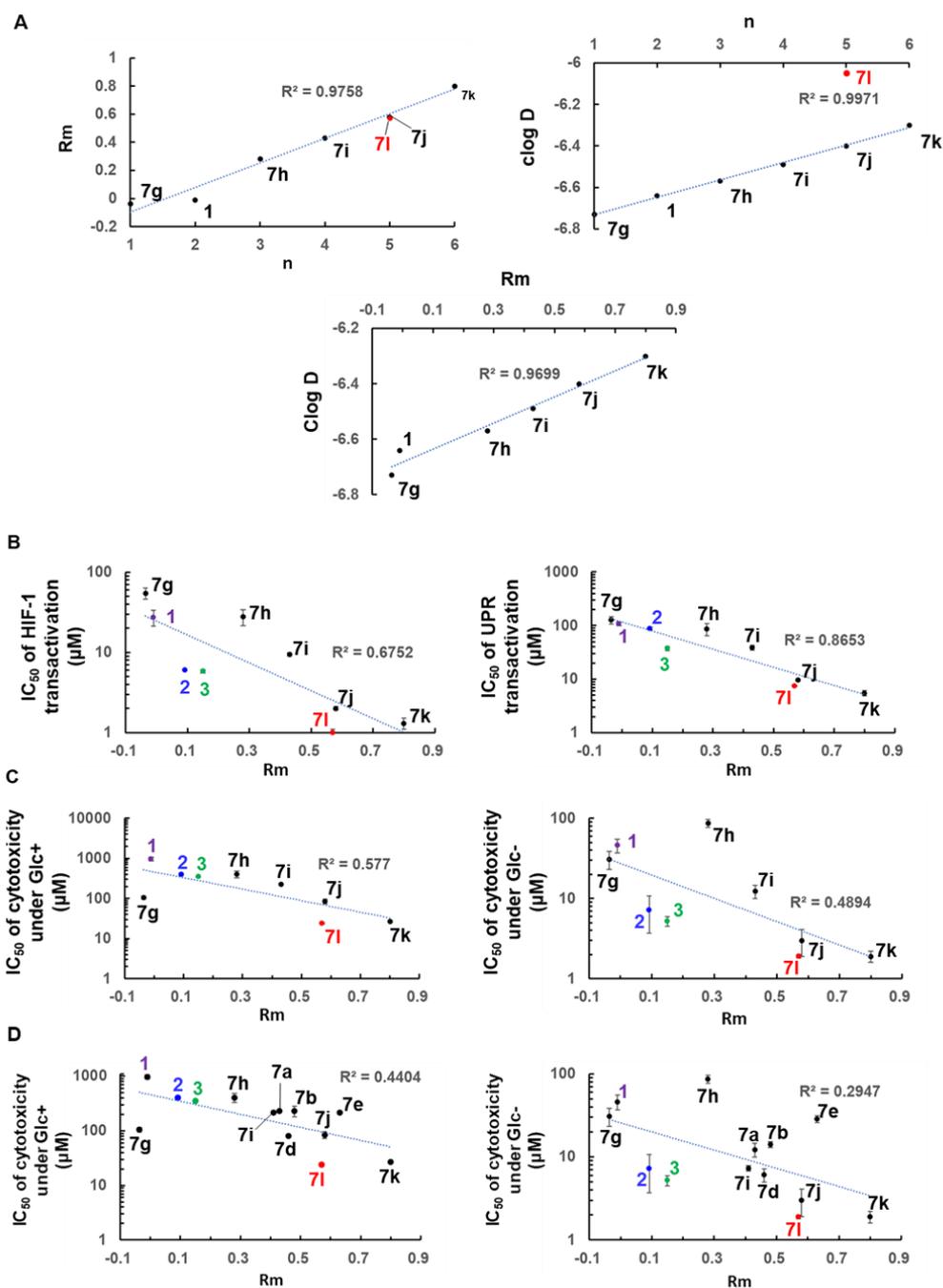


Figure 4. (A) Correlation between clog D, Rm values and alkylene linker length for compounds **1** and **7g–7k**. (B) Correlation between Rm values and the IC₅₀ values of HIF-1 or UPR transactivation for compounds **1–3** and **7g–7l**. (C) Correlation between Rm values and the IC₅₀ values of cytotoxicity under Glc + or Glc - for compounds **1–3** and **7g–7l**. (D) Correlation between Rm values and the IC₅₀ values of cytotoxicity under Glc + or Glc - for compounds **1–3**, **7a**, **7b**, **7d**, **7e** and **7g–7l**. The R² values were calculated by linear approximation in (A) or (B) and exponential approximation in (C) or (D).

第四節 アリールビグアニド誘導体の生物活性に関する評価

第一項 各種がん細胞における低栄養選択的細胞毒性

ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 は HT29 細胞に比べて、よりエネルギー代謝が解糖系に依存しており、また、ヒトグリア芽種 U87MG はミトコンドリアに機能障害があり、解糖系優位であることが報告されている^{45,46}。そこで、第三節の検討により、高い抗がん活性を示した化合物 **2**、**3** および **7I** について、HT29、A549 および U87-MG を対象に、グルコース欠乏条件下選択的な細胞毒性を評価した (Table 2, Figure 5)。これらの試験化合物の中で、**7I** は、試験したすべての細胞株において、グルコース欠乏条件下で最も強力な細胞毒性を示した。また、ヒトグリア芽腫は、ミトコンドリア呼吸と解糖系の代謝をリプログラミングすることで、高悪性度を示すことが報告されているが⁴⁷、**7I** は **2**、**3** と異なり、ヒトグリア芽種 U87MG に対しても、他の腫瘍細胞と同等の細胞毒性を示したことは注目すべきことである。

Table 2.

Compd.	Cell	IC ₅₀ of Cytotoxicity (μM)		Selectivity Glc. (+)/Glc. (-)
		Glc. (+)	Glc. (-)	
2	HT29	403.1 ± 31.2 ^a	7.2 ± 3.5 ^a	56.0 ^a
	A549	232.5 ± 13.9	13.2 ± 1.9	17.6
	U87MG	214.6 ± 2.7	37.1 ± 8.2	5.8
3	HT29	350.4 ± 11.9 ^a	5.2 ± 0.7 ^a	67.4 ^a
	A549	127.2 ± 27.1	4.4 ± 0.3	28.9
	U87MG	193.3 ± 22.6	21.8 ± 1.8	8.9
7I	HT29	24.0 ± 1.4	1.9 ± 0.1	12.6
	A549	17.4 ± 4.3	2.6 ± 1.4	6.7
	U87MG	23.8 ± 1.4	9.4 ± 4.5	2.5

Cytotoxicity of **2**, **3**, and on HT29, A549 and U87MG cells. IC₅₀ (mean ± SD, n = 3) was determined by MTT assay on each cell following 48 h of drug treatment in the presence (Glc +) or absence (Glc -) of glucose. ^aData from ref. ²². Concentration response curves for biguanide **2**, **3** on A549 and U87MG and **7I** on HT29, A549 and U87MG can be found in the Figure 2.

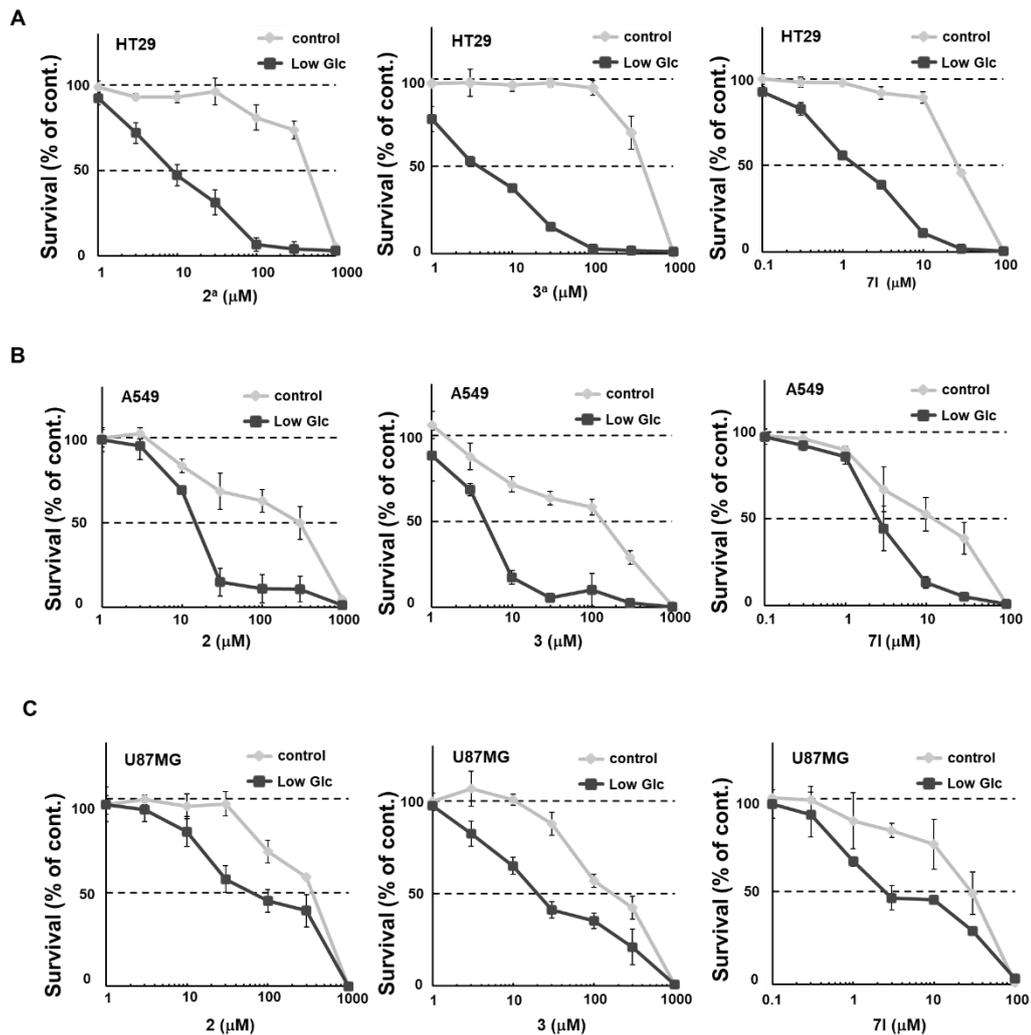


Figure 5. Concentration response curves in cell viability assay on HT29 (A), A549 (B) and U87MG (C) with **2**, **3** and **71** in normal or glucose-free medium. MTT assay using HT29 (A), A549 (B) and U87MG (C) cells was performed with **2**, **3** and **71** under normal or glucose deprivation conditions for 48 hours. Each point represents mean \pm SD of triplicate experiments.
^aData from ref. ²².

第二項 HIF-1 α および GRP78 タンパク質発現阻害

HIF-1 は α と β の異なる 2 つのサブユニットからなる。正常な組織において β サブユニット (HIF-1 β) は恒常的に発現しているが、 α サブユニット (HIF-1 α) の安定性と発現量は、翻訳後修飾と転写調節で厳密に制御されている⁴⁸。したがって、HIF-1 の転写活性化能は HIF-1 α タンパク質の発現量にも依存している。

また、腫瘍組織の細胞内小器官小胞体において正常に折り畳まれなかったタンパク質の増加が感知されると、UPR が強化され、異常タンパク質の正常化に分子シャペロンタンパク質 GRP78 や GRP94 の発現が誘導され、重要な役割を果たす⁴⁹。よって、第三節、第二項のスクリーニングの結果より、高い抗がん活性を示した化合物 **71** について、HIF-1 α の発現および UPR 介在タンパク質の発現に対する効果を検討した。化合物 **71** は、化合物 **2**²² および **3**²² の有効濃度の 10 分の 1 である 1 μ M の濃度で、低酸素下で誘導される HIF-1 α タンパク質の発現を有意に抑制した (**Figure 6A**)。さらに、化合物 **71** は、3 μ M の濃度でグルコース欠乏による UPR の主要な調節因子である GRP78 および GRP94 のタンパク質発現誘導を有意に阻害した (**Figure 6B**)。これらの阻害活性は、上述の HIF-1 α および UPR が介在する転写活性化阻害作用の傾向 (**Table 1**, Entry 2, 3 and 15) と一致していた。

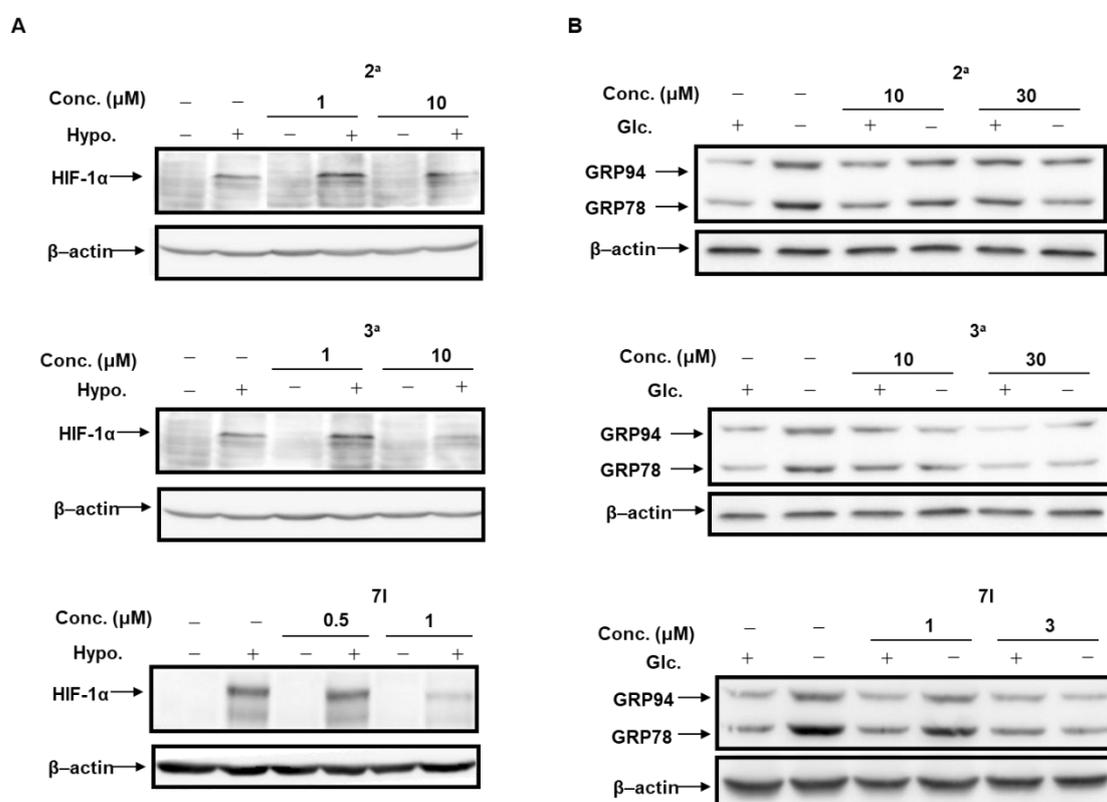


Figure 6. Inhibition of **2**, **3** or **71** on protein expressions of HIF-1 α induced under hypoxia or GRP78 and GRP94 by glucose deprivation. Immunoblot analysis of HIF-1 α (**A**), GRP78 and GRP94 (**B**). (**A**) HT29 cells were incubated with compounds **2**, **3** or **71** for 4 hours under normoxic (20% O₂) (Hypo. -) or hypoxic (1% O₂) (Hypo. +) conditions. (**B**) HT29 cells were treated with compounds **2**, **3** or **71** for 24 hours in normal (2000 mg/L glucose, Glc +) or glucose-free (Glc -) medium. ^aData from ref. 22.

第三項 血管新生阻害作用

固形がんの増大には栄養や酸素の供給が必要なため、血管新生の誘導は、がん微小環境におけるストレス適応応答やエネルギー代謝における表現型のリプログラミングに深く関わる。70年以上前に、腫瘍由来の「血管成長刺激因子」が存在し、成長する腫瘍に新生血管を供給する役割を果たしているという仮説が立てられた⁵⁰。1970年代初頭には「血管を標的とするがん治療」という概念が提唱され^{51,52}、近年の血管新生の分子メカニズムの解明につながり、その結果、進行性大腸がんに対する血管内皮増殖因子(VEGF)を標的とする中和抗体が開発されてきた。日本においても2007年に大腸がんの治療薬としてベバシズマブが、2015年に胃がんの治療薬としてラムシルマブが、2017年にアフリベルセプトが大腸がんの治療薬としてそれぞれ承認された。その他、低分子チロシンキナーゼ阻害剤(スニチニブ、ソラフェニブ、パゾパニブ)、可溶性VEGFデコイ受容体(アフリベセプト)、VEGF受容体2ヒト化モノクローナル抗体(ラムシルマブ)などのVEGF経路阻害剤ががん治療薬として開発され、広く使用されている^{53,54}。このような背景より血管新生阻害効果の評価は創薬研究において重要である。

ビグアニド化合物であるメトホルミンはAMPK依存的にVEGF発現および血管新生阻害作用を示すことが報告されており⁵⁵、さらに、分子シャペロンタンパクGRP78が、固形がんの血管新生において重要な役割を果たしていることが示唆されていることから^{56,57}、今回得られた高い活性を示すアリアルビグアニド誘導体の血管新生阻害作用について検討した。評価系としては、Folkmanによって導入された鶏卵漿尿膜(CAM)法^{58,59,60}を用い、*in vivo*における血管新生阻害効果を評価した。

フェンホルミンとメトホルミンは、血管新生関連タンパク質の産生を減少させることにより、血管新生を阻害することが報告されている¹⁷。我々は以前にフェンホルミン、**2**および**3**は、それぞれ5 µg/CAMと2 µg/CAM新生血管を阻害することを示したが²²、**Figure 7**に示すように、**71**はより低い用量である0.5 µg/CAMで顕著な血管新生を阻害することが明らかとなった。

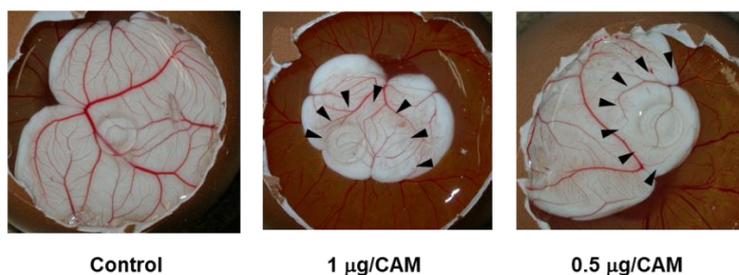
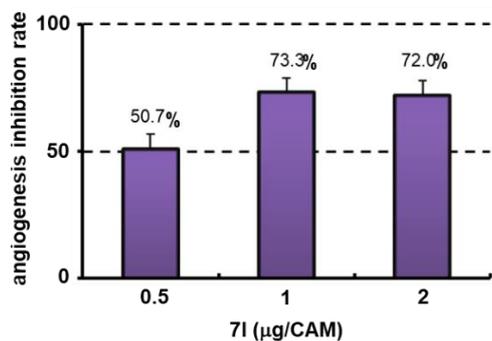


Figure 7. Antiangiogenic effects of compounds **71** in CAM assay. The CAMs of 4-day-old chick embryos were treated with compounds for 2 days. Antiangiogenesis ratios of **71**, calculated from the following formula: antiangiogenesis ratio (%) = $(1 - [\text{control point}/\text{drug point}]) \times 100$. Eight to ten eggs were used in total for each condition. Pictures of **71** treated CAM show avascular zone around the silicon ring where the test compounds were administered.

第四項 エネルギー代謝に与える影響

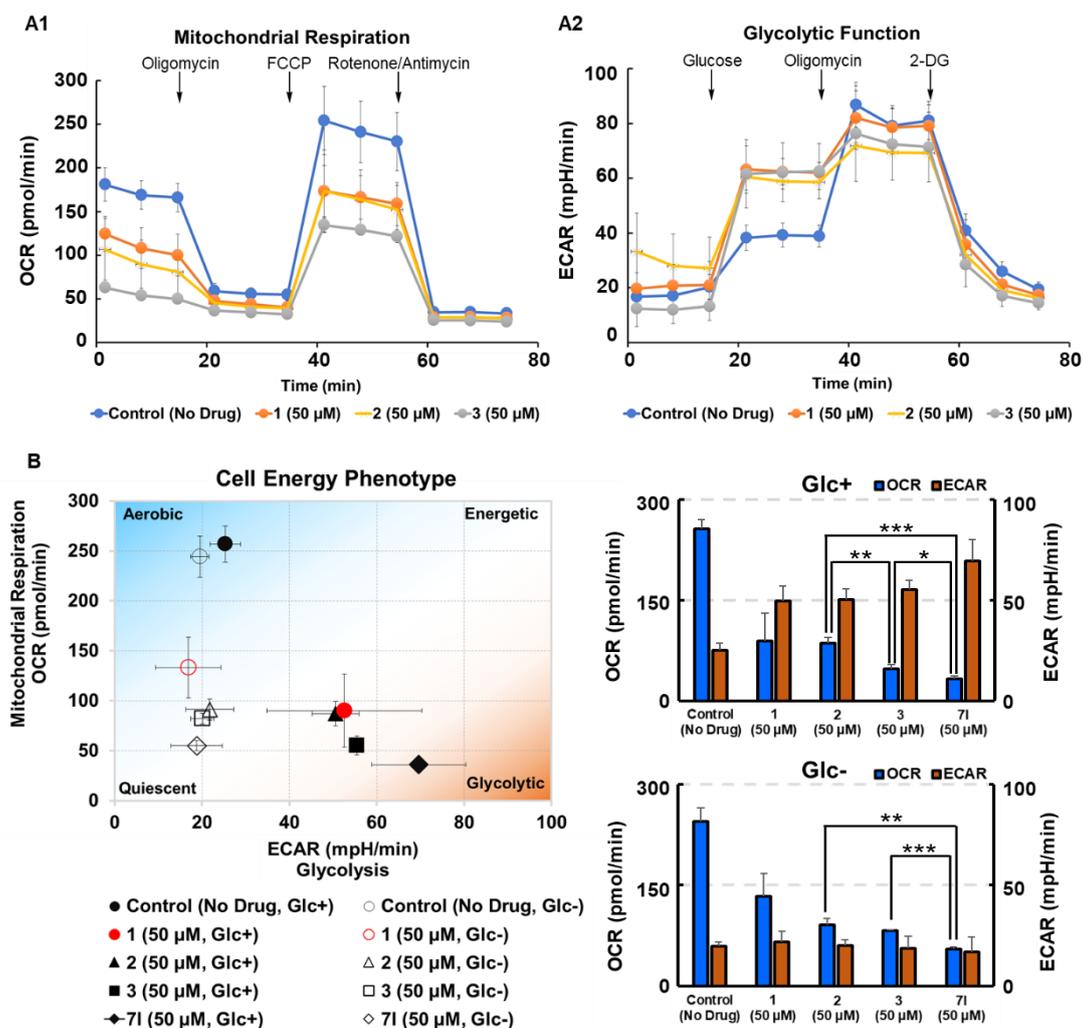
Birsoy らは、低グルコース条件下では OXPHOS 阻害剤であるピグアニド類に対するがん細胞の感受性が高まること、また OXPHOS がこのような条件下でがん細胞の最適な増殖に必要な主要な経路であることを実証した⁶¹。そこで、新規アリアルピグアニド類の腫瘍細胞のエネルギー代謝への影響を調べるために、XFp 細胞外フラックス分析装置 (Seahorse Bioscience 社)^{62,63} を用いて、正常および低グルコース条件下の HT29 細胞を対象に、酸素消費率 (OCR) を指標としたミトコンドリア機能と細胞外酸性化率 (ECAR) を指標とした解糖能の評価を行った。ECAR は、主に乳酸産生の測定値であり、解糖速度に相当する。Seahorse Bioscience 社のプロトコル (ミトコンドリアストレステスト・グリコリシステスト) に従い、細胞呼吸に修飾する薬剤 (ATP 合成酵素阻害剤オリゴマイシン、ミトコンドリア脱共役剤アンカプラー FCCP、複合体 I/III 阻害剤のロテノンとアンチマイシン A、グルコースおよび 2-DG) の連続的な添加に対応させて、アリアルピグアニド **1**、**2** および **3** の存在下または非存在下で HT-29 細胞の OCR と

ECAR の変化を測定し、エネルギープロファイルを得た。**Figure 8A** に示すように、ミトコンドリア内膜中の酸化リン酸化 (OXPHOS) に由来するミトコンドリアの基底呼吸および最大呼吸は、50 μM の濃度で **1** および **2** よりも **3** によって、より強く阻害され、解糖系に由来する ECAR は、OXPHOS を補償するために増加し、この増加は **3** が最大であった。また、ミトコンドリアストレステストのプロファイルから ATP 産生量を見積もると、**3** が最も強く ATP 産生を抑制していた (**Figure 8A1, 8C**)。

さらに、エネルギー表現型の情報を得るために、ミトコンドリア機能のプロファイルの最初の 15 分間の 3 点で測定した OCR 値と、同時に測定した ECAR 値の各平均値 (基底呼吸) を、グルコース存在下でのビグアニド類の呼吸抑制活性とした。同様に、解糖能プロファイルから求めた ECAR と OCR の平均値を、グルコース欠乏条件下での呼吸抑制活性とした。次に、非 CO_2 インキュベーター中で、10 mM のグルコース (Glc +) およびグルコース欠乏条件下で、HT29 をアリアルビグアニド **1**、**2**、**3** および **7I** で処理した後、OCR および ECAR を測定した。**3** および **7I** は、グルコースの存在下で 50 μM の濃度で、HT-29 細胞における OCR を有意に抑制し、**1** および **2** と比較して ECAR を増強した (**Figure 8B**)。一方、グルコース欠乏条件下では、OCR と ECAR の両方が抑制された。特に、**7I** は、グルコース存在下での非ミトコンドリア酸素消費量のレベルまで OCR を完全に減少させた (33.4 pmol/min)。正常およびグルコース欠乏条件下の両方でビグアニド処理した種々の細胞の ECAR と OCR の間の相関について、エネルギー表現型プロファイルの図として、**Figure 8B** および **Figure 9A-E** に示した。

各培養条件下での腫瘍細胞のエネルギーに対する様々な腫瘍細胞株の応答は、それらの代謝ポテンシャルを反映している。ヒト肺基底上皮腺癌細胞 A549 は HT29 細胞よりも解糖系に依存していることが報告されており⁴⁵、また、ヒトグリア芽種 U87MG は通常の条件下で他の細胞と比較して低 OCR および高 ECAR の Warburg 表現型を示す可能性示唆されている⁴⁶。A549 および U87MG はグルコース存在下から非存在下への変化に対応する、酸化リン酸化優位から解糖系優位の表現型に向うエネルギー代謝のリプログラミング能力が HT29 細胞よりも高い傾向にあった (**Figure 9A-E**)。Table 2, **Figure 5** より、特に U87MG 細胞においてアリアルビグアニド類処理によるグルコース欠乏条件下選択的細胞毒性の活性が HT29 細胞よりも劣っており、これは、グリオーマのリプログラミング能力の高さが治療抵抗性を誘導するという報告と一致する⁴⁷。**Figure 8B, 9** より、ビグアニドの存在により、すべての細胞株でグルコースの存在下と非存在下の両方で OCR の有意な減少につながっており、また、HT29 細胞におけるエネルギー代謝リプログラミングへの阻害の強さの順序は、**7I** > **3** > **2** > **1** の傾向にあった。さらに、**7I** は、グルコースの存在下において、より強力な OXPHOS の阻害および ECAR の増加をもたらした。以上より、アリアルビグアニド誘導体は、グルコース欠乏条件下において腫瘍細胞の OXPHOS を阻害し、エネルギー枯渇を誘導することで、グルコース欠乏条件選択的な細胞毒性を示すものと考えられ、特に **7I** はこの活性が高かった。

グルコース存在下で、OXPHOS 阻害により ATP の産生が制限されると、AMPK の活性化を介して HIF-1 α シグナルが活性化することにより、解糖系が活性化され ECAR が増強することが予想される。一方、71 は、OXPHOS 阻害濃度よりも低濃度で HIF-1 α のタンパク質発現と転写活性化を強く阻害したことから、上記の HIF-1 α シグナル活性化によるエネルギーリプログラミングが働かないため、アシドーシスのリスクが一部回避できる可能性があると予想された。さらに最近、南島らは、肝臓でのみ prolyl hydroxylase domain-containing protein 2 (PHD2) を不活性化するとアシドーシスを回避できることを見出し、PHD2 阻害剤によるアシドーシスの治療戦略を提案している⁶⁴。PHD2 阻害剤の経口投与により、肝臓の HIF-1 シグナル伝達が活性化されるとコリ回路が増強され、乳酸の減少が促進するものと考えられる。今後このような治療法が確立されれば、PHD2 阻害剤などを併用することにより、ビグアニド類によるアシドーシスの問題を克服できる可能性がある。



C

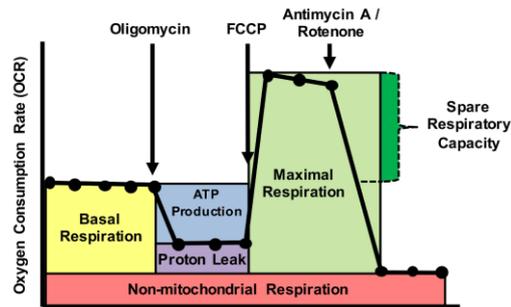


Figure 8. Influence of biguanides on the energy metabolism of HT29 in the presence or absence of glucose. **(A1)** Changes in OXPHOS-linked OCR (MitoStress test profile). HT29 cells were treated with 50 μM of **1**, **2**, and **3** in assay medium (glucose, 10 mM) for 1 hour, and then the OCR was measured over time using an XFp extracellular flux analyzer while sequentially injecting mitochondrial respiratory chain inhibitors (1.5 μM oligomycin, 2 μM FCCP, 0.5 μM rotenone/antimycin A). **(A2)** Changes in glycolysis-linked ECAR (Glycolysis Stress Test Profile). HT29 cells were treated with 50 μM of **1**, **2**, and **3** in glucose-free assay medium for 1 hour, and then the ECAR was measured over time while sequentially injecting glucose (10 mM), Oligomycin (1 μM) and 2-DG (50 mM). **(B)** Cell energy phenotype profile of HT29 cells treated with biguanides. After the treatment with 50 μM of **2**, **3**, and **7I** in glucose-containing (Glc+) or non-glucose (Glc-) assay medium for 1 h, OCR and ECAR were measured three times in 15 min by XFp extracellular flux analyzer. The differences in OCR values between each compound treatment were statistically significant (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$). **(C)** The MitoStress test profile shows the main indicators of mitochondrial function: basal respiration, ATP production, proton leak, maximal respiration and reserve respiratory capacity⁶⁵.

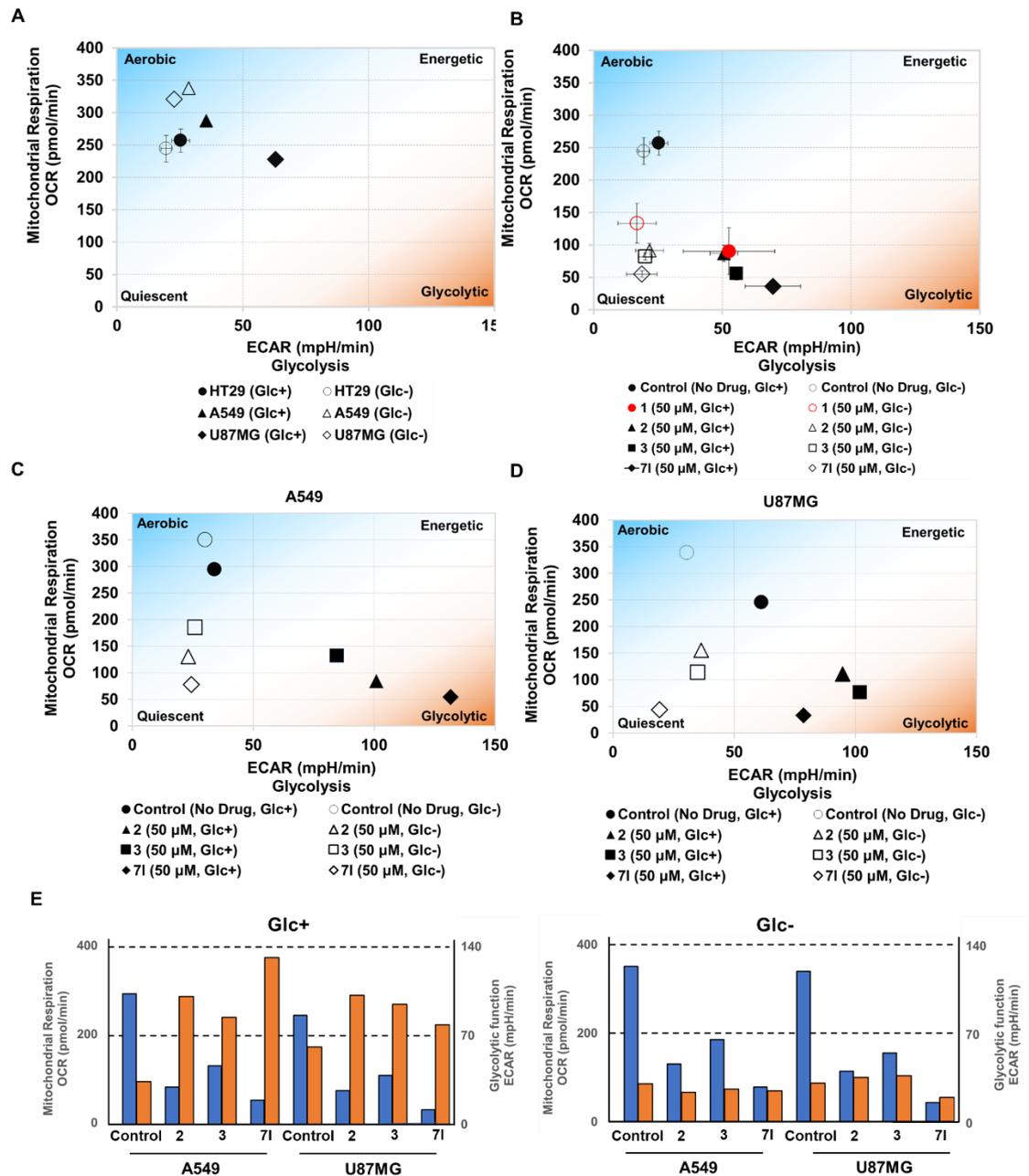


Figure 9. Cell energy phenotype profiles of HT29, A549 and U87MG. (A) Diagram of energy phenotypes of HT29, A549 and U87MG cells under normal (Glc +) or glucose free (Glc -) conditions. The energy phenotype of HT29 (B), A549 cells (C), and U87MG cells (D) treated with 2, 3 and 71. (E) OCR (Blue) and ECAR (Orange) of A549 and U87MG cells treated with treated with 2, 3 and 71 under normal (Glc +) or glucose free (Glc -) conditions. Results for U87MG and A549 are from a single measurement.

第五項 細胞死に関する解析

ビグアニドの抗増殖活性は乳がん細胞のアポトーシス誘導を介しており、グルコース欠乏条件下で顕著に増強されることが報告されている⁶⁵。HT29細胞をそれぞれ10 μM、10 μM および 5 μM の濃度で化合物 **2**、**3** および **71** で 48 時間処理した後、トリプシン化を行い、染色し、FACS 分析に供した。低グルコース培地中での化合物 **2**、**3** および **71** での処理により誘導された初期 (AnnexinV-FITC+/PI-) および後期 (AnnexinV-FITC+/PI-) アポトーシスの合計比は、それぞれ 53.8%、47.9% 及び 70.8% であった (**Figure 10**)。一方、通常の培地 (グルコース ; 2000 mg/L) で同様の処理を行った場合、細胞死は最小限に抑えられており、ビグアニド処理はグルコース欠乏条件下で選択的にアポトーシスを促進したことが示唆された。第四項で述べた通り、グルコース欠乏条件下においてエネルギー枯渇を導いたこと、および本項の結果は、前立腺癌細胞においてメトホルミンと 2-DG による解糖系およびミトコンドリア呼吸の阻害によるエネルギー枯渇が、アポトーシスを誘導することを発見した Ben Sahra らの報告と一致している⁶⁶。

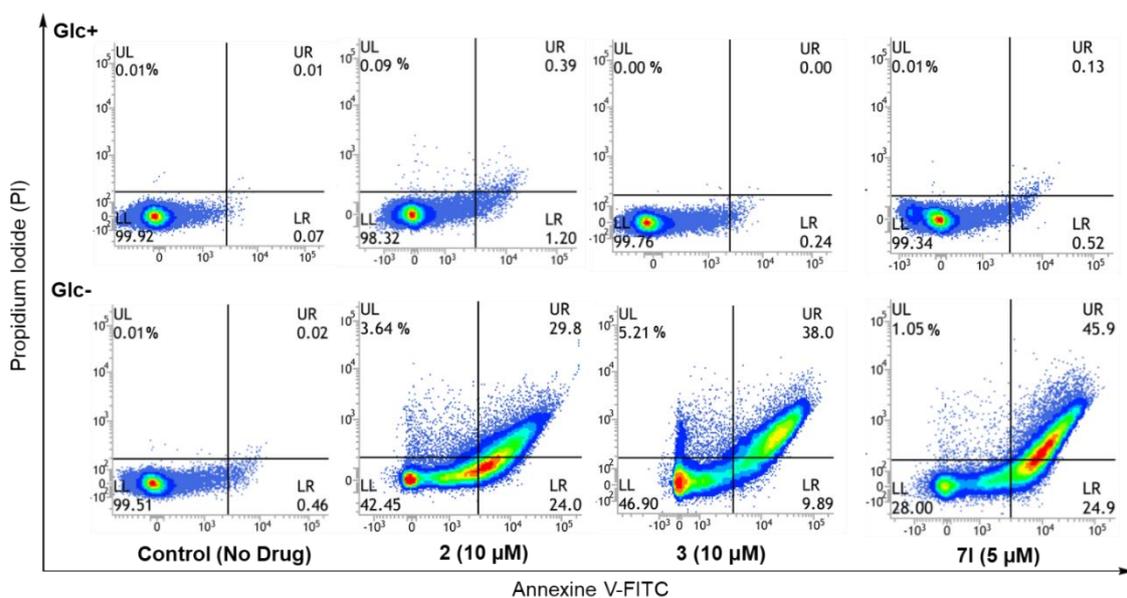


Figure 10. Evaluation of apoptosis of HT29 cells by Annexin V-FITC/PI double staining assay and flow cytometry analysis after the treatment of compound **2**, **3** and **71** under normal or low glucose condition for 48 h.

第五節 小括

アリールビグアニドスキャフォールドを基盤とした構造展開により一連の誘導体を設計・合成し、低グルコース条件下での HIF-1 および UPR 依存性レポーターアッセイおよびグルコース欠乏細胞毒性アッセイを用いたスクリーニングにより評価した。アリール-(CH₂)_n-ビグアニド (n=0-6) の比較を行った結果、HIF-1 転写活性化阻害作用および UPR 転写活性化阻害作用はリンカー鎖長伸長による疎水性の増加と正の相関が認められたが、低栄養選択的な細胞毒性に関しては相関が低かった。細胞毒性については、疎水性の増加によって、低栄養のみならず通常培地における毒性も増強して低栄養選択性が減少する傾向が認められたことから、低栄養選択性が二桁以上で IC₅₀ が低くなるような誘導体を求めて検討した結果、適切なアルキレンリンカー長として、n = 5, 6 を有する強力な誘導体が得られた。その中で最も有望な化合物は、*o*-クロロフェニル誘導体 **71** であり、その阻害活性はフェンホルミン (1) の数十倍であった。**71** は高悪性度のヒトグリア芽種 U87MG に対しても、他の腫瘍細胞と同等の細胞毒性を示した。さらに、今回合成した一連の化合物の中で **71** は、最も低用量で血管新生を阻害および低酸素によって誘導される HIF-1 α のタンパク質発現や、グルコース飢餓によって誘導される GRP78 および GRP94 のタンパク質発現を著しく低下させた。腫瘍細胞のエネルギー代謝解析の結果、これらの **71** のようなアリールビグアニド誘導体はグルコース存在下では OXPHOS を強く阻害し、代償的に解糖系を活性化させるが、グルコース欠乏条件下では両者とも強く抑制され、結果としてエネルギーを枯渇させることで、アポトーシスを強く誘導するものと予想された。

以上のように、新規ビグアニド誘導体は低栄養環境で特異的にアポトーシスを誘導するのみならず、これまでの研究から低酸素、低栄養、小胞体ストレス応答シグナル伝達やエネルギー代謝に関わる様々なタンパク質に多面的に作用することが明らかになった (Figure 11)²³⁻²⁵。

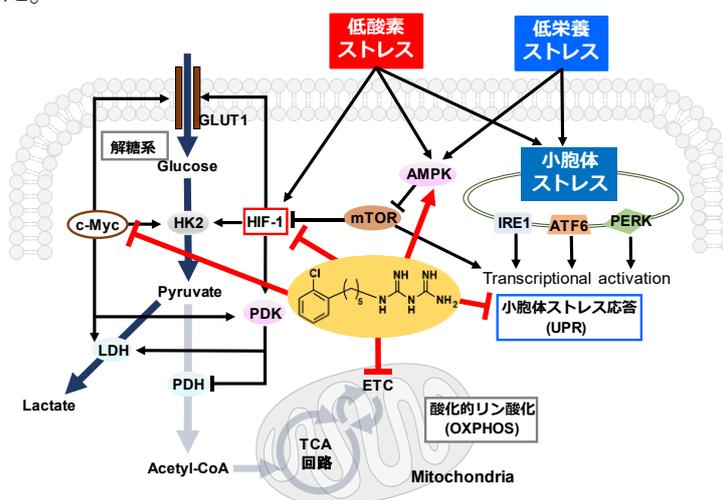


Figure 11. Putative mechanism of action of Aryl Biguanide 71

第二章 光アフィニティラベルビグアニドプローブの開発に関する検討

第一節 光アフィニティラベルビグアニド

ビグアニド化合物である一連のアリールビグアニド誘導体が抗がん効果に関わる多様な因子に対して修飾作用を示すことを明らかにしてきた。新規アリールビグアニド化合物は、ミトコンドリア複合体 I を阻害することが明らかになったが、ビグアニド類の複合体 I との相互作用の詳細については未だ不明である²⁸。さらに、新規アリールビグアニドは、それらが OXPHOS 阻害作用を示す用量よりもかなり低い用量で低栄養選択的細胞毒性や微小環境のストレス応答阻害作用を示したことから、これらの活性に関わる何らかの標的タンパク質が存在すると予想された。そこで、細胞内の標的タンパク質を同定するために光反応性官能基を導入したビグアニド誘導体を設計した。グルコース欠乏条件下選択的細胞毒性を指標に行ったこれまでの構造活性相関研究によれば、フェニル基、アルキレンリンカー部位、ビグアニド部位のいずれにおいても、オルト位およびパラ位にハロゲンやメチル基などの適切な大きさの置換基を導入すると抗がん活性が増強され、かさ高い置換基を導入すると抗がん活性が大きく減少したため、抗がん活性を保持するような構造要件を満たすと考えられるタンパク質標識反応基を導入したコバレントビグアニドを設計、合成することとした。標識基としては光反応基であるトリフルオロメチルジアジリン、アジドおよびベンゾフェノンなどを導入した化合物 **38**、**39**、**40** および **7e** の合成について検討した。標識されたタンパク質を検出するために、酸または塩基存在下でビグアニド基とカルボニル化合物からデヒドロトリアジン環を形成する反応に着目した^{67,68}。この際、リンカーを介してビオチンなどの標識基を導入したカルボニル誘導体を別途合成し、このビグアニド基特異的反応を行うことにより、光反応によりビグアニド誘導体と共有結合した標的タンパク質を検出することが可能であると考えられた(**Figure 12**)。そこで、まず、光反応標識基を導入したアリールビグアニド化合物の合成検討を行った。

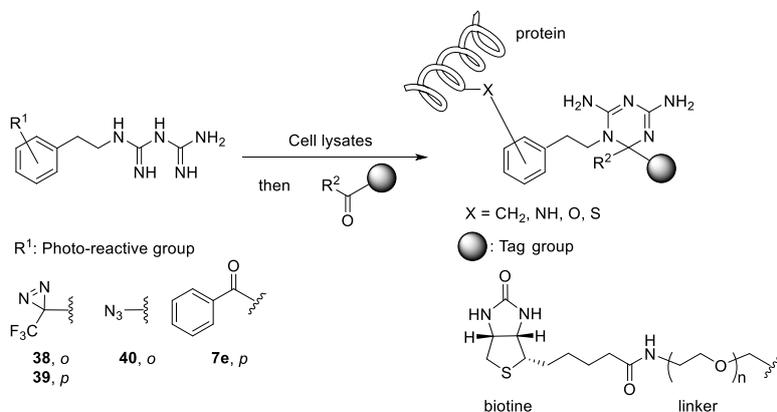
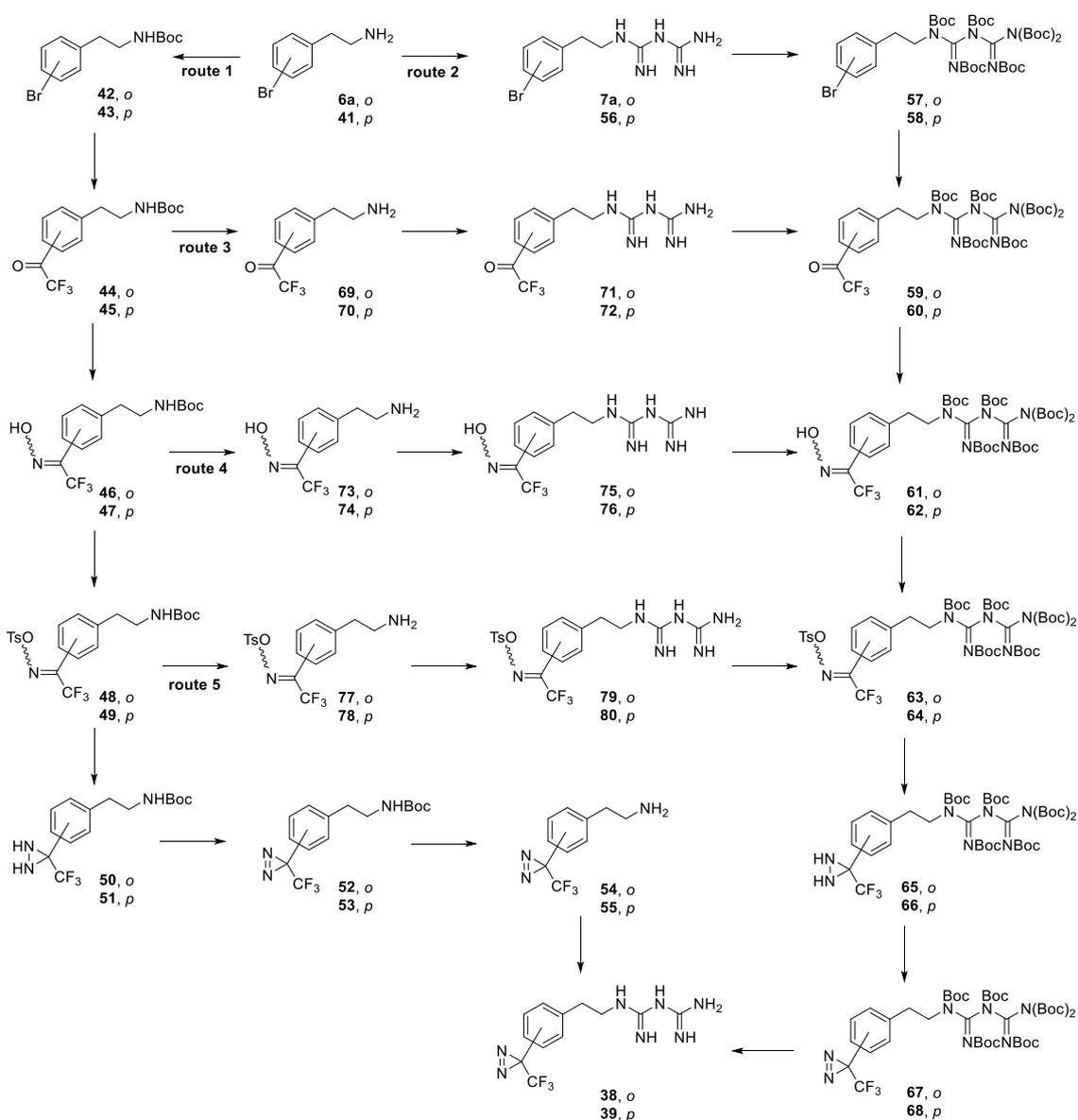


Figure 12. A strategy to identify targets by photoaffinity labeled biguanides

第二節 トリフルオロメチルジアジリン体 **38** および **39** の合成戦略

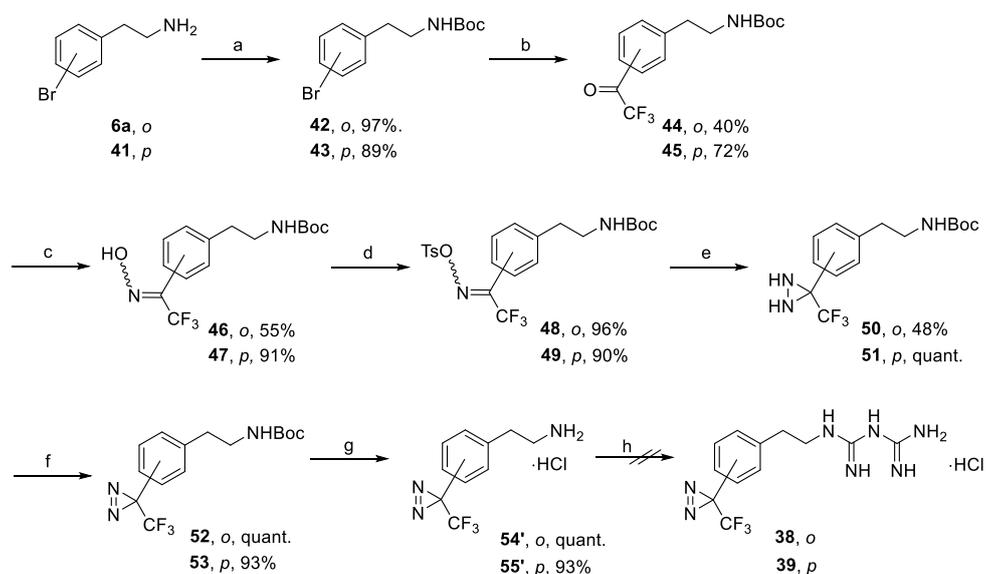
Murai らの方法に従い⁶⁹、アリアルビグアニド誘導体のベンゼン環のオルト位またはパラ位に、トリフルオロメチルジアジリン基を導入する方法を検討した。キー反応として、ジアジリン環化とビグアニド化をどの段階で行うかが重要であると考えた。**Scheme 5** に示す通り、route 1 ではジアジリン体のアミン **54** および **55** のビグアニド化を行うこととした。また、route 2 ではブロモ体のアミン **6a** および **41** を、route 3 ではトリフルオロメチル体のアミン **69** および **70** を、route 4 ではオキシム体のアミン **73** および **74** を、route 5 ではトシル化体のアミン **77** および **78** を、それぞれビグアニド化し、ビグアニド基を Boc 保護した後にジアジリン環化を行うこととした。



Scheme 5. Synthetic strategies for **38** and **39**

第三節 トリフルオロメチルジアジリジン体 **38** および **39** の合成

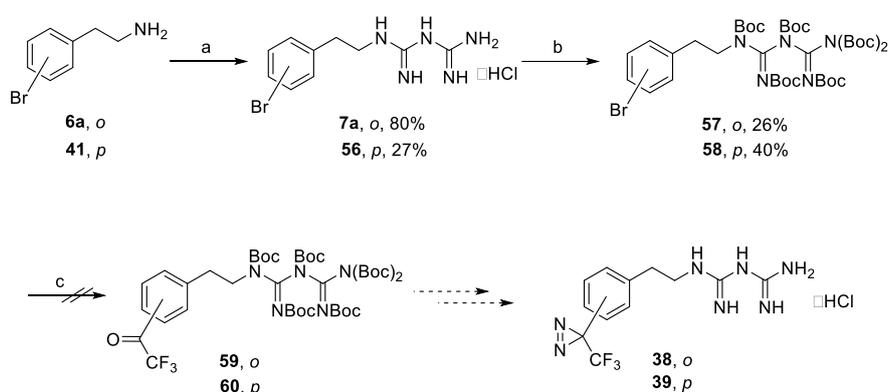
Scheme 6 に示す通り、まず、ブロモフェネチルアミン **6a** および **41** を Et₃N 存在下で (Boc)₂O と反応させて、Boc 保護を行い **42** および **43** を得た。続いて、Boc 保護体をそれぞれ *t*-BuLi と KH の存在下、CF₃COOEt でトリフルオロアセチル化して中程度の収率で **44**、**45** を得た。続いて、トリフルオロアセチル体をそれぞれ pyridine 存在下、NH₂OH·HCl でオキシム化して **46** および **47** を得た。続いてオキシムを Et₃N 存在下で TsCl を用いてトシル化を行い **48** および **49** を得た。続いて、トシル体をそれぞれ液体アンモニア存在下でジアジリジン環の形成を行い、中程度の収率および高収率で **50** および **51** をそれぞれ得た。最後にジアジリジン体 **50** および **51** を MnO₂ で酸化して、ビグアニド化の原料となるフェネチルアミンのジアジリジン体の塩酸塩 **54'** および **55'** を得ることに成功した。続いて、**54'** および **55'** を NH シリカを用いて脱塩酸塩処理して得た **54** および **55** を用い、Mayer らの方法³⁰ に従いビグアニド化を試みた。反応混合物の質量分析の結果、目的物 **38** および **39** は得られておらず、分解が優先しており、目的の反応が進行しなかった。マイクロウェーブ反応にジアジリジン環構造が耐えられない可能性があると考えた。



Scheme 6. Synthetic route 1 for **38** and **39**

Reagent and conditions: (a) (Boc)₂O, Et₃N, MeOH, rt; (b) i) *t*-BuLi, KH, THF, -78 °C; ii) CF₃COOEt, -78 °C; (c) NH₂OH HCl, pyridine, 80 °C; (d) TsCl, Et₃N, acetone, 0 °C; (e) NH₃ (l), Et₂O, rt; (f) MnO₂, Et₂O, rt; (g) 4 M HCl/EtOAc, EtOAc, rt (h) i) NH silica; ii) dicyandiamide, TMSCl, CH₃CN or DMF, 130 °C under microwave irradiation; iii) *i*PrOH, 125 °C under microwave irradiation.

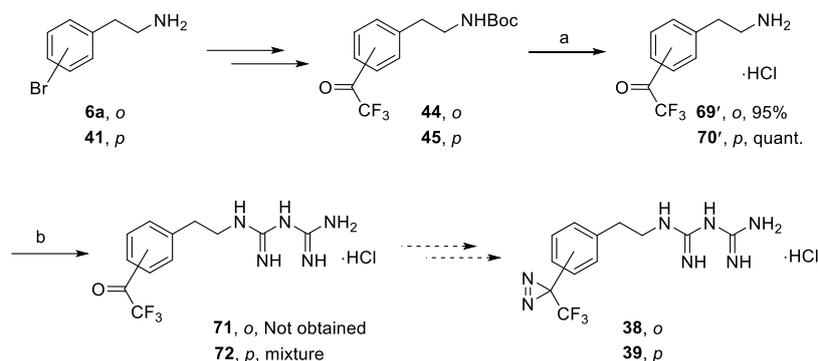
Scheme 7 に示す通り、アミン **6a** および **41** を Mayer らのマイクロウェーブ反応を利用した方法³⁰に従いビグアニド化し、**7a** および **56** を得た。ビグアニド **7a** および **56** を DMF に溶解させ Et₃N および DMAP 存在下でビグアニド基を完全に Boc 保護し、**57** および **58** を中程度の収率で得た。続いて、Boc 保護体 **57** および **58** をそれぞれ *t*-BuLi と KH の存在下、CF₃COOEt でトリフルオロアセチル化を試みた。反応混合物の ESI MS 分析の結果、**57** および **58** から Boc 基が脱離した反応物のみが確認され、Boc 保護体のトリフルオロアセチル体は確認できなかった。NMR や質量分析の結果、Boc 基の脱離反応が優先し、目的の反応が進行しなかったと考えられた。そこで、トリフルオロアセチルビグアニド体を合成し、それらの Boc 保護を行うこととした (**Scheme 8**)。



Scheme 7. Synthetic route 2 for **38** and **39**.

Reagent and conditions: (a) i) dicyandiamide, TMSCl, CH₃CN, 130 °C under microwave irradiation ii) *i*PrOH, 125 °C under microwave irradiation; (b) (Boc)₂O, Et₃N, DMAP, DMF, rt; (c) i) *t*-BuLi, KH, THF, -78 °C; ii) CF₃COOEt, -78 °C.

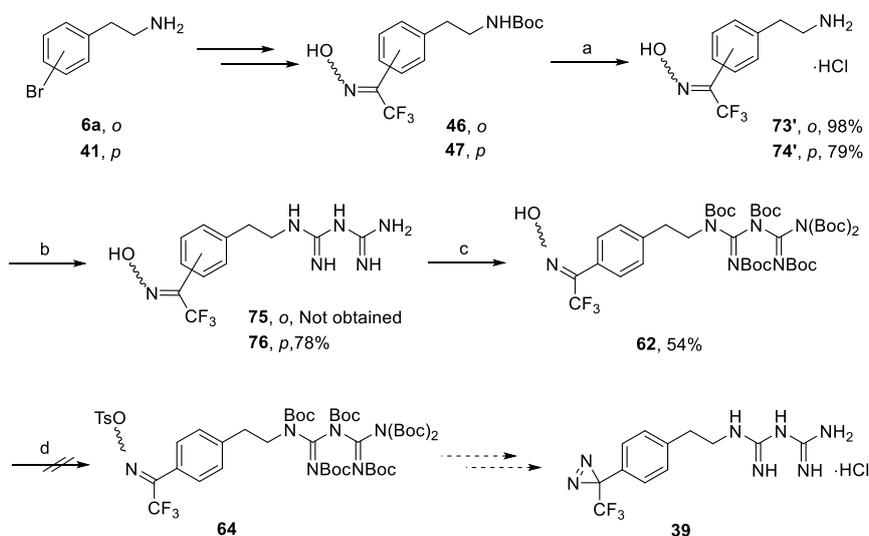
Scheme 8 に示す通り、トリフルオロアセチルビグアニド体 **44** および **45** を酸性条件で脱保護を行いアミン塩酸塩 **69'** および **70'** を得た。続いて、NH シリカで脱塩酸塩処理を行った後に、**69** および **70** を用いてマイクロウェーブ反応を利用したビグアニド化を試みた。質量分析の結果、オルト体 **71** は得られておらず、分解反応や環化反応が起きている可能性があった。一方、パラ体 **72** は反応混合物の中に含まれていることが分かった。しかし、ビグアニド **72** は非常に不安定であり、再結晶法の検討や、NH シリカを用いた精製の検討の途中で消失し、質量分析以外の解析をするには至らなかった。



Scheme 8. Synthetic route 3 for **38** and **39**.

Reagent and conditions: (a) 4 M HCl/EtOAc, EtOAc, rt (b) i) NH silica; ii) dicyandiamide, TMSCl, CH₃CN or DMF, 130 °C under microwave irradiation iii) *i*PrOH, 125 °C under microwave irradiation.

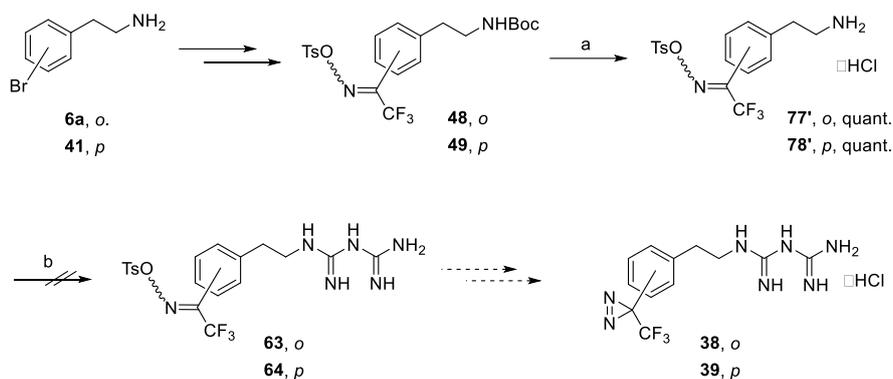
Scheme 9 に示す通り、オキシム体 **46** および **47** の脱 Boc 化を行い塩酸塩 **73'** および **74'** を得た。続いて、NH シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって脱塩酸塩化して得たアミン **73** および **74** を用いて、Mayer らのマイクロウェーブ反応を利用した方法³⁰ に従いビグアニド化を試みた。質量分析の結果、オルト体の **75** は反応後の混合物の中に存在することを ESI MS 分析により確認できたものの、単離するには至らなかった。一方ビグアニド **76** は安定な化合物であると考えられ、NH シリカを用いた精製により単離に成功した。続いて **76** を THF 中に懸濁させ Et₃N および DMAP 存在下でビグアニド基を完全に Boc 保護し、**62** を中程度の収率で得た。続いて、**71** のトシル化を試みた。NMR および質量分析の結果、トシル体 **64** は確認されず、**62** の脱 Boc 体のみが確認されたことから、目的の反応は進行せず、Boc 基の脱離反応が優先したと考えられた。



Scheme 9. Synthetic route 4 for **39**.

Reagent and conditions: (a) i) 4 M HCl/EtOAc, EtOAc, rt; (b) i) NH silica; ii) dicyandiamide, TMSCl, CH₃CN or DMF, 130 °C under microwave irradiation iii) *i*PrOH, 125 °C under microwave irradiation; (c) (Boc)₂O, Et₃N, DMAP, THF, rt; (d) TsCl, TEA, acetone, 0 °C.

トシル体 **77** および **78** を酸性条件で脱保護化を行って一塩酸塩のアミン **79'** および **80'** を得た。**79'** および **80'** を NH シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって脱塩酸塩化した得たアミン **79** および **80** を用いて、Mayer らのマイクロウェーブ反応を利用した方法³⁰ に従いビグアニド化を試みた。**79** および **80** は CH₃CN に溶解しなかったことから、懸濁の状態マイクロウェーブ反応を行った。反応混合物を ESIMS 分析した結果、**56** および **57** は存在せず、**54** および **55** が確認されたことから、反応が進行していないことが考えられた。



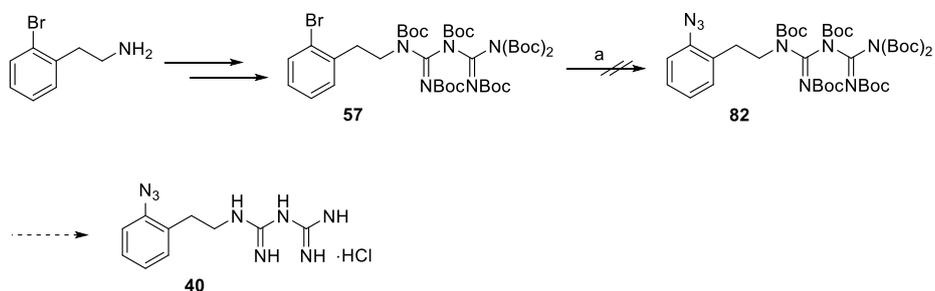
Scheme 10. Synthetic route 5 for **38** and **39**.

Reagent and conditions: (a) i) 4 M HCl/EtOAc, EtOAc, rt; ii) NH silica; (b) i) NH silica; ii) dicyandiamide, TMSCl, CH₃CN or DMF, 130 °C under microwave irradiation; iii) *i*PrOH, 125 °C under microwave irradiation.

以上 route 1-5 の検討より、光反応性標識基ジアジリン基を導入したアリールビグアニドの合成を断念した。

第四節 アジド体 40 の合成の検討

Murai らの方法に従い⁶⁹、Scheme 11 に示す通り、ビグアニド基を Boc 保護した 57 を用いて、アジド基の導入の検討を行った。NaN₃ 4–10 等量、CuI 0.2–0.4 等量、sodium ascorbate 0.1–0.2 等量、*N,N'*-diethylethylenediamine 0.3–0.6 等量、Ar バブリングによる脱気処理および反応時間 12–72 h の条件で反応の検討を行ったが、ESI MS 分析の結果 N₃ 体は得られず、Boc 保護体 57 の分解物および 57 を観察し、各反応において 57 を 4–28%回収した。以上より、Murai らの方法⁶⁹によるアリールビグアニドへの光反応性標識基であるアジド基の導入は困難であると考えられた。

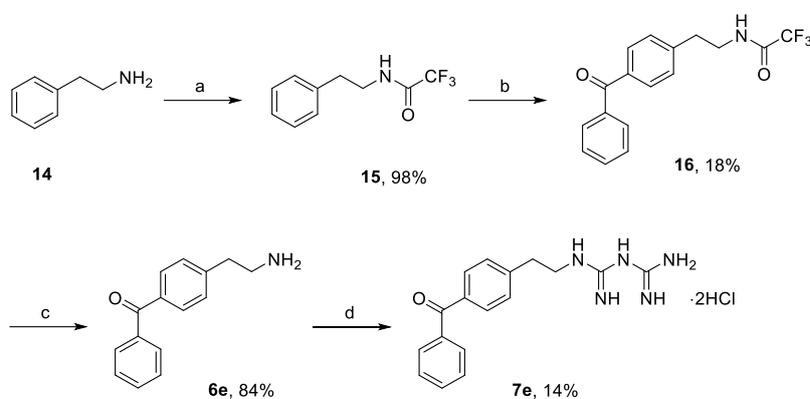


Scheme 11. Synthesis of phenyl azide derivative 40.

Reagent and conditions: (a) NaN₃, CuI, sodium ascorbate, *N,N'*-diethylethylenediamine, 40% H₂O/EtOH, 100 °C.

第五節 ベンゾイル体 7e の合成の検討

Murai らの方法に従い⁶⁹、Scheme 12 に示す通り、フェネチルアミン **14** をトリフルオロメタンスルホン酸無水物で処理し、トリフルオロアセチル保護体 **15** を得た。続いて **15** を trifluoromethanesulfonic anhydride 中の無水安息香酸で処理して Bz 体 **16** を得た。続いて、**16** をアルカリ条件下でトリフルオロアセチル基を脱離し、アミン **6e** を得た。最後に、他のビグアニド誘導体の合成と同様に Mayer らのマイクロウェーブ反応を利用した方法³⁰に従い、Bz 基を導入した光アフィニティラベルビグアニドプローブを得ることに成功した。



Scheme 12. Synthesis of benzophenone derivative **7e**.

Reagent and conditions: (a) trifluoromethanesulfonic anhydride, dry THF, under N₂, rt; (b) benzoic anhydride, TfOH, under N₂, rt; (c) 1 M NaOH aq., under N₂, 0 °C to rt.

第六節 小括

化合物 **7e** のスクリーニング活性評価については第一章 **Table 1** に示したように、HIF-1 および UPR 転写活性化阻害作用およびグルコース欠乏条件下細胞毒性の生物活性はフェンホルミンと同等レベル [IC_{50} (HIF-1); 4.6 μ M, IC_{50} (UPR); 92.1 μ M, IC_{50} (Glc-); 28.7 μ M]であった。一般に標的タンパク質の特異的標識を行うには、プローブ分子の生物活性が低 nM であることが必要と考えられている⁷⁰。そこで、化合物 **7e** は活性が不十分であったことから標的タンパク質同定を断念した。

以上のように、低栄養選択的抗がん活性の標的タンパク質の同定のための光反応性アリアルビグアニド誘導体の開発は未完成に終わった。ジアジリン合成中間体オキシム体 **71** は安定であったことから、**Scheme 11** に示す合成ルート (route 4) については条件検討の余地があるものと思われる。また、光反応性標識基トリフルオロメチルジアジリン基の反応性が非常に高く不安定であったことから、メチルジアジリン基を導入する検討も必要である。

総括

代謝リプログラミングは、がんの新たな特徴として認識されており、腫瘍選択的ながん治療薬開発のための創薬標的として注目されている。腫瘍微小環境におけるエネルギー代謝を標的とした治療薬を開発するために、アリールビグアニドスキャフォールドを基盤とした構造展開および、低グルコース条件下における HIF-1 および UPR 依存性レポーターアッセイおよび選択的細胞毒性アッセイを用いたスクリーニングにより、高い抗がん活性を示す新規ビグアニド誘導体を見出した。アリール-(CH₂)_n-ビグアニド (n=0-6) のホモロジー検索により、適切なアルキレンリンカー長 (n = 5, 6) を有する強力な誘導体を得られた。その中で最も有望な化合物は、*o*-クロロフェニル誘導体 **71** であり、その HIF-1 および UPR 阻害活性やグルコース欠乏条件選択性はフェンホルミン (**1**) の数十倍であることが分かった。さらに、**71** は、血管新生、低酸素によって誘導される HIF-1 α のタンパク質発現およびグルコース欠乏によって誘導される GRP78 および GRP94 のタンパク質発現を、今回合成した一連のアリールビグアニド誘導体の中で、最も低濃度で抑制した。

ビグアニド類のような OXPHOS 阻害剤に対するがん細胞の感受性は、特にミトコンドリア機能に異常がある細胞では、グルコース欠乏条件下で増強される可能性が示唆されており⁶¹、ビグアニド類が示す多様な生物学的活性の中でも、ミトコンドリア呼吸を阻害する作用が、グルコース欠乏条件下選択的な細胞毒性の要因のひとつと考えられる。腫瘍細胞のエネルギー代謝解析の結果、これらのビグアニド類はグルコース存在下では OXPHOS を強く阻害し、代償的に解糖系を活性化するが、グルコース欠乏条件下では両者とも強く抑制され、結果として細胞のエネルギー枯渇とアポトーシスを引き起こすことが明らかになった。メトホルミンと 2-DG との併用によるエネルギー枯渇によって誘導されるアポトーシスは AMPK によって媒介されることが報告されているから^{24,66}、今回合成した一連のアリールビグアニド誘導体のグルコース欠乏条件下のエネルギー枯渇によるアポトーシス誘導作用もまた AMPK シグナル伝達に関連している可能性がある。アリールビグアニド誘導体は、AMPK を活性化する一方で、HIF-1 や UPR 依存性の転写活性化阻害作用や、HIF-1 と共同して解糖系を活性化させるがん遺伝子 *c-Myc* および、UPR 関連因子 ATF4 タンパク質の発現を抑制することなども、これまでに明らかにしてきた²³⁻²⁵。ビグアニド類は、がんの代謝リプログラミングを阻害し直接抗がん効果を示し、また、インスリンや炎症性サイトカインなどの全身性のメディエーターを修飾する間接的な作用も示すことから、薬剤の組み合わせ療法や、新世代の薬剤の開発などにおいて、有効に利用されることが期待されている^{71,72}。さらに、近年、HIF-1 阻害剤の大規模な探索の過程で見出された BAY 87-2243 をリード化合物として設計・合成された IACS-010759 (**Figure 1**) が、非常に強力なミトコンドリアの呼吸鎖複合体 I 阻害作用を示すことが報告された⁷。IACS-010759 はまた、卵巣明細胞がんなどで高頻度に見られ

る ARID1A 遺伝子の欠損によりミトコンドリア代謝が亢進した卵巣がんモデルに対する選択的な合成致死効果を示すことが明らかになった⁷³。今回、我々が開発した **71** においてもミトコンドリア呼吸依存性のある HT29 細胞においてグルコース欠乏条件選択的な細胞毒性の活性が高くなる傾向が認められたことから、ARID1A 遺伝子変異などによってミトコンドリア代謝活性が亢進している悪性腫瘍の治療に有望と考えられる。

ここで、ビグアニド系薬剤をがん治療に用いる場合の問題点として、アシドーシスのリスクが高いことが挙げられる。最近、PHD2 阻害剤が臨床適用され、PHD2 は乳酸アシドーシス治療の標的とも考えられていることから⁶⁴、PHD2 阻害剤を併用することでこの副作用を回避できる可能性がある、また、本研究において高い抗がん活性を示す一連のアリールビグアニド誘導体は、OXPHOS 阻害作用を示す用量よりもかなり低い用量で、解糖系を活性化する HIF-1 の転写活性化やタンパク質発現を有意に阻害したことから、投与量を検討することで副作用として考えられるアシドーシスのリスクを軽減できる可能性も示唆された。

また、新規アリールビグアニド化合物は、それらが OXPHOS 阻害を示す用量よりもかなり低い用量で低栄養選択的細胞毒性や微小環境のストレス応答阻害作用を示したことから、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I の他にも何らかの標的が存在すると予想し、標的タンパク質の探索を試みた。ビグアニド化合物の標的同定の戦略として、アリールビグアニド化合物への光反応標識基であるトリフルオロメチルジアジリン基、アジド基および Bz 基のアリール位への導入を検討した。トリフルオロメチルジアジリン基の導入において、キー反応として、ジアジリン環化とビグアニド化をどの段階で行うかが重要であると考え、5 種類の反応経路を検討した。まず、トリフルオロメチルジアジリン基を導入したフェネチルアミンを用いたマイクロウェーブ反応では目的の反応が全く進行しなかったことからジアジリン環がマイクロウェーブ反応によって分解した可能性があった。そこで、合成ルートを変更し、ジアジリン環形成の前の各段階でのビグアニド基の導入およびビグアニド基の Boc 保護を行った。しかし、いずれの方法においても目的物は得られず、合成を断念した。アジド基導入の場合、Boc 保護を行った 2-(2-Bromophenyl)ethylbiguanide を用いてアジド化の条件検討を行ったが、目的の反応は進行しなかった。このことから、村井らの方法ではビグアニドを有する化合物へのアジド基の導入は困難であると考えられた。最後に、Bz 基の導入を試みた。低収率ではあったものの、光反応標識基として広く用いられているベンゾフェノン骨格を有するビグアニド化合物を得ることに成功した。しかし、スクリーニング評価における活性はフェンホルミンと同等レベルの活性しか示さず、標的タンパク質のラベル化を行うには、標的タンパク質との親和性が著しく低い。以上より、アリールビグアニド誘導体に対し光反応標識基を導入し、これをバイオプローブとして用いることで、ビグアニド類の標的タンパク質を同定することを断念した。

以上、本研究では、腫瘍の微小環境のエネルギー代謝リプログラミングを標的とするがん治療薬の創製を目指して、アリアルビグアニド類の構造展開を行い、グルコース欠乏条件下で特異的にミトコンドリア呼吸を強く阻害し、最終的にはエネルギー枯渇による細胞死へと導くことができる強力な新規アリアルビグアニド **71** を見出した。**71** は、がんの微小環境ストレスへの適応に重要な因子である HIF-1 や UPR のシグナル伝達を強力に阻害することが明らかになった。その結果、低酸素、小胞体ストレス、代謝ストレスなどのストレス応答機構を無効化する多面的効果を有し、これらの効果が腫瘍のエネルギー代謝異常と合成致死的に働くことで、通常の栄養状態にある正常細胞には作用せず、低栄養がん微小環境選択的に細胞死を誘発するものと予想され、新たな腫瘍選択的治療薬のリードとして有望と考えられる。

謝 辞

p2.1 plasmid vector を御供与していただきましたジョンズ・ホプキンス大学 Gregg L. Semenza 教授、並びに pGRP78pro160luc plasmid vector を御供与していただきました財団法人癌研究会化学療法センター富田 章弘博士に感謝致します。細胞内エネルギー代謝測定に当たり、直接ご指導、ご協力、ご激励いただきました関西医科大学附属生命医学研究所侵襲反応制御部門、廣田喜一教授、松尾禎之講師に感謝致します。

終わりに臨み、本研究において終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました恩師岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室、永澤秀子教授に深甚たる謝辞を表します。本研究の実施にあたり直接御指導、御鞭撻、並びに御激励を賜りました岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室、平山祐准教授、辻美恵子助教、成瀬康介博士、並びに神戸薬科大学創薬科学大講座薬化学研究室奥田健介教授に感謝いたします。元素分析の測定をしていただきました岐阜薬科大学機器センター、林雅子副手、堀田美春氏に感謝致します。本研究の推進にあたりご協力いただきました岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室、因幡栄美様、並びに宮路千乃様に感謝致します。在学中、大変お世話になりました薬化学研究室の先輩方、同級生、後輩の皆様に感謝致します。

実験の部

実験の部

有機系試薬は Sigma-Aldrich、富士フイルム和光純薬株式会社、東京化成工業、関東化学、ナカライテクス、キシダ化学、国産化学、Cambridge Isotope Laboratories から購入し特別な精製は行わずに用いた。すべての反応は窒素雰囲気下で実施した。順相薄層クロマトグラフィー (TLC) は、試薬グレードの溶媒を使用してシリカゲル 60 F254 (Merck、1.05715.0009) で実施し、UV 光 (254 nm) の吸収、または可視化試薬 (モリブドリン酸) を使用して検出した。カラムクロマトグラフィーは、シリカゲル (AP-300S, 大興商事) または NH シリカゲル (Chromatorex® 100-200 mesh, 富士シリシア化学) で、記載されている混合溶媒を用いて行った。マイクロウェーブ反応には Initiator 2.0 (Biotage AB) を用いた。溶媒はロータリーエバポレーターで減圧留去した。

¹H-NMR は JEOL JNM EX-400 (400 MHz)、JEOL JNM AL-400 (400 MHz)、または JEOL JNM ECA-500 (500 MHz) (JEOL Ltd.) を、¹³C-NMR は JEOL JNM EX-400 (100 MHz)、JEOL JNM AL-400 (100 MHz)、または JEOL JNM ECA-500 (125 MHz) (JEOL Ltd.) を使用して 25 °C 測定した。¹H-NMR の化学シフト値は tetramethylsilane (0.00 ppm) を内部標準として ppm 単位で表示した。¹³C-NMR の化学シフト値は溶媒のスペクトル (CDCl₃: 77.2 ppm, CD₃OD: 49.0 ppm, DMSO-*d*₆: 39.5 ppm) を内部標準として ppm 単位で表示した。シグナルの分裂様式は、s=singlet, d=doublet, t=triplet, dd=doubledoublet, td=tripledoublet, q=quartet, m=multiplet と略記した。低分解能および高分解能 EI マススペクトル、FAB マススペクトルには JMS-SX 102 (JEOL Ltd.) を使用した。低分解能および高分解能 ESI マススペクトル、DART マススペクトルは JMS-T100TD (JEOL Ltd.) を使用し、ポリエチレングリコール (PEG) を標準物質として測定した。融点測定には柳本製作所微量融点測定装置を使用し、全て未補正である。元素分析には Micro Corder JM10 (J-SCIENCE LAB Co., Ltd) を用いた。薄層クロマトグラフィーには Art. 7749 Kieselgel 60 PF254 (Merck) を使用し、254 nm の UV ライトで可視化した。c logD は DS Accord for Excel 7.1.5 (Accelrys software Inc.) を使用して算出した。

生物学的評価には以下に示す試薬、機器を使用した。

細胞培養

EMEM (富士フイルム和光純薬株式会社)、RPMI1640 (富士フイルム和光純薬株式会社)、MEM Non-essential amino acids (MEM NEAA, GIBCO®, Life Technologies Inc.)、硫酸ストレプトマイシン (Meiji Seika Pharma Co., Ltd.)、硫酸カナマイシン (Meiji Seika Pharma Co., Ltd.)、ベンジルペニシリンカリウム (Meiji Seika Pharma Co., Ltd.)、fetal bovine serum Lot. No. S. 6M0030 (Nichirei)、Lot. No. JBS-5145 (Japan Bioserum)、ハンクス液「ニッスイ」

(日水製薬)、メイロン(大塚製薬工場)、Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma-Aldrich)、Trypsin-EDTA (GIBCO[®], Life Technologies Inc.)

ルシフェラーゼアッセイ

Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity (Roche Applied Science)、Dimethyl sulfoxide (DMSO, 富士フイルム和光純薬株式会社)、FB12 Luminometer (Berthold detection systems)

BCA アッセイ

Bovine Serum Albumin (PIERCE)、Working Reagent A, B (PIERCE)、MULTISKAN JX plate reader (Thermo Fisher Scientific)

細胞毒性試験

Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT 試薬, 和光純薬工業)、RPMI1640 glucose (-) (GIBCO[®], Life Technologies Inc.)

ウエスタンブロット

Sodium chloride (富士フイルム和光純薬株式会社)、Potassium chloride (Sigma-Aldrich)、Na₂HPO₄ (ナカライテスク)、KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich)、Sodium dodecyl sulfate (SDS, 富士フイルム和光純薬株式会社)、Tergitol Solution (Sigma-Aldrich)、Sodium deoxycholate (富士フイルム和光純薬株式会社)、2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris, キシダ化学)、DTT (富士フイルム和光純薬株式会社)、Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 富士フイルム和光純薬株式会社)、Sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich)、Sodium fluoride (ナカライテスク)、Complete EDTA free (Roche)、Glycerol (ナカライテスク)、Bromophenol blue (BPB, Sigma-Aldrich Japan)、2-Mercaptoethanol (キシダ化学)、PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas)、Acrylamide (富士フイルム和光純薬株式会社)、N,N'-methylenebis(acrylamide) (富士フイルム和光純薬株式会社)、Ammonium persulfate (APS, ナカライテスク)、Tetramethylethylenediamine (TEMED, 富士フイルム和光純薬株式会社)、Glycine (Sigma-Aldrich)、Ponceau-S (Sigma-Aldrich)、Acetic acid (富士フイルム和光純薬株式会社)、Methanol (富士フイルム和光純薬株式会社)、Skim milk (富士フイルム和光純薬株式会社)、Tween 20 (富士フイルム和光純薬株式会社)、Nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences)、Polyvinylidene difluoride membrane (Bio Rad)、Mouse monoclonal anti-HIF-1 α (Novus)、Actin (Santa Cruz Biotechnology)、Anti-mouse IgG Peroxidase conjugate (Sigma)、Anti-goat IgG Peroxidase conjugate (Sigma)、KDEL monoclonal antibody (Stressgen)、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)、Pierce Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific)、LAS 3000 mini imager and Multi Gauge software Science Lab version 2005 version 3.0 (Fuji Photo)

細胞代謝アッセイ

Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer (Agilent)、XFp PS Tissue Culture Microplates (Agilent)、(Agilent)、Seahorse XF DMEM Medium (Agilent)、XFp Sensor Cartridge (Agilent)、Seahorse XF Calibrant Solution (Agilent)、Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit (Agilent)、

Seahorse XF Glycolysis Stress Test Kit (Agilent)、D(+)-Glucose (富士フイルム和光純薬株式会社)

フローサイトメトリー

BD FACSVerse™ Flow Cytometer (BD Biosciences Pharmingen)、FITC Annexin V Apoptosis Detection kit I (BD Biosciences Pharmingen)

CAM assay

Methyl cellulose (ナカライテスク)、Opsite Flexifix (smith & nephew)、イントラリポス(大塚製薬工場)、P-008 (A) (Showa Furanki)

有機合成における General Procedure

General Procedure 1³⁰ (ビグアニド合成におけるマイクロウェーブ反応)

2-5 mL microwave vial にスターラーバーを封入し、基質のアミン (**4**, **5**, **6a–6q**, 0.3–6.23 mmol)、dicyandiamide (1.0 eq.)、TMSCl (1.1 eq.)、dry CH₃CN (2.4–3.6 mL) を加えた。懸濁液を攪拌した後に容器を密封し、マイクロ波を 10–30 min、130–150 °C で照射した。冷却後、*i*PrOH (3.0 eq.) を加えて懸濁液を攪拌した後、容器を密封してさらにマイクロ波を 1 min、125 °C で照射した。得られたビグアニド塩酸塩の沈澱をフィルター濾取し CH₃CN で二回洗浄し、ビグアニド塩酸塩を得た。

General Procedure 2³¹ (ニトリルの還元とアミンの Boc 保護)

基質のニトリル (**8**, **9**, **21**, **22**, and **28**, 3.0–8.0 mmol)、(Boc)₂O (2.0 eq.)、NiCl₂ · 6H₂O (5 mol%) を dry MeOH (30–200 mL) に溶解し、氷冷下で NaBH₄ (7–10 eq.) を 30 分以上かけて加え、室温で 4–25 h 攪拌した後、diethylentriamine (1.0 eq.) を加えて室温で 30 min 攪拌した。溶媒を減圧留去、EtOAc で抽出した後、集めた有機層を NaHCO₃ 飽和水溶液で 3 回、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した。

General procedure 3 (Boc の脱保護とアミン脱塩酸塩処理)

Boc 保護体 (**10**, **11**, **23**, **24** and **29**, **52**, **53** and **44–49**, 0.269–73.0 mmol) を少量の EtOAc に溶解し、さらに 4 M HCl/EtOAc (1–50 mL) を加えて 6–7 h 室温で攪拌した。溶媒を減圧留去してアミン塩酸塩を得た。塩酸塩 **4'**, **6c'** および **6j'–6l'** については、さらに NH シリカゲルを用いたショートカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/methanol = 1 : 1) により脱塩酸塩処理を行い、溶媒を減圧留去して目的のフリーモノアミン **4**, **6c** および **6j–6l** を得た。

General procedure 4 (第一級アミンの sulfonamides 保護)

2-(2-Chlorophenyl)ethylamine **5** (3 mmol) を dry DMF (5–7 mL) に溶解し、K₂CO₃ (6.6 mmol) を加え、さらに iodomethane, 1-bromobutane, propargyl bromide または **33** を加えて窒素雰囲気下 60 °C で 10–42 h 攪拌した。反応溶液を室温まで冷却した後、H₂O を加え、diethyl ether で抽出した。集めた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した。

General procedure 5 (sulfonamides の脱保護と第二級アミンの精製)

thiophenol (6.2–15 mmol) を CH₃CN (2–10 mL) に溶解し 10.9 M KOH aq. (0.57–1.38 mL) を 10 min かけて加え、0 °C で 5 min 攪拌した後に CH₃CN (1–2 mL) に溶解した **34–37** (2.5–6 mmol) を 20 min かけて加え、窒素雰囲気、50 °C で 50 min 攪拌した。反応溶液を室温まで冷却し、H₂O を加え、CH₂Cl₂ で 3 回抽出し、飽和食塩水で 1 回洗浄した。集めた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した。

第一章第二節第一項～三項に関する化合物の合成

Phenformin (1).

General Procedure 1 に従って、2-Phenylethylamine (**14**, 485 mg, 4.0 mmol) を用いて 130 °C, 15 min, CH₃CN (12 mL) の条件で反応を行い、**61** の一塩酸塩 (774 mg, 80%) を得た。分析及び生物活性試験用に加熱しながら EtOH に一度溶解させ 2M HCl/EtOH を加えた後に静置して再結晶を行ったところ、二塩酸塩である **61** を得た。colorless powder. mp 175–176 °C (lit. 175–178 °C)²⁰

本化合物は文献既知であり、融点が一致したことにより構造を決定した。

2-(2-Methylphenyl)ethylbiguanide (2).

General Procedure 1 に従って、2-(2-Methyl-phenyl)ethylamine (**4**) (540 mg, 4.0 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH₃CN (12.0 mL) の条件で反応を行い、**2** の一塩酸塩 (764 mg, 75%) を得た。分析及び生物活性試験用に加熱しながら EtOH に一度溶解させ 2M HCl/EtOH を加えた後に静置して再結晶を行ったところ、二塩酸塩である **2** を得た。colorless powder. mp 171.5–172.5 °C (lit. 173–174 °C)²²

本化合物は文献既知であり、融点が一致したことにより構造を決定した。

2-(2-Chlorophenyl)ethylbiguanide (**3**).

General Procedure 1 に従って、2-(2-Chloro-phenyl)ethylamine (**5**) (623 mg, 4.0 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH₃CN (12.0 mL) の条件で反応を行い、**3** の一塩酸塩 (1.10 g, quant.) を得た。分析及び生物活性試験用に加熱しながら EtOH に一度溶解させ 2 M HCl/EtOH を加えた後に静置して再結晶を行ったところ、二塩酸塩である **3** を得た。

mp 159–160 °C (lit. 159–161 °C)²²

本化合物は文献既知であり、融点が一致したことにより構造を決定した。

2-(2-Bromophenyl)ethylbiguanide (**7a**).

General Procedure 1 に従って、2-(2-Bromo-phenyl)ethylamine (**6a**) (200.1 mg, 1.0 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH₃CN (3.0 mL) の条件で反応を行い、**7a** の一塩酸塩 (256 mg, 80%) を得た。分析及び生物活性試験用に加熱しながら EtOH に一度溶解させ 2M HCl/EtOH を加えた後に静置して再結晶を行ったところ、二塩酸塩である **7a** を得た。

Colorless powder. mp 173–175 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.02 (br s, 2H), 3.50 (br s, 2H), 7.21 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.37 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.74, 8.58, 9.22, 9.72 (br s, total 6H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 33.5, 42.1, 123.9, 128.0, 128.9, 131.1, 132.6, 137.2, 152.1, 155.1; LRMS (DART+): *m/z* [M+H]⁺: 284; *Anal.* Calcd for C₁₀H₁₆BrCl₂N₅: C, 33.64; H, 4.52; N, 19.61. Found: C, 33.61; H, 4.50; N, 19.60.

本化合物は新規化合物である。

2-(2-Iodophenyl)ethylbiguanide (**7b**).

General Procedure 1 に従って、2-(2-Bromo-phenyl)ethylamine (**6b**) (200 mg, 1.0 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH₃CN (3.0 mL) の条件で反応を行い、**7b** の一塩酸塩 (234.8 mg, 66%) を得た。分析及び生物活性試験用に加熱しながら EtOH に一度溶解させ 2 M HCl/EtOH を加えた後に静置して再結晶を行ったところ、二塩酸塩である **7b** を得た。

Colorless powder. mp 159 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.98 (br s, 2H), 3.44 (br s, 2H), 7.02 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.38 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.87 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.46, 8.48, 9.11, 9.64 (br s, total 6H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 38.5, 42.9, 101.4, 129.2, 129.4, 130.6, 139.7, 141.0, 152.6, 155.6; HRMS (ESI+): *m/z* calcd for C₁₀H₁₅IN₅⁺ [M+H]⁺: 332.0367, found 332.03392 *Anal.* Calcd for C₁₀H₁₆Cl₂IN₅: C, 29.72; H, 3.99; N, 17.33. Found: C, 29.74; H, 3.99; N, 17.10.

本化合物は新規化合物である。

2-(2-Trifluoromethylphenyl)ethylbiguanide (**7c**).

General Procedure 1 に従って、2-Trifluoromethylphenethylamine (**6c**, 200 mg, 0.95 mmol)

を用いて 130 °C, 10 min, CH₃CN (3.0 mL) の条件で反応を行い、**7c** の一塩酸塩を得た。分析及び生物活性試験用に加熱しながら EtOH に一度溶解させ 2M HCl/EtOH を加えた後に静置して再結晶を行ったところ、二塩酸塩である **7c** (262 mg, 80%)を得た。

Colorless powder. mp 146–147 °C; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 1.04 (d, 3H), 3.08 (br s, 2H), 3.52 (br s, 2H), 7.44 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.61 (m, H), 7.469 (d, J = 7.5 Hz, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ = 31.6, 44.9, 126.1 (q, J = 277.3 Hz), 127.2, 127.3, 128.6, 129.7 (q, J = 29.6 Hz), 132.8, 133.7, 154.3, 156.7; LRMS (DART+): *m/z* [M+H]⁺: 274; *Anal.* Calcd for C₁₁H₁₆F₃Cl₂N₅: C, 38.16; H, 4.66; N, 20.23. Found: C, 37.99; H, 4.53; N, 20.22.

本化合物は新規化合物である。

2-(4-Ethylphenyl)ethylbiguanide (**7d**).

General Procedure 1 に従って、2-(4-Ethyl-phenyl)ethylamine (**6d**, 149 mg, 1.0 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH₃CN (3.0 mL) の条件で反応を行い、**7d** の一塩酸塩 (250 mg, 93%)を得た。分析及び生物活性試験用に加熱しながら EtOH に一度溶解させ 2M HCl/EtOH を加えた後に静置して再結晶を行ったところ、二塩酸塩である **7d** を得た。Colorless powder. mp 178–179 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.16 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 2.57 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 2.84 (br s, 2H), 3.47 (br s, 2H), 7.15 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.79, 8.55, 9.15, 9.63 (br s, total 6H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 15.7, 27.8, 33.0, 43.8, 127.8, 128.7, 135.3, 141.9, 152.0, 155.1; LRMS (DART+): *m/z* [M+H]⁺: 234; *Anal.* Calcd for C₁₂H₂₁Cl₂N₅: C, 47.06; H, 6.91; N, 22.87. Found: C, 47.24; H, 6.90; N, 22.61.

本化合物は新規化合物である。

2-(4-benzoylphenyl)ethylbiguanide (**7e**).

General Procedure 1 に従って、2-(4-Methyl-phenyl)ethylamine (**6e**, 115 mg, 0.51 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH₃CN (3.0 mL) の条件で反応を行い、**7e** の一塩酸塩を得た。分析及び生物活性試験用に、加熱しながら EtOH に一度溶解させ 2M HCl/EtOH を加えた後に静置して再結晶を行ったところ、二塩酸塩である **7e** (28 mg, 14%)を得た。

Colorless powder. mp 148 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.01 (br s, 2H), 3.58 (br s, 2H), 7.44–7.62 (m, 4H), 7.64–7.80 (m, 5H), 8.56, 9.20, 9.67 (br s, total 6H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 33.4, 43.2, 128.6, 129.1, 129.6, 129.9, 132.6, 135.3, 137.2, 143.6, 152.1, 155.1, 195.5; HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C₁₇H₂₀N₅O⁺ [M+H]⁺: 310.1668, found: 310.1653; *Anal.* Calcd for C₁₇H₂₁Cl₂N₅O: C, 53.41; H, 5.54; N, 18.32. Found: C, 53.22; H, 5.49; N, 18.59.

本化合物は新規化合物である。

Phenylbiguanide (**7f**)⁷⁴.

General Procedure 1 に従って、aniline (**6l**, 168 mg, 1.8 mmol) を用いて 150 °C, 15 min,

CH₃CN (2.4 mL) の条件で反応を行い、**7f** (320 mg, 83%) を得た。分析及び生物活性試験用に、加熱しながら MeOH に一度溶解させた後に静置して再結晶を行ったところ、**7f** を得た。

Colorless needles; Mp 246–249 °C (lit. 244–247 °C)

本化合物は文献既知であり、融点が一致したことにより構造を決定した。

Benzylbiguanide (**7g**)⁷⁵.

General Procedure 1 に従って、2-phenylethylamine **6g** (255 mg, 2.1 mmol) を用いて 150 °C, 15 min, CH₃CN (3.7 mL) の条件で反応を行い、**7g** の一塩酸塩 (217 mg, 85%) を得た。分析及び生物活性試験用に、加熱しながら EtOH に一度溶解させ 2M HCl/EtOH を加えた後に静置して再結晶を行ったところ、二塩酸塩である **7g** を得た。

Colorless powder. Mp 175–177 °C (lit. 175–178 °C); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 4.35 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 7.09 (s, 4H), 7.22–7.48 (m, 7H), 7.95 (br s, 1H); LRMS (FAB+): *m/z* [M+H]⁺: 192. *Anal.* Calcd for C₉H₁₄N₅Cl: C, 47.47; H, 6.20; N, 30.76. Found: C, 47.44; H, 6.12; N, 30.69. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルおよび融点が一致したことにより構造を決定した。

3-Phenylpropylbiguanide (**7h**)⁷⁶.

General Procedure 1 に従って、3-phenylpropylamine (**6h**, 243 mg, 1.8 mmol) を用いて 150 °C, 15 min, CH₃CN (2.4 mL) の条件で反応を行い、**7h** の一塩酸塩 (137 mg, 30%) を得た。分析及び生物活性試験用に、加熱しながら EtOH に一度溶解させ 2M HCl/EtOH を加えた後に静置して再結晶を行ったところ、二塩酸塩である **7h** を得た。

Colorless solid. Mp 197–200 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.84 (br s, 2H), 2.65 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 3.24 (br s, 2H), 7.18–7.48 (m, 5H), 8.44, 9.04, 9.51 (br s, total 6H); LRMS (FAB+): *m/z* [M+H]⁺: 220.

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

4-Phenylbutylbiguanide (**7i**)⁷⁶.

General Procedure 1 に従って、4-phenylbutylamine (**6i**, 149.2 mg, 1.0 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH₃CN (3.0 mL) の条件で反応を行い、**7i** の一塩酸塩 (264 mg, 98%) を得た。分析及び生物活性試験用に、加熱しながら EtOH に一度溶解させ 2M HCl/EtOH を加えた後に静置して再結晶を行ったところ、二塩酸塩である **7i** を得た。

Colorless powder. Mp 158–160 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 1.70 (br, 4H), 2.68 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.15–7.28 (m, 5H); LRMS (DART+): *m/z* [M+H]⁺: 234. *Anal.* Calcd for C₁₂H₂₁Cl₂N₅O₂: C, 47.06; H, 6.91; N, 22.87. Found: C, 47.02; H, 6.86; N, 23.10. 本化合物は文献既知上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

5-Phenylpentylbiguanide (7j).

General Procedure 1 に従って、5-phenylpentylamine (**6j**, 163 mg, 1.0 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH₃CN (3.0 mL) の条件で反応を行い、**7j** の一塩酸塩 (209 mg, 74%) を得た。分析及び生物活性試験用に、加熱しながら EtOH に一度溶解させ 2M HCl/EtOH を加えた後に静置して再結晶を行ったところ、二塩酸塩である **7j** を得た。

Colorless powder. Mp 164–165 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.31–1.37 (m, 2H), 1.56–1.61 (m, 4H), 2.58 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.23 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.15–7.30 (m, 5H), 7.88, 8.55, 9.09, 9.52 (br s, total 6H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 25.8, 27.2, 30.6, 35.1, 42.3, 125.7, 128.3, 128.3, 142.1, 151.8, 155.0; LRMS(DART+): *m/z* [M+H]⁺: 248. *Anal.* Calcd for C₁₃H₂₃Cl₂N₅: C, 48.75; H, 7.24; N, 21.87. Found: C, 48.50; H, 7.19; N, 21.93.

本化合物は新規化合物である。

6-Phenylheptylbiguanide (7k).

General Procedure 1 に従って、6-phenylhexylamine (**6k**, 177 mg, 1.0 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH₃CN (3.0 mL) の条件で反応を行い、**7k** の一塩酸塩 (261 mg, 88%) を得た。分析及び生物活性試験用に、加熱しながら EtOH に一度溶解させ 2M HCl/EtOH を加えた後に静置して再結晶を行ったところ、二塩酸塩である **7k** を得た。

Colorless powder. Mp 168–169 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.27–1.37 (m, 4H), 1.52–1.58 (m, 4H), 2.56–2.59 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.23 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.15–7.29 (m, 5H), 7.94, 8.56, 9.11, 9.51 (br s, total 6H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 25.9, 27.3, 28.2, 30.9, 35.1, 42.4, 125.6, 128.2, 128.3, 142.2, 151.8, 155.0; LRMS(DART+): *m/z* [M+H]⁺: 262; *Anal.* Calcd for C₁₄H₂₅Cl₂N₅: C, 50.30; H, 7.54; N, 20.95. Found: C, 50.15; H, 7.52; N, 21.02.

本化合物は新規化合物である。

5-(2-Chlorophenyl)pentylbiguanide (7l).

General Procedure 1 に従って、**6l** (198 mg, 1.0 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH₃CN (3.0 mL) の条件で反応を行い、**7l** の一塩酸塩 (219.6 mg, 69%) を得た。分析及び生物活性試験用に、加熱しながら EtOH に一度溶解させ 2 M HCl/EtOH を加えた後に静置して再結晶を行ったところ、二塩酸塩である **7l** を得た。

Colorless powder. Mp 153–155 °C; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 1.46–1.52 (m, 2H), 1.66–1.77 (m, 4H), 2.78 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.34 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.14–7.34 (m, 4H); ¹³C NMR (125 MHz CD₃OD): δ = 27.5, 28.7, 30.6, 34.3, 44.2, 128.1, 128.6, 130.4, 131.7, 134.8, 141.0, 153.7, 156.5; LRMS (DART+): *m/z* [M+H]⁺: 282; *Anal.* Calcd for C₁₃H₂₂Cl₃N₅: C, 44.02; H, 6.25; N, 19.74. Found: C, 43.75; H, 6.19; N, 19.70.

本化合物は新規化合物である。

***N*-Methyl-*N*-[2-(2-chlorophenyl)ethyl]triimidodicarbonic diamide (7m).**

General Procedure 1 に従って、**6m** (102 mg, 0.6 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH₃CN (0.8 mL) の条件で反応を行い、溶媒を減圧留去した。得られた混合物は NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/MeOH = 10 : 1) にて精製し、**7m** (92.6 mg, 61%) を得た。

Colorless amorphous; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 2.96 (s, 3H), 3.04 (t, *J* = 7.5, 2H), 3.69 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.10–7.40 (m, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ = 32.7, 36.5, 51.3, 128.3, 129.4, 130.6, 132.4, 135.1, 137.3, 160.3, 160.5; HRMS(ESI+): *m/z* calcd for C₁₁H₁₇ClN₅⁺ [M+H]⁺: 254.1172, found 254.1166.

本化合物は新規化合物である。

1-[2-(2-Chlorophenyl)ethyl]-1-prop-2-yn-1-ylbiguanide (7n).

General Procedure 1 に従って、**6n** (58 mg, 0.3 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH₃CN (4 mL) の条件で反応を行い、溶媒を減圧留去した。得られた混合物は NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/MeOH = 25 : 1) にて精製し、**7n** (58.1 mg, 71%) を得た。

Colorless amorphous; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 1.89 (s, 1H), 3.12 (t, *J* = 4.8, 2H), 3.75 (t, *J* = 5.0, 2H), 4.17 (s, 2H), 7.17–7.31 (m, 2H), 7.32–7.47 (m, 2H); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ = 24.2, 32.5, 34.3, 38.7, 45.1, 128.3, 129.6, 130.6, 132.3, 135.1, 137.3, 159.4, 161.4; HRMS (DART+): *m/z* calcd for C₁₃H₁₇ClN₅⁺ [M+H]⁺: 278.1173, found 278.1183.

本化合物は新規化合物である。

1-Butyl-[2-(2-chlorophenyl)ethyl]biguanide (7o).

General Procedure 1 に従って、**6o** (106 mg, 0.5 mmol) を用いて 150 °C, 15 min, CH₃CN (0.8 mL) の条件で反応を行い、溶媒を減圧留去した。得られた混合物は NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (Acetone/MeOH = 9:1) にて精製し、**7o** (20.6 mg, 14%) を得た。

Colorless amorphous; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 0.97 (br t, 3H), 1.37 (br m, 2H), 1.63 (br m, 2H), 3.13 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 3.44 (br m, 2H), 3.76 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.31–7.26 (m, 2H), 7.42 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ = 14.0, 20.8, 128.8, 130.1, 130.8, 132.6, 135.0, 136.0, 154.4, 157.2; HRMS (ESI+): *m/z* calcd for C₁₄H₂₃ClN₅⁺ [M+H]⁺: 296.1642, found 296.1615.

本化合物は新規化合物である。

***N*-(4-Ppentenoyl)-*N*-(3-aminopropyl)-*N*-[2-(2-chlorophenyl)ethyl]triimidodicarbonic diamide (7p).**

General Procedure 1 に従って、**6p** (88 mg, 0.3 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH₃CN (4 mL) の条件で反応を行い、溶媒を減圧留去した。得られた混合物は NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/MeOH = 15 : 1) にて精製し、**7p** (54 mg, 43%) を得た。Pale yellow paste; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 1.77 (br s, 2H), 2.23–2.40 (m, 4H), 3.05 (t, *J* = 7.5, 2H), 3.11–3.25 (m, 2H), 3.26–3.31 (m, 2H), 3.62 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 5.00–5.20 (m, 2H), 5.77–5.88 (m, 1H), 7.18–7.45 (m, 4H); ¹³CNMR (125 MHz, CD₃OD): δ = 28.5, 30.9, 32.7 36.4, 37.7, 115.9, 119.9, 128.4, 129.6, 130.9, 132.5, 135.1, 138.2, 159.9, 163.4, 175.6; HRMS (DART+): *m/z* calcd for C₁₈H₂₈ClN₆O⁺ [M+H]⁺: 379.2013, found 379.2026.

本化合物は新規化合物である。

1-[2-(2-Chlorophenyl)ethyl]-5-[2-(2-chlorophenyl)ethyl]biguanide (7q).

General Procedure 1 に従って、(284 mg, 1.8 mmol) を用いて 150 °C, 10 min, CH₃CN (3.0 mL) の条件で反応を行い、**7q** の一塩酸塩 (269 mg, 71%) を得た。分析及び生物活性試験用に、加熱しながら EtOH に一度溶解させ 2M HCl/EtOH を加えた後に静置して再結晶を行ったところ、二塩酸塩である **7q** を得た。The analytical sample was obtained by recrystallizat a colorless powder. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 3.13 (br s, 2H), 3.60 (br s, 2H), 7.28 (br s, 2H), 7.40 (br s, 2H). *Anal. Calcd. for* C₁₈H₂₃Cl₄N₅: C, 47.91; H, 5.14; N, 15.52. Found: C, 47.51; H, 5.15; N, 15.65.

本化合物は新規化合物である。

1-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-(2-methyl)phenylethane (10)⁷⁷

General Procedure 2 に従って、2-methylbenzyl nitirile (**8**) (1.05 g, 8.0 mmol) を用いて反応を行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/*n*-hexane = 1 : 1) にて精製し、**10** (748 mg, 42%) を得た。

Yellow oil; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.45 (s, 9H), 2.34 (s, 3H), 2.81 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.34 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.58 (s, 1H), 7.13–7.26 (m, 4H).

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

2-Methylphenetylamine (4)⁷⁸.

General Procedure 3 に従って、**10** (17.1 g, 73.0 mmol) を用いて脱保護を行った後に、脱塩酸塩処理を行い、**4** (5.29 g, 54%) を得た。

Pale yellow oil. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.26 (s, 3H), 2.63 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.70 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.07–7.11 (m, 4H).

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

1-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-(2-trifluoromethyl)-phenyl ethane (**11**).

General Procedure 2 に従って、2-trifluoromethylbenzyl nitrile (**9**, 740.6 mg, 4.0 mmol) を用いて反応を行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/*n*-hexane = 1 : 1) にて精製し、**11** (948 mg, 82%) を得た。

Pale yellow solid. Mp 60–61 °C.; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.44 (s, 9H), 2.99 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.38 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.63 (s, 1H), 7.31–7.38 (m, 2H), 7.31–7.65 (m, 4H); ¹³C NMR (125 MHz CDCl₃): δ = 28.4, 33.1, 41.6, 79.3, 124.5 (q, *J* = 273.9 Hz), 126.1 (q, *J* = 5.6 Hz), 126.5, 128.9 (q, *J* = 29.6 Hz), 131.6, 131.8, 137.6, 155.8; HRMS (DART+): *m/z* [M+H]⁺: 579. *Anal.* Calcd. for C₁₄H₁₈F₃NO₂: C, 58.12; H, 6.27; N, 4.84, found: C, 58.12; H, 6.21; N, 4.72.

本化合物は新規化合物である。

2-Trifluoromethylphenetylamine (**6c**)⁷⁹.

General Procedure 3 に従って、**11** (902 mg, 3.1 mmol) を用いて脱保護を行い、**6c** の一塩酸塩を得た (705 mg, quant.). 得られた一塩酸塩 (461 mg, 2.0 mmol) を用いて脱塩を行い、**6c** (353 mg, 92%) を得た。

Pale yellow oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 2.94 (br, 2H), 2.98 (br, 2H), 7.31 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.35 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.48 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.64 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H).

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

2-Iodobenzyl cyanide (**13**). CAS 40400-15-5

2-Iodobenzyl bromide (**12**, 8.90 g, 30.0 mmol) を EtOH (50 mL) に溶解し、NaCN (4.41 g, 90.0 mmol) を加え、7 h 加熱還流した。反応溶液を室温に戻し、水で希釈し、EtOAc で 4 回抽出し、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去し、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/EtOAc = 5 : 1) にて精製し、**13** (6.77 g, 93%) を得た。

Brown oil. LRMS (DART+): *m/z* calcd for [M+H]⁺: 244, found 244.

本化合物は文献既知であり、質量数が一致したことにより次の反応に用いた。

2-Iodophenetylamine (**6b**)⁸⁰.

2-Iodobenzyl cyanide (**13**, 6.76 g, 27.8 mmol) を THF (10 mL) に溶解し、窒素雰囲気下、0 °C で 0.93 M BH₃·THF (60 mL, 83.4 mmol) をゆっくり滴下した後に、室温に戻し、6 h 攪拌した。溶媒を減圧留去し、NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/methanol = 1:1) にて精製し、**6b** (4.13 g, 60%) を得た。

Pale yellow oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.44 (s, 9H), 2.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.96 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 6.91 (td, *J* = 2.0 Hz, 7.5 Hz, 1H), 7.19–7.31 (m, 2H), 7.79–7.85 (m, 1H); LRMS

(DART+): m/z $[M+H]^+$: 248.

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

2,2,2-Trifluoro-*N*-(2-phenylethyl)acetamide (15)⁶⁹.

2-phenylethylamine (**14**, 606 mg, 5.0 mmol) を dry THF (10 mL) に溶解し、trifluoromethanesulfonic anhydride (1.19 mL, 10 mmol) を加えて窒素雰囲気下、室温で 3 h 攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/EtOAc = 1 : 1)にて精製し、**15** (1.06 g, 98%) を得た。white solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 2.89 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.64 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 7.20–7.40 (m, 5H).

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

***N*-[2-(4-Benzoylphenyl)ethyl]-2,2,2-trifluoroacetamide (16)⁶⁹.**

2,2,2-Trifluoro-*N*-(2-phenylethyl)acetamide (**15**, 740 mg, 3.4 mmol) を TfOH (1 mL) に溶解し、benzoic anhydride (1.54 g, 6.8 mmol) を加えて窒素雰囲気下、0 °C で 4 h 攪拌した。反応溶液を室温に戻し、水で希釈し、EtOAc で 3 回抽出し、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/EtOAc = 8 : 1) にて精製し、**16** (196 mg, 18%) を得た。colorless oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 3.00 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.68 (q, J = 7.0 Hz, 2H) 7.17–7.75 (m, 9H).

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

4-Benzophenylethylamine (6e)⁶⁹.

N-[2-(4-Benzoylphenyl)ethyl]-2,2,2-trifluoroacetamide (**16**, 196 mg, 0.61 mmol) を MeOH (1 mL) に溶解し、1 M NaOH (4 mL)を加えて、窒素雰囲気下、0 °C で 2 h 攪拌した。反応溶液を室温に戻し、水で希釈し、EtOAc で 3 回抽出し、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去し **6e** (115 mg, 84%) を得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 2.86 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.04 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 7.20–7.81 (m, 9H).

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

4-Phenylbutyl tosylate (19)⁸¹.

文献の方法に従って³⁹、tosyl chloride (1.14 g, 6.0 mmol) を CH₂Cl₂ (6 mL) に溶解し、氷冷下攪拌しながら、4-phenylbutyl alcohol (**17**, 750 mg, 5.0 mmol) と pyridine (403 μ L, 5 mmol) を加えた後、室温にて 24 h 攪拌した。反応溶液を CH₂Cl₂ で希釈し、0.1 M 塩酸で 2 回、NaHCO₃ 飽和水溶液で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラム

クロマトグラフィー (*n*-hexane/CHCl₃ = 2 : 1) にて精製し、**19** (707 mg, 47%) を得た。pale yellow oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.66 (br, 4H), 2.44 (s, 3H), 2.56 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.03 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.78 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H).

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

5-Phenylpentyl tosylate (**20**)⁸².

文献の方法に従って³⁹、tosyl chloride (1.14 g, 6.0 mmol) を CH₂Cl₂ (6 mL) に溶解し、氷冷下撹拌しながら、5-phenylpentyl alcohol (**18**, 821 mg, 5 mmol) と pyridine (403 μL, 5 mmol) を加えたのち、室温にて 48 h 撹拌した。反応溶液を CH₂Cl₂ で希釈し、0.1 M 塩酸で 2 回、NaHCO₃ 飽和水溶液で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/CHCl₃ = 2 : 1) にて精製し、**20** (1.43 g, 78%) を得た。pale yellow oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.31–1.38 (m, 2H), 1.52–1.60 (m, 2H), 1.63–1.70 (m, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.56 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.01 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.12 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.18 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.27 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.78 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H).

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

5-Phenylpentyl nitrile (**21**)⁸³.

文献の方法に従って³⁵、**19** (625 mg, 2.1 mmol) を DMSO (5 mL) に溶解し、KCN (668 mg, 10.3 mmol) を加え、120 °C で 5 h 撹拌した。反応溶液を室温まで冷却した後、H₂O を加え、EtOAc で抽出した。集めた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/CHCl₃ = 2 : 1) にて精製し、**21** (291 mg, 89%) を得た。colorless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.67–1.72 (m, 2H), 1.76–1.82 (m, 2H), 2.35 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.66 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.17–7.31 (m, 5H).

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

6-Phenylhexyl nitrile (**22**)³⁵.

文献の方法に従って³⁵、**20** (1.91 g, 6 mmol) を DMSO (15 mL) に溶解し、KCN (1.95 g, 30 mmol) を加え、120 °C で 5 h 撹拌した。反応溶液を室温まで冷却した後、H₂O を加え、EtOAc で抽出した。集めた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/CHCl₃ = 2 : 1) にて精製し、**22** (935 mg, 90%) を得た。colorless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.44–1.56 (m, 2H), 1.62–1.72 (m, 4H), 2.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.63 (t, *J* = 7.0

Hz, 2H), 7.16–7.30 (m, 5H).

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

1-tert-Butoxycarbonylamino-5-phenylpentane (23).

General Procedure 2 に従って、**21** (478 mg, 3.0 mmol) を用いて行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/*n*-hexane = 2 : 1) にて精製し、**23** (543 mg, 69%) を得た。yellow oil; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.33–1.39 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.48–1.52 (m, 2H), 1.59–1.67 (m, 2H), 2.61 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.11 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.50 (s, 1H), 7.16–7.29 (m, 5H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 26.4, 28.4, 29.9, 31.1, 35.8, 40.5, 79.0, 125.7, 128.3, 128.4, 142.5, 155.9; LRMS (DART+): *m/z* [2M+H]⁺: 527. *Anal.* Calcd. for C₁₆H₂₅NO₂: C, 72.96; H, 9.57; N, 5.32. Found: C, 72.93; H, 9.59; N, 5.28.

本化合物は新規化合物である。

1-tert-Butoxycarbonylamino-6-phenyl hexane (24).

General Procedure 2 に従って、**22** (693 mg, 4.0 mmol) を用いて行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/*n*-hexane = 2 : 1) にて精製し、**24** (694 mg, 63%) を得た。yellow oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.33–1.35 (m, 4H), 1.44 (s, 11H), 1.62 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.60 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.11 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.16–7.30 (m, 5H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 26.6, 28.4, 28.9, 30.0, 31.3, 35.8, 40.5, 79.0, 125.6, 128.2, 128.3, 142.6, 155.9; LRMS(DART+): *m/z* [2M+H]⁺: 555. *Anal.* Calcd. for C₁₆H₂₅NO₂: C, 73.61; H, 9.81; N, 5.05, Found: C, 73.51; H, 9.86; N, 4.85.

本化合物は新規化合物である。

Phenylpentylamine (6j)⁸⁴.

General Procedure 3 に従って、**23** (481 mg, 1.8 mmol) を用いて行い **6j** (296 mg, quant.) を得た。

pale yellow oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.33–1.39 (m, 2H), 1.48–1.54 (m, 2H), 1.60–1.66 (m, 2H), 2.61 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.71 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.16–7.29 (m, 5H).

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

Phenylhexyl amine (6k)⁸⁴.

General Procedure 3 に従って、**24** (460 mg, 1.7 mmol) を用いて行い、**7k** (295 mg, quant.) を得た。

Pale yellow oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.34 (br, 4H), 1.48 (br, 2H), 1.61 (br, 2H), 2.59 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.69 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.16–7.28 (m, 5H).

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

3-Cyanopropyl triphenylphosphonium bromide (26)³⁶

文献の方法に従って³⁶、toluene (30 mL) に triphenylphosphine (5.30 g, 20.2 mmol) と 4-bromobutronitrile (**25**, 2.49 g, 16.8 mmol) を加え、窒素雰囲気下 18 h 加熱還流した。反応溶液を室温まで冷却、フィルター濾取、ジエチルエーテルで洗浄した後に乾燥して、**26** (6.07 g, 88%) を得た。

White powder; ¹H NMR (500 MHz CDCl₃): δ = 2.01–2.06 (m, 2H), 3.12 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 4.13–4.19 (m, 2H), 7.71–7.89 (m, 15H).

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

EZ mixture of 5-(2-chlorophenyl)pent-4-enitrile (27).

文献の方法に従って³⁶、氷冷下、dry THF (60 mL) に sodium hydride (576 mg, 24 mmol) を加えた後、**26** (5.91 g, 14.4 mmol) をゆっくり加え、窒素雰囲気下、室温で 15 min 攪拌した。dry DMSO (6 mL) を加え、室温で 2 h 攪拌した後、2-chlorobenzaldehyde (1.69 g, 12 mmol) をゆっくり滴下し、さらに室温で 4 h 攪拌した。反応溶液に飽和 NH₄Cl 水溶液 (50 mL) を加え、EtOAc で抽出した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/EtOAc = 10 : 1) による精製を行い、EZ 混合物である **27** (1.95 g, 85%, *E* : *Z* = 1 : 4) を得た。

Colorless oil; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 2.42 (t, *J* = 7.4 Hz), 2.53 (q, *J* = 6.9 Hz, triplet of *E* form was overlapped completely), 2.62 (q, *J* = 6.9 Hz), 5.80 (dt, *J* = 5.7 Hz, 13.7 Hz), 6.19 (dt, *J* = 6.9 Hz, 16.0 Hz), 6.68 (d, *J* = 11.5 Hz), 6.91 (d, *J* = 16.0 Hz), 7.19–7.51 (m, 4H).

本化合物は新規化合物であり、上記スペクトルより構造及び *E* 体と *Z* 体の比率を決定した。

5-(2-Chlorophenyl)pentnitrile (28)⁸⁵.

文献の方法に従って⁸⁶、混合溶媒 (EtOAc : 1,4-dioxane = 4 : 1, 25 mL) に EZ 混合物 **27** (958 mg, 5.0 mmol) を加え、脱気後、水素風船で系内を水素で置換し、室温で 8 h 攪拌した。セライト濾過を行った後に溶媒を減圧留去し、得られた残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/CHCl₃ = 1 : 1) にて精製し **28** (970.9 mg, quant.) を得た。Colorless oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.71–1.81 (m, 4H), 2.38 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.78 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.14–7.35 (m, 4H).

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

1-tert-Butoxycarbonylamino-5-(2-chloro)-phenyl pentan (29).

General Procedure 2 に従って、**28** (775 mg, 4.0 mmol) を用いて反応を行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/*n*-hexane = 3 : 2) にて精製し、**29**

(860 mg, 72%) を得た。

Pale yellow oil. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.36\text{--}1.42$ (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.49–1.55 (m, 2H), 1.60–1.66 (m, 2H), 2.72 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 3.12 (br, 2H), 4.51 (s, 1H), 7.11–7.33 (m, 4H); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz CDCl_3): $\delta = 26.5, 28.4, 29.4, 29.9, 33.4, 40.5, 79.0, 126.7, 127.1, 129.4, 130.3, 133.8, 140.0, 155.9$; LRMS(DART+): m/z $[2\text{M}+\text{H}]^+$: 595. *Anal.* Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{ClNO}_2$: C, 64.53; H, 8.12; N, 4.70. Found: C, 64.53; H, 8.12; N, 4.70.

本化合物は新規化合物である。

2-Chlororophenylpentylamine (6l).

General Procedure 3 に従って、**29** (351 mg, 1.2 mmol) を用いて脱保護と脱塩を行い、**6l** (218 mg, 94%) を得た。

Pale yellow oil. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.37\text{--}1.43$ (m, 2H), 1.46–1.52 (m, 2H), 1.60–1.66 (m, 2H), 2.69 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.73 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.11–7.33 (m, 4H); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 26.6, 29.6, 33.5, 33.5, 42.1, 126.6, 127.1, 129.4, 130.2, 133.8, 140.1$; LRMS(DART+): m/z $[2\text{M}+\text{H}]^+$: 395. *Anal.* Calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N} \cdot 1/3\text{H}_2\text{O}$: C, 55.01; H, 7.41; N, 5.83, found: C, 55.07; H, 7.41; N 5.93.

本化合物は新規化合物である。

4-Pentenoyl chloride (32). CAS 39716-58-0

4-pentenoic acid (**31**, 2.00 g, 20 mmol)に Thionyl chloride (7.14 g, 60 mmol)を窒素雰囲気下室温で、1分かけて加えた後に、80 °C で 40 min 攪拌した。反応溶液を室温まで冷却した後に、20 °C、75 mmHg で thionyl chloride を留去し、**32** (2.38 g, quant.)を得た。

Colorless oil. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.39\text{--}2.48$ (m, 2H), 3.00 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 5.07–5.14 (m, 2H), 5.74–5.84 (m, 1H).

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

N-(3-Bromopropyl)pent-4-enamide (33).

4-Pentenoyl chloride (**32**, 1.02 g, 3.0 mmol)を CH_2Cl_2 (10 mL)に溶解させ、窒素雰囲気下 0 °C で、 Et_3N (2.92 mL, 21 mmol)を加えた後に、 CH_2Cl_2 (10 mL) に溶解させた 3-bromopropylamine (1.66 mg, 14 mmol)を 15分かけて加え、2 h 攪拌した。反応懸濁液を室温に戻し CH_2Cl_2 (60 mL)に溶解させ、有機層を 0.1 M 塩酸 で 1 回、 NaHCO_3 飽和水溶液で 1 回、飽和食塩水で 1 回洗浄した後に無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去し、得られた残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\text{EtOAc}/n\text{-hexane} = 1 : 2$) にて精製し、**33** (1.45 g, 60%)を得た。

Brown oil. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.06\text{--}2.11$ (quint, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.00–2.3 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.37–2.42 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.39–3.45 (m, 4H), 5.01–5.16 (m, 2H), 5.77–5.84 (m,

2H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 29.6, 31.0, 32.1, 35.8, 115.7, 137.0, 172.6$; HRMS(DART+): m/z calcd for $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{BrNO}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 220.0332, found 295.0302.

本化合物は新規化合物である。

***N*-[2-(2-Chlorophenyl)ethyl]-2-nitrobenzenesulfonamide (30).**

2-(2-Chlorophenyl)ethylbiguanide dihydrochloride (**5**, 757 μL , 5.0 mmol) を CH_2Cl_2 (10 mL) に溶解し NEt_3 (767 μL , 5.5 mmol) を加え、2-nitrobenzenesulfonyl chloride (1.11 g, 5.5 mmol) を 0°C で 5 min かけて加えた後に、感応溶液を室温に戻し 15 min 攪拌した。反応溶液に 1M HCl aq (10 mL) を加え、 CHCl_3 で抽出した。集めた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去し、**30** (1.71 g, quant.) を得た。

White solid. ^1H NMR (500 MHz CDCl_3): $\delta = 2.98$ (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.42 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.56 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.15–7.26 (m, 4H), 7.71–7.73 (m, 2H), 7.83–7.85 (m, 1H), 8.10–8.12 (m, 1H).

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

***N*-[2-(2-Chlorophenyl)ethyl]-*N*-methyl-2-nitrobenzenesulfonamide (34).**

General Procedure 4 に従って、iodomethane (3.74 mL, 60.0 mmol) を用いて反応を行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/*n*-hexane = 1:1) にて精製し、**34** (2.20 g, quant.) を得た。

Pale yellow oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.96$ (s, 3H), 3.03 (t, $J = 8.2$), 3.48 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.10–7.22 (m, 2H), 7.26 (d, $J = 7.2$, 1H), 7.30 (d, $J = 7.2$, 1H), 7.60 (d, $J = 7.7$, 1H), 7.63–7.72 (m, 2H), 7.94 (d, $J = 7.5$, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): $\delta = 32.5, 34.9, 49.7, 124.1, 127.1, 128.3, 129.5, 130.6, 131.2, 131.7, 132.3, 133.5, 133.8, 135.40, 148.0$; HRMS (DART+): m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 355.0519, found 355.0506.

本化合物は新規化合物である。

***N*-[2-(2-Chlorophenyl)ethyl]-*N*-propargyl-2-nitrobenzenesulfonamide (35).**

General Procedure 4 に従って、propargyl bromide (250 μL , 3.3 mmol) を用いて反応を行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/*n*-hexane = 1:1) にて精製し、**35** (1.08 g, 95%) を得た。

White solid. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.23$ (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 3.06 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.67 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 4.24 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 7.11–7.33 (m, 4H), 7.60–7.72 (m, 3H), 8.01–8.06 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): $\delta = 32.38, 36.99, 46.45, 73.92, 76.97, 124.27, 127.06, 128.36, 130.89, 131.23, 131.71, 132.78, 133.97, 135.34, 148.07$; HRMS (DART+): m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 379.0519, found 379.0524.

本化合物は新規化合物である。

***N*-[2-(2-Chlorophenyl)ethyl]-*N*-butyl-2-nitrobenzenesulfonamide (36).**

General Procedure 4 に従って、*n*-butyl bromide (707 μ L, 18.0 mmol) を用いて反応を行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/*n*-hexane = 1:1) にて精製し、**36** (2.50 g, quant.) を得た。

White solid. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz CDCl_3): δ = 0.90 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 1.30 (sext, J = 7.4 Hz, 2H), 1.54–1.60 (m, 2H), 3.00 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 3.37 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 3.50 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 7.11–7.27 (m, 3H), 7.30 (dd, J = 7.4, 1.7 Hz, 1H), 7.58–7.71 (m, 3H), 7.99–8.04 (m, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): δ = 13.40, 19.45, 29.90, 32.77, 46.54, 47.45, 123.95, 126.92, 128.10, 129.21, 130.16, 131.06, 131.62, 132.93, 133.48, 133.51, 135.35, 147.69; HRMS(DART+): m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}^+$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 397.0983, found 397.0976.

本化合物は新規化合物である。

***N*-(4-Pentenyl)-*N*-(3-aminopropyl)-*N*-[2-(2-chlorophenyl)ethyl]-2-nitrobenzenesulfonamide (37).**

General Procedure 4 に従って、***N*-(3-Bromopropyl)pent-4-enamide (33)**, 946 mg, 4.3 mmol) を用いて反応を行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/*n*-hexane = 1:1) にて精製し、**37** (1.19 g, 83%) を得た。

Pale brown oil. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz CDCl_3): δ = 1.81 (quint, J = 6.4 Hz, 2H), 2.29 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.40 (q, J = 7.3 Hz, 2H), 2.97 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 3.47 (quint, J = 7.7 Hz, 4H), 5.01 (dd, J = 10.0, 1.4 Hz, 1H), 5.08 (dd, J = 18.0, 1.4 Hz, 1H), 5.79–5.88 (m, 1H), 6.07 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 7.14–7.30 (m, 4H), 7.62–8.00 (m, 4H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): δ = 27.59, 29.55, 32.92, 35.66, 35.85, 45.69, 47.17, 115.51, 124.27, 127.16, 128.46, 130.56, 131.29, 131.77, 131.80, 132.07, 133.67, 133.80, 135.23, 137.01, 135.05, 172.54; HRMS(DART+): m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}^+$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 480.1355, found 480.1430.

本化合物は新規化合物である。

***N*-[2-(2-Chlorophenyl)ethyl]-*N*-methylamine (6m). CAS 52516-17-3**

General Procedure 5 に従って、化合物 **32** (2.13 g, 6.0 mmol) を用いて反応を行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl_3 /*n*-hexane/ NH_3 aq = 2 : 1 : 0.01) にて精製し、**6m** (784 mg, 77%) を得た。

Pale brown oil. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ = 2.74 (s, 3H), 3.02 (t, J = 8.3 Hz, 2H), 3.18 (t, J = 8.3 Hz, 2H), 7.16–7.21 (m, 4H).

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

***N*-[2-(2-Chlorophenyl)ethyl]-*N*-propargylamine (6n).**

General Procedure 5 に従って、化合物 **35** (947 mg, 2.5 mmol) を用いて反応を行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/*n*-hexane = 1 : 1) にて精製し、**6n** (384 mg, 80%) を得た。

Brown oil. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 2.22 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 2.92–3.02 (m, 4H), 3.46 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 7.13–7.22 (m, 2H), 7.20–7.27 (m, 1H), 7.35 (dd, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 33.87, 38.06, 48.06, 71.40, 81.98, 126.79, 127.71, 129.57, 130.74, 134.13, 137.36; HRMS(DART+): *m/z* calcd for C₁₁H₁₃ClN⁺ [M+H]⁺: 194.0737, found 194.0738. 本化合物は新規化合物である。

***N*-[2-(2-Chlorophenyl)ethyl]-*N*-butylamine (6o).**

General Procedure 5 に従って、化合物 **36** (2.38 g, 6.0 mmol) を用いて反応を行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/MeOH = 10 : 1) にて精製し、**6o** (1.16 g, 92%) を得た。

Pale yellow paste. ¹H NMR (500 MHz CDCl₃): δ = 0.95 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 1.38 (sext, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.56 (quint, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.75 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.92–2.95 (m, 2H), 3.00–3.31 (m, 2H), 7.20–7.27 (m, 2H), 7.33 (dd, *J* = 7.4, 1.7 Hz, 1H), 7.38 (dd, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H); HRMS(DART+): *m/z* calcd for C₁₂H₁₉ClN⁺ [M+H]⁺: 212.1201, found 212.1180. 本化合物は新規化合物である。

***N*-(4-Pentenyl)-*N*-(3-aminopropyl)-*N*-2-(2-chlorophenyl)ethylamine (6p).**

General Procedure 5 に従って、化合物 **37** (1.19 g, 2.5 mmol) を用いて反応を行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/*n*-hexane/NH₃ aq = 9 : 1 : 0.01) にて精製し、**6p** (600 mg, 82%) を得た。

Pale yellow oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.65 (quint, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.19 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H), 2.36 (q, *J* = 8.2 Hz, 2H), 2.97 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H), 3.31 (q, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.47 (quint, *J* = 8.2 Hz, 4H), 5.01 (dd, *J* = 10.0, 1.4 Hz, 1H), 5.08 (dd, *J* = 18.0, 1.4 Hz, 1H), 5.79–5.88 (m, 1H), 6.78 (br s, 1H), 7.15–7.27 (m, 3H), 7.35 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 28.74, 29.70, 34.09, 35.96, 39.02, 48.43, 49.41, 115.40, 126.87, 127.75, 129.63, 130.69, 134.09, 137.20, 137.49, 172.16; HRMS(DART+): *m/z* calcd for C₁₆H₂₄ClN₂O⁺ [M+H]⁺: 295.1572, found 295.1611.

本化合物は新規化合物である。

第二章第二節に関する化合物の合成

1-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-(2-bromo)phenylethane (**42**)⁸⁷.

6a (140 mg, 0.70 mmol) を MeOH (2 mL) に溶解させ、Et₃N (390 μ L, 2.8 mmol)を加えた。MeOH (1 mL) に溶解させた(Boc)₂O (158 mg, 0.70 mmol)をゆっくり滴下し、室温で 13 h 攪拌した。反応溶液に水を加え、EtOAc で抽出し、飽和食塩水で 1 回洗浄した。集めた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-hexane/EtOAc = 10 : 1) にて精製し、**42** (205 mg, 97%) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.43 (s, 9H), 2.96 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.39 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 4.58 (br s, 1H), 7.06–7.13 (m, 1H), 7.18–7.29 (m, 2H), 7.54 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H).

化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

1-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-(4-bromo)phenylethane (**43**)⁶⁹.

41 (200 mg, 1.0 mmol) を MeOH (3 mL) に溶解させ、Et₃N (558 μ L, 4 mmol)を加えた。MeOH (1 mL) に溶解させた(Boc)₂O (437 mg, 2 mmol)をゆっくり滴下し、室温で 14 h 攪拌した。反応溶液に水を加え、EtOAc で抽出し、飽和食塩水で 1 回洗浄した。集めた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-hexane/EtOAc = 10 : 1) にて精製し、**43** (266 mg, 89%) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.43 (s, 9H), 2.76 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.36 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 4.52 (br s, 1H), 7.07 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H).

化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

tert-Butyl 2-(2,2,2-Trifluoroacetyl)phenethylcarbamate (**44**).

文献の方法に従って⁶⁹、*tert*-Butyl 2-bromophenethylcarbamate **42** (1.44 g, 5.3 mmol) を THF (20 mL)に溶解させ、Ar 雰囲気下、0 °C で potassium hydride (30% suspension in mineral oil, 703 μ L, 5.3 mmol)をゆっくり滴下した後に、-78 °C に冷却し、*t*-BuLi (1.7 M in pentane; 2.1 mL, 13.1 mmol)を 20 min かけて加え 10 min 攪拌した。反応懸濁液に ethyl trifluoroacetate (3.14 mL, 26 mmol)を加え、4 h 攪拌した。反応懸濁液に飽和 NH₄Cl 水溶液を加え、室温に戻し、diethyl ether で抽出し、飽和食塩水で 1 回洗浄した。集めた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-hexane/EtOAc = 10 : 1) にて精製し、**44** (669 mg, 40%) を得た。

pale yellow oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.42 (s, 9H), 3.06 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.39 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.71 (br s, 1H), 7.41 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.59 (td, *J* = 1.0 Hz, *J* = 8.2 Hz, 1H),

7.90 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H). ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3): $\delta = -71.0$ ppm. LRMS (ESI+): $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 330.

本化合物は新規化合物である。

***tert*-Butyl 4-(2,2,2-trifluoroacetyl)phenethylcarbamate (45)⁶⁹.**

文献の方法に従って⁶⁹、*tert*-Butyl 2-bromophenethylcarbamate **43** (300 mg, 1.0 mmol) を THF (4 mL) に溶解させ、Ar 雰囲気下、0 °C で potassium hydride (30% suspension in mineral oil, 167 μL , 1 mmol) をゆっくり滴下した後に、-78 °C に冷却し、*t*-BuLi (1.7 M in pentane, 1.5 mL, 2.5 mmol) を 20 min かけて加え 10 min 攪拌した。反応懸濁液に ethyl trifluoroacetate (597 μL , 5.0 mmol) を加え、4 h 攪拌した。反応懸濁液に飽和 NH_4Cl 水溶液を加え、室温に戻し、diethyl ether で抽出し、飽和食塩水で 1 回洗浄した。集めた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-hexane/EtOAc = 10 : 1) にて精製し、**45** (228 mg, 72%) を得た。

Pale yellow oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.43$ (s, 9H), 2.91 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.42 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.57 (br s, 1H), 7.38 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H). ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3): $\delta = -74.5$ ppm. LRMS (ESI+): $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 330.

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

***tert*-Butyl 2-[2,2,2-trifluoro-1-(hydroxyimino)ethyl]phenethylcarbamate (46).**

文献の方法に従って⁶⁹、*tert*-Butyl 2-(2,2,2-Trifluoroacetyl)phenethylcarbamate **44** (100 mg, 0.32 mmol) および hydroxylamine hydrochloride (66 mg, 0.9 mmol) を pyridine (2 mL) に加え、80 °C で 3 h 攪拌した。反応溶液から pyridine を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-hexane/EtOAc = 10 : 1) にて精製し、**46** (57 mg, 55%) を得た。

pale yellow amorphous solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.42$ (d, $J = 3.5$ Hz, 9H), 2.69–2.79 (m, 2H), 3.34–3.49 (m, 2H), 4.68 (br s, 0.5H), 4.74 (br s, 0.5H), 7.26–7.46 (m, 2H), 9.41 (br s, 0.5H), 10.07 (d, $J = 8.2$ Hz, br s, 0.5H); ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3): $\delta = -70.7, -66.7$ ppm. LRMS (ESI+): $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 355.

本化合物は新規化合物である。

***tert*-Butyl 4-[2,2,2-trifluoro-1-(hydroxyimino)ethyl]phenethylcarbamate (47)⁶⁹.**

文献の方法に従って⁶⁹、*tert*-Butyl 2-(2,2,2-Trifluoroacetyl)phenethylcarbamate **45** (415 mg, 1.3 mmol) および hydroxylamine hydrochloride (273 mg, 3.9 mmol) を pyridine (10 mL) に加え、80 °C で 7 h 攪拌した。反応溶液から pyridine を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-hexane/EtOAc = 10 : 1) にて精製し、**47** (396 mg, 91%) を得た。

Pale yellow amorphous. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.43$ (d, $J = 3.5$ Hz, 9H), 2.82 (d, $J =$

7.5 Hz, 2H), 3.40 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 4.63 (br s, 1H), 7.20 (d, $J = 7.5$ Hz, 1.2H), 7.28 (d, $J = 7.5$ Hz, 0.8H), 7.36 (d, $J = 7.5$ Hz, 1.2 H), 7.44 (d, $J = 7.5$ Hz, 0.8H), 9.05 (br s, 0.4H), 9.55 (br s, 0.6H). ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3): $\delta = -69.7, -65.5$ ppm. LRMS (ESI+): $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 355.
本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

***tert*-Butyl 2-[2,2,2-trifluoro-1-(tosyloxyimino)ethyl]phenethylcarbamate (48).**

文献の方法に従って⁶⁹、*tert*-Butyl 4-[2,2,2-trifluoro-1-(hydroxyimino)ethyl]phenethylcarbamate **46** (48.2 mg, 0.15 mmol)を acetone (2 mL)に溶解し、0 °C で Triethylamine (61 μL)および *p*-toluenesulfonyl chloride (55.3 mg, 0.3 mmol)を加え 1 h 攪拌した。溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-hexane/EtOAc = 10 : 1)にて精製し、**48** (68.0 mg, 96%)を得た。

Colorless amorphous. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.45$ (d, $J = 3.5$ Hz, 9H), 2.47 (s, 1.5H), 2.49 (s, 1.5H), 2.50–2.67 (m, 2H), 3.15 (q, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.15 (q, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.30 (quin., $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.55 (br s, 0.5H), 4.64 (br s, 0.5H), 7.07 (d, $J = 8.0$ Hz, 0.5H), 7.17 (d, $J = 8.0$ Hz, 0.5H), 7.25–7.49(m, 5H), 7.86 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H); ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3): $\delta = -71.1, -65.9$.

本化合物は新規化合物である。

***tert*-Butyl 4-[2,2,2-trifluoro-1-(tosyloxyimino)ethyl]phenethylcarbamate (49)⁶⁹.**

文献の方法に従って⁶⁹、*tert*-Butyl 4-[2,2,2-trifluoro-1-(hydroxyimino)ethyl]phenethylcarbamate **47** (100 mg, 0.30 mmol)を acetone (2 mL)に溶解し、0 °C で Triethylamine (126 μL)および *p*-toluenesulfonyl chloride (115 mg, 0.6 mmol)を加え 1 h 攪拌した。溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-hexane/EtOAc = 10 : 1)にて精製し、**49** (132 mg, 90%)を得た。

Colorless amorphous. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.43$ (d, $J = 5.8$ Hz, 9H), 2.47 (d, $J = 8.6$ Hz, 3H), 2.84 (q, $J = 7.9$ Hz, 2H), 3.39 (quin., $J = 6.3$ Hz, 2H), 4.53 (br s, 0.5H), 4.58 (br s, 0.5H), 7.22–7.33 (m, 2H), 7.37 (q, $J = 7.5$ Hz, 4H), 7.87–7.91 (m, 2H).

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

***tert*-Butyl 2-[3-(Trifluoromethyl)-3H-diaziridine-3-yl]phenethylcarbamate (50).**

文献の方法に従って⁶⁹、耐圧チューブ内に *tert*-Butyl 2-[2,2,2-trifluoro-1-(tosyloxyimino)ethyl]phenethylcarbamate **48** (1.76 g, 3.6 mmol)を diethyl ether (5 mL)に溶解し、-78 °C で液体 NH_3 を加えた後に室温に戻し、36 h 攪拌した。窒素バブリングにより NH_3 除去し、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-hexane/EtOAc = 2 : 1)にて精製し、**50** (546 mg, 48%)を得た。

Colorless amorphous. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.40$ (s, 9 H), 2.42 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H),

2.90–3.02 (m, 3H), 3.40–3.49 (m, 2 H), 5.03 (br s, 1 H), 7.26–7.45 (m, 4 H) ppm; ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3): $\delta = -79.8$. LRMS (ESI): $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 354.

本化合物は新規化合物である。

***tert*-Butyl 4-[3-(Trifluoromethyl)-3H-diazirindine-3-yl]phenethylcarbamate (51)⁶⁹.**

文献の方法に従って⁶⁹、耐圧チューブ内に *tert*-Butyl 4-[2,2,2-trifluoro-1-(tosyloxyimino)ethyl]phenethylcarbamate **49** (131 mg, 270 μmol)を diethyl ether (5 mL)に溶解し、 -78°C で液体 NH_3 を加えた後に室温に戻し、36 h 攪拌した。窒素バブリングにより NH_3 除去し、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-hexane/EtOAc = 2 : 1) にて精製し、**51** (89 mg, quant.) を得た。

Colorless amorphous. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.43$ (s, 9 H, *t*Bu), 2.23 (d, $J = 9.6\text{Hz}$, 1 H), 2.78–2.84 (m, 3 H), 3.37 (q, $J = 6.5\text{Hz}$, 2 H), 4.59 (br s, 1 H), 7.24–7.56 (m, 2 H), 7.55 (d, $J = 8.2\text{ Hz}$, 2 H) ppm; LRMS (ESI+): $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 354.

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

2-[3-(Trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]phenethylcarbamate (52).

文献の方法に従って⁶⁹、*tert*-Butyl 2-[3-(Trifluoromethyl)-3H-diazirindine-3-yl]phenethylcarbamate **50** (576 mg, 1.7 mmol)を diethyl ether (15 mL)に溶解し、 MnO_2 (2.0 g)を加え室温で 1 h 攪拌した。反応懸濁液をフィルター濾取し、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl_3) にて精製し、**52** (560 mg, quant.)を得た。

Colorless amorphous. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.44$ (s, 9 H), 3.16 (t, $J = 7.0\text{ Hz}$, 2 H), 3.42 (q, $J = 7.0\text{ Hz}$, 2 H), 4.64 (br s, 1 H), 7.26–7.33 (m, 2 H), 7.38–7.43 (m, 1 H), 7.62 (d, $J = 7.5\text{ Hz}$, 1 H) ppm; LRMS (ESI+): $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 352.

本化合物は新規化合物である。

4-[3-(Trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]phenethylcarbamate (53)⁶⁹.

文献の方法に従って⁶⁹、*tert*-Butyl 2-[3-(Trifluoromethyl)-3H-diazirindine-3-yl]phenethylcarbamate **51** (89 mg, 89 μmol)を diethyl ether (15 mL)に溶解し、 MnO_2 (2.0 g)を加え室温で 1 h 攪拌した。反応懸濁液をフィルター濾取し、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl_3) にて精製し、**53** (197 mg, 93%)を得た。

Colorless amorphous. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.42$ (s, 9 H), 2.81 (t, $J = 6.5\text{ Hz}$, 2 H), 3.36 (q, $J = 6.75\text{ Hz}$, 2 H), 4.52 (br. s, 1 H), 7.13 (d, $J = 8.0\text{ Hz}$, 2 H), 7.22 (d, $J = 8.0\text{ Hz}$, 2 H) ppm; LRMS (ESI+): $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 352.

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

2-{2-[3-(Trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]phenyl}ethanamine (54)

General Procedure 3 に従って、**52** (458 mg, 1.4 mmol) を用いて脱保護を行い、**54** の一塩酸塩 **54'** (370 mg, quant.)を得た。

White powder. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.72$ (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H), 7.52–7.56 (m, 1 H), 7.42–7.46 (m, 2 H), 3.30–3.37 (m, 2 H), 3.16–3.20 (m, 2 H), (t, $J = 6.8$ Hz, 2 H) ppm; LRMS (ESI+): $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 252.

本化合物は新規化合物である。

4-{2-[3-(Trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]phenyl}ethanamine (55)⁶⁹.

General Procedure 3 に従って、**53** (89.5 mg, 0.27 mmol) を用いて脱保護を行い、**54** の一塩酸塩 **55'** (71 mg, 93%)を得た。

White powder. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) $\delta = 7.25$ (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.13 (d, $J = 10.0$ Hz, 2H), 2.97 (t, $J = 8.5$ Hz, 2H), 2.76 (t, $J = 8.5$ Hz, 2H); LRMS (ESI+): $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 252.

本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

4-(2-Bromophenyl)ethylbiguanide (56).

General Procedure 1 に従って、2-(2-Bromo-phenyl)ethylamine (41, 2.00 g, 10.0 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH_3CN (10 mL) の条件で反応を行い、**56** (961 mg, 27%) を得た。

White powder. LRMS (ESI+): $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 284.

本化合物は新規化合物である。

Boc protected 7a (57).

2-(2-Bromophenyl)ethylbiguanide dihydrochloride **7a** (179 mg, 0.5 mmol)を DMF (2 mL)に溶解し、 Et_3N (1.39 mL, 5.0 mmol) および DMAP (18.3 mg, 150 μmol)を加えた後に、DMF (1 mL)に溶解した(Boc)₂O (1.09 g, 5.0 mmol)をゆっくり加え、室温で 7 h 攪拌した。反応溶液を水で希釈し、EtOAc で 3 回抽出し、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-hexane/EtOAc = 5 : 1)にて精製し、colorless amorphous (100 mg, 170 μmol)を得た。Colorless amorphous (100 mg, 170 μmol)を THF (1 mL)に溶解し、 Et_3N (1.39 mL, 5.0 mmol) および DMAP (6.2 mg, 51 μmol)を加えた後に、THF (0.5 mL)に溶解した(Boc)₂O (1.09 g, 5.0 mmol)をゆっくり加え、室温で 7 h 攪拌した。反応溶液を水で希釈し、EtOAc で 3 回抽出し、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-hexane/EtOAc = 5 : 1)にて精製し、**57** (70 mg, 26%)を得た。

Colorless amorphous. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz CDCl_3): $\delta = 1.46$ –1.60 (m, 54H), 3.15 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 4.08 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.04–7.09 (m, 1H), 7.20–7.22 (m, 1H), 7.44 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H),

7.52 (dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H); HRMS (ESI+): m/z calcd for $C_{40}H_{63}BrN_5O_{12}^+$ $[M+H]^+$: 884.36566, found 884.36282.

本化合物は新規化合物である。

Boc protected 56 (58).

2-(2-Bromophenyl)ethylbiguanide dihydrochloride **56** (961 mg, 2.7 mmol)を DMF (6 mL)に溶解し、 Et_3N (7.5 mL, 27.0 mmol) および DMAP (99 mg, 810 μ mol)を加えた後に、DMF (3 mL)に溶解した(Boc)₂O (5.89 g, 27.0 mmol)をゆっくり加え、室温で 7 h 攪拌した。反応溶液を水で希釈し、EtOAc で 3 回抽出し、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-hexane/EtOAc = 5 : 1) にて精製し、colorless amorphous (948 mg, 1.6 mmol)を得た。Colorless amorphous (948 mg, 1.6 mmol)を THF (5 mL)に溶解し、 Et_3N (473 μ L, 1.7 mmol) および DMAP (59 mg, 490 μ mol)を加えた後に、THF (5 mL)に溶解した(Boc)₂O (3.53 g, 16.2 mmol)をゆっくり加え、室温で 24 h 攪拌した。反応溶液を水で希釈し、EtOAc で 3 回抽出し、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-hexane/EtOAc = 5 : 1) にて精製し、**58** (955 mg, 40%)を得た。

Colorless amorphous. ¹H NMR (500 MHz CDCl₃): $\delta = 1.44\text{--}1.51$ (m, 54H), 2.93 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 3.98 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.15–7.18 (m, 2H), 7.38–7.41 (m, 2H); LRMS (ESI+): m/z $[M+H]^+$: 884.

本化合物は新規化合物である。

Boc protected 76 (62).

4-[2,2,2-Trifluoro-1-(hydroxyimino)ethyl]phenethylbiguanide **76** (145 mg, 458 μ mol)を THF (1 mL)に懸濁し、 Et_3N (638 μ L, 4.6 mmol) および DMAP (98.9 mg, 810 μ mol)を加えた後に、THF (1 mL)に溶解した(Boc)₂O (1.00 g, 4.6 mmol)をゆっくり加え、室温で 24 h 攪拌した。反応溶液を水で希釈し、EtOAc で 3 回抽出し、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-hexane/EtOAc = 5 : 1) にて精製し、**62** (233 mg, 54%)を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.30\text{--}1.55$ (m, 54H), 3.05 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.07 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.28–7.50 (m, 4H); ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃): $\delta = -69.34, -69.30$; LRMS(ESI+): m/z $[M+H]^+$: 917.

本化合物は新規化合物である。

2-(2,2,2-Trifluoroacetyl)phenethylamine (69).

General Procedure 3 に従って、**44** (486 mg, 1.5 mmol)を用いて脱保護を行い、**69** の一塩酸塩 **69'** (240 mg, 95%)を得た。

White powder.

¹H NMR (400 MHz CD₃OD): δ = 2.82 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.81–3.90 (m, 2H), 7.32–7.43 (m, 2H), 7.51 (td, *J* = 1.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.59 (m, 1H), 7.38–7.41 (m, 2H); LRMS (ESI+): *m/z* [M+H]⁺: 202.

本化合物は新規化合物である。

4-(2,2,2-Trifluoroacetyl)phenethylamine (70).

General Procedure 3 に従って、**45** (1.24 g, 3.9 mmol)を用いて脱保護を行い、**70** の一塩酸塩 **70'** (852 mg, 86%)を得た。

White powder. ¹H NMR (500 MHz CD₃OD): δ = 2.49 (s, 3H), 3.04 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 3.24 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.42 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.49 (dd, *J* = 5.0 Hz, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.85 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.17–7.57 (m, 4H); LRMS (ESI+): *m/z* [M+H]⁺: 202.

本化合物は新規化合物である。

2-[2,2,2-Trifluoro-1-(hydroxyimino)ethyl]phenethylamine (73).

General Procedure 3 に従って、**46** (130 mg, 0.39 mmol)を用いて脱保護を行い、**73** の一塩酸塩 **73'** (103 mg, 98%)を得た。

White powder. ¹H NMR (500 MHz CD₃OD): δ = 2.81–2.99 (m, 2H), 3.01–3.24 (m, 2H), 7.17–7.57 (m, 4H); ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃): δ = –68.6, –64.8; LRMS (ESI+): *m/z* [M+H]⁺: 233.0902.

本化合物は新規化合物である。

4-[2,2,2-Trifluoro-1-(hydroxyimino)ethyl]phenethylamine (74).

General Procedure 3 に従って、**47** (150 mg, 0.45 mmol)を用いて脱保護を行い、**74** の一塩酸塩 **74'** (97 mg, 79%)を得た。

White powder. ¹H NMR (500 MHz CD₃OD): δ = 2.80 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.01 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.22 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 3.24–3.39 (m, 1H), 7.31 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 7.37–7.43 (m, 2H), 7.48 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H); ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃): δ = –67.6, –67.5; LRMS (ESI+): *m/z* [M+H]⁺: 233.

本化合物は新規化合物である。

4-[2,2,2-Trifluoro-1-(hydroxyimino)ethyl]phenethylbiguanide (76).

General Procedure 1 に従って、4-[2,2,2-Trifluoro-1-(hydroxyimino)ethyl]phenethylamine **74**

(138 mg, 594 μmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH_3CN (1 mL) の条件で反応を行い、溶媒を減圧留去した。得られた混合物は NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10 : 1$) にて精製し、**76** (146 mg, 78%) を得た。

colorless amorphous. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.42$ (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.51 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.90 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H); HRMS (ESI+): m/z calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 317.1332, found 317.1368.

本化合物は新規化合物である。

2-[2,2,2-Trifluoro-1-(tosyloxyimino)ethyl]phenethylamine (**77**).

General Procedure 3 に従って、**48** (754 mg, 1.6 mmol) を用いて脱保護を行い、**77** の一塩酸塩 **77'** (655 mg, quant.) を得た。

White powder. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz CDCl_3): $\delta = 2.41$ (s, 1.5H), 2.45 (s, 1.5H), 2.94–3.03 (m, 1H), 3.06–3.14 (m, 1H), 3.17–3.30 (m, 2H), 7.06 (d, $J = 7.5$ Hz, 0.5 H), 7.19 (d, $J = 7.0$ Hz, 0.5 H), 7.26–7.34 (m, 1H), 7.35–7.40 (m, 2H), 7.41–7.48 (m, 1H), 7.49–7.57 (m, 1H), 7.84 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.37 (br s, 1H), 8.46 (br s, 1H); $^{19}\text{F NMR}$ (470 MHz, CDCl_3): $\delta = -67.85$ -62.22

本化合物は新規化合物である。

4-[2,2,2-Trifluoro-1-(tosyloxyimino)ethyl]phenethylamine (**78**)

General Procedure 3 に従って、**49** (365 mg, 0.75 mmol) を用いて脱保護を行い、**78** の一塩酸塩 **78'** (290 mg, quant.) を得た。

White powder. HRMS (ESI+): calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S} [\text{M}+\text{H}]^+$ 387.0990; found 387.1027.

本化合物は新規化合物である。

R_m 値

60RP-8F₂₅₄S (Merck) の TLC プレートを用い、 $\text{MeOH}/20$ mM リン酸ナトリウムバッファ一水溶液 (pH 7.2) 混合溶液 (8 : 2) で展開し、検定化合物の R_f 値を求めた。三回測定して平均値を求め、次式により R_m 値を算出した: $R_m = \log(1/R_f - 1)$

生物学的評価

細胞培養

HEK293 細胞は 1% [v/v] NEAA、10% [v/v] FBS、50 units/mL ペニシリン、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン、および 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを含む EMEM を用いて 37 °C、5% CO_2 条件下で培養した。HT29 細胞、HCT116 細胞および HCT116p53^{-/-} は 10% [v/v] FBS、

50 units/mL ペニシリン、50 µg/mL ストレプトマイシン、および 50 µg/mL カナマイシンを含む RPMI1640 を用いて 37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。

検定化合物溶液の調整

in vitro アッセイに用いた検定化合物は 100 mM の DMSO 溶液として -20 °C に保存し、DMSO 最終濃度が細胞毒性試験は 1.0% [v/v]、それ以外は 0.25% [v/v] になるように調製しアッセイを行った。CAM アッセイに用いた検定化合物は用時調整とした。ルシフェラーゼアッセイに用いる 2-DG は 2 M の Sterilized Distilled Water (SDW) 溶液として -20 °C で保存した。

ストレス処理

低酸素処理はチャンバー内を低酸素ガス (94% N₂, 5% CO₂, 1% O₂) に置換することで低酸素の暴露を行った。化合物処理を行う場合は、化合物添加 1 h 後に低酸素処理を行うこととした。低栄養処理は 2-DG 含有通常培地、もしくはグルコース欠乏培地を用いることで行った。低酸素・低栄養同時処理は、2-DG 含有通常培地、もしくはグルコース欠乏培地で培養している細胞を、さらにチャンバーに入れて、中を低酸素ガス (94% N₂, 5% CO₂, 1% O₂) に置換することで低酸素の暴露を行った。

ルシフェラーゼアッセイ

ストレスや化合物処理を行って培養した後、PBS (500 µL) にて洗浄し Lysis buffer (100 µL) にて溶解、-80 °C にて凍結させ細胞を完全に破砕した。さらに遠心分離 (15,000 rpm、4 °C、1 min) した後、上清 (10 µL) を基質 (100 µL) と反応させその発光 (測定波長 570 nm) を測定した。また、上清のタンパク質量は牛血清アルブミンのスタンダードで 0.1-1.0 mg/mL の濃度における検量線を作成後、BCA アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) の調製した試薬を 200 µL 加え 37 °C で 30 分放置し、その後 570 nm の吸光度を測定し、作成した検量線より算出した。ルシフェラーゼ活性データは測定した RLU 値を上清のタンパク質濃度で除することで算出した。

低酸素応答ルシフェラーゼアッセイ

HEK293 p2.1 #3 細胞を 24 well plate に播種 (8.0×10⁴ cells/well) し、一晩培養後、調製した種々の検定化合物を含有した培地にて培地交換を行った。低酸素処理を行った後 24 h 培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

UPR 応答ルシフェラーゼアッセイ

HEK293 GRP78 #85 を 24 well plate に播種 (8.0×10⁴ cells/well) し、一晩培養後、調製した種々の検定化合物を含有した 2-DG 含有 (0.3 mM) 培地にて培地交換を行った後、24 h

培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

MTT アッセイ

ストレスや化合物処理を行って培養した後、MTT 試薬を添加し、さらに 4 h 培養した。培地を全て取り除き、DMSO にて生成したホルマザン産物を完全に溶解した後、MULTISKAN JX plate reader にて 570 nm の吸光度を測定した。

グルコース欠乏条件における細胞毒性試験

HT29 細胞を 96 well plate に播種 (3.0×10^3 cells/well) し、一晩培養後、通常培地もしくはグルコース欠乏培地にて培地交換を行った。調製した種々の検定化合物を添加後 48 h 培養した後、通常培地に交換し、16 h 培養後 MTT アッセイを行った。

Western Blot (HIF-1 α)

HT29 細胞を 10 cm dish に播種 (6.0×10^6 cells) し、一晩培養後、調製した種々の検定化合物入り培地にて培地交換を行った。低酸素処理を行い 4 h 培養した後、氷冷した PBS にて細胞を 2 回洗浄し、10 mL の PBS を加え、セルスクレーパーを用いて細胞をハーベストした。遠心分離 (1,000 rpm、4 °C、5 min) した後、上清を取り除き RIPA buffer [50 mM Tris-HCl, pH 8; 150 mM sodium chloride; 0.1% [v/v] SDS; 1% [v/v] Tergitol solution; 5 mM EDTA; 0.5% [w/v] sodium deoxycholate; 0.1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 mM Sodium orthovanadate; 10 mM sodium fluoride; one-half of tablet Complete[®]] にて細胞を完全に溶解した。遠心分離 (100,000 rpm、4 °C、20 min) 後、得られた細胞抽出液を BCA アッセイにてタンパク定量し、120 μ g となるよう 50% [v/v] glycerol、8% [w/v] SDS、1% [w/v] BPB、5% [v/v] 2-mercaptethanol を含む 0.25 M Tris-HCl buffer (pH 6.8) で調製し、5 min 煮沸した後、7% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離、ニトロセルロース膜にブロッティングした。ニトロセルロース膜を 0.1% Ponceau-S で染色、70 kD 付近でカットし、5% skim milk を含む TBST (0.1% Tween 20 を含む 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5) で 1 h から終夜 (4 °C) ブロッキングした後、mouse anti-human antibody against HIF-1 α (1000 倍希釈) および goat anti-human antibody β -actin (3000 倍希釈) を用いて 1 h から終夜 (4 °C) 反応させた。その後、TBST にて 3 回洗浄し、ニトロセルロース膜を Anti-mouse IgG Peroxidase conjugate secondary antibody (1000 倍希釈) および Anti-goat IgG Peroxidase conjugate secondary antibody (3000 倍希釈) を用いて室温で 1 h 処理した。処理後、TBST で 2 回 TBS にて 1 回洗浄し HIF-1 α は Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate、 β -actin は Pierce Western Blotting Substrate を用いてそれぞれ検出した。画像解析は LAS 3000 mini imager and Multi Gauge software Science Lab version 2005 version 3.0 にて行った。

Western Blot (GRP78)

HT29 細胞を 10 cm dish に播種 (6.0×10^6 cells) し、一晩培養後、調製した種々の検定化合物入り通常培地もしくはグルコース欠乏培地にて培地交換を行い、低栄養処理 24 h 行った。タンパク質抽出およびタンパク質定量は第三章第二節と同様の方法で行った。タンパク質定量を行い 20 μ g となるよう 50% [v/v] glycerol、8% [w/v] SDS、1% [w/v] BPB、5% [v/v] 2-mercaptethanol を含む 0.25 M Tris-HCl buffer (pH 6.8) で調製し 5 min 煮沸した後、7% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、PVDF 膜にブロッティングした。PVDF 膜を 0.1% Ponceau-S で染色し、転写を確認した後、60 kD 付近でカットし、1% BSA を含む TBST (0.1% Tween 20 を含む 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5) で 1 h から終夜 (4°C) ブロッキングした後、KDEL monoclonal antibody (1000 倍希釈) および goat anti-human antibody β -actin (3000 倍希釈) を用いて室温にて 90 min 反応させた。その後、TBST にて 3 回洗浄し、PVDF 膜を Anti-mouse IgG Peroxidase conjugate secondary antibody (1000 倍希釈) および Anti-goat IgG Peroxidase conjugate secondary antibody (3000 倍希釈) を用いて室温で 1 h 処理した。処理後、TBST で 2 回、TBS にて 1 回洗浄し Pierce Western Blotting Substrate を用いてそれぞれ検出した。画像解析は LAS 3000 mini imager and Multi Gauge software Science Lab version 2005 version 3.0 にて行った。

CAM アッセイ

学術用有精卵 (後藤孵卵場、モミジ ; 0 日) を、37.5°C の転卵機にて 1 h 毎に転卵しながら、3 日間インキュベートした。3 日目に、卵の鋭端を下にして鈍端の先端部分に錐で穴を開けた。次いで、卵を斜めに寝かせた状態で卵の赤道よりやや鋭端側にも錐で穴を開け、シリンジを用いて卵の側面の穴から卵白を約 3 mL 吸い取った。卵の鈍端の頂点付近の穴を、2 mL ニップルで塞ぎ、卵殻膜が剥がれる程度に吸引した。卵の側面の穴を *opposite film* で塞いで鈍端の穴周辺の殻を取り除き、直径 1 cm 程度の穴を開けた。続けて、卵殻膜を取り除き、キャップを被せて 39.5°C のインキュベーターにて 24 h インキュベートした。4 日目に、CAM の中央にシリコンリング (内径 3 mm、外径 5 mm、厚さ 1 mm) をのせた。検定化合物を DMSO 最終濃度が 2% になるよう生理食塩水溶液で調製した。次に、生理食塩水にて調製した 2%メチルセルロース溶液を先ほど調製した検定化合物溶液に投与直前等量、氷冷しながら加え混和した後、リング内に 10 μ L 添加した。その後、再び 39.5°C のインキュベーターにて 48 h インキュベートした。6 日目に、上部の卵の殻および卵殻膜を取り除き、シリンジを用いてイントラリポス約 1 mL を CAM に適量注入し、新生血管を明瞭に見えるようにした。目視で血管新生阻害効果を判定し、写真を撮映した。判定は、**Table 3** に示す判定基準を用いて行った。また、コントロールおよび検定化合物のポイントの平均値を算出し、以下に示す式を用いて血管新生阻害率を求めた。

血管新生阻害率 (%) = [1 - (control point / drug point)] × 100

Table 3. CAM アッセイにおける血管新生阻害作用の判断基準

Evaluation	Criteria	Point
-	血管新生阻害効果が認められない	0
±	若干の血管新生阻害効果が認められる	1
+	リングの周囲3 mm程度に血管新生阻害効果が認められる	2
++	CAM全体の1/3程度に血管新生阻害効果が認められる	3
+++	CAM全体の1/2程度に血管新生阻害効果が認められる	4

細胞代謝アッセイ

生細胞の OCR および ECAR を Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) を使用して測定した。細胞のミトコンドリア機能および解糖速度は、Agilent のプロトコルに従って、それぞれ XF 細胞ミトストレステストおよび XF 糖化ストレステストキット (Agilent) を使用して分析した。HT29、A549 または U87MG 細胞 (2.5×10^4 細胞/wells) を XFp 細胞培養マイクロプレートに播種し、24 h インキュベーターで水和した。XFp 分析装置のセンサーカートリッジは、実験の前日に 37 °C の非 CO₂ インキュベーターで水和した。ミトコンドリア機能を調べるために、センサーカートリッジの注入ポート A に 1.5 μM oligomycin (複合体 V の阻害剤) を装填し、ポート B に 2 μM carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) を装填し、ポート C に 0.5 μM rotenone/antimycin A (複合体 I および複合体 III の阻害剤) を装填した。装置のセンサーの較正中に、細胞を 5–50 μM の試験化合物で処理し、180 μL の測定培地 (10 mM glucose、1 mM pyruvate、および 2 mM L-glutamine、pH7.4 の XF base medium) とともに、37 °C の非 CO₂ インキュベーター中で 1 時間インキュベートし、プレートを直ちに較正後の XFp 細胞外フラックス分析装置に入れた。XF 細胞ミトストレステストと同じ条件で、3 つの OCR 値を 5 分ごとに測定した。グリコリシステストのために、センサーカートリッジ上の注入ポート A に 10 mM glucose を装填し、ポート B に 1 μM Oligomycin を装填し、ポート C には 50 mM 2-deoxy-D-glucose を装填した。センサー較正中に、細胞を試験化合物の 5–50 μM で処理し、180 μL の測定培地 (2 mM L-glutamine、pH7.4 を有する XF base medium) と一緒に 37 °C の非 CO₂ インキュベーターで 1 時間インキュベートし、プレートを直ちに較正後の XFp 細胞外フラックスアナライザーに入れた。XF 細胞ミトストレステスト™ と同じ条件で、3 つの ECAR 値を 5 分ごとに測定した。

細胞死解析

アポトーシスおよび細胞死は、Annexin V-FITC 検出キットを用いて、その取扱説明書に従って解析した。HT29 細胞を 5×10^5 細胞/100 mm ディッシュに播種した。通常また

はグルコース欠乏培地中で 10 または 5 μM の濃度で 2、3 または 71 に 48 時間曝露した後、細胞を氷冷した PBS で 2 回洗浄し、AnnexineV-FITC および propidium iodide を添加した後、 5×10^5 cells/mL の濃度で 1×結合緩衝液に懸濁させた。暗闇の中で室温で 5 分間インキュベーションに続いて、1×binding buffer (500 μL) を各チューブに添加した。細胞を、BD FACSVerser フローサイトメーターおよび BD FACSuite ソフトウェア (BD Bioscience) を用いて分析し、異なる象限の細胞集団の画分について象限統計学を用いて分析した。

統計学的解析

OCR および ECAR 測定の結果については、3 つの化合物で処理したサンプルの 3 群間の統計的差異を、各図に示すように Student の t 検定で評価した (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.005$ 、*** $p < 0.0005$)。レポーターアッセイおよび細胞生存率アッセイの用量反応結果は、3 つの独立した実験の平均 \pm SD として示した。

Abbreviation list

$^1\text{H-NMR}$: ^1H nuclear magnetic resonance

$^{13}\text{C-NMR}$: ^{13}C nuclear magnetic resonance

2-DG: 2-deoxy-*D*-glucose

Ac: acetyl

AMPK: adenosine monophosphate-activated protein kinase

APS: ammonium persulfate

ARD1: arrest-defective protein 1

BCA: bicinchoninic acid

Boc: *t*-butoxycarbonyl

BPB: bromophenol blue

BSA: bovine serum albumin

Bz: benzoyl

CAM: chick chorioallantoic membrane

CF_3COOEt : ethyl trifluoroacetate

DART: direct analysis real time

DMAP: *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine

DMF: dimethylformamide

DMSO: dimethyl sulfoxide

DTT: dithiothreitol

ECAR: extracellular acidification rate

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
EI: electron impact
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
EMEM: Eagle's minimal essential medium
ER: endoplasmic reticulum
ERSE: endoplasmic reticulum stress responsive element
ESI: electrospray ionization
FAB: fast atom bombardment
FITC: fluorescein isothiocyanate
GRP78: 78 kD glucose-related protein
HEK: human embryonic kidney
HIF-1: hypoxia inducible factor 1
HR: high resolution
HRE: hypoxia-response element
HT: human colon tumor
IR: infrared
Mp: melting point
NaN₃: sodium azide
NEAA: non-essential amino acid
NEt₃: triethylamine
NH₂OH·HCl: Hydroxylamine Hydrochloride
OCR: oxygen consumption rate
PBS: phosphate buffered saline
Pd/C: palladium on carbon
Ph: phenyl
PHD: prolyl hydroxylase
PI: propidium iodide
RIPA: radio-immunoprecipitation assay
PMSF: phenylmethylsulfonylfluoride
PPh₃: triphenylphosphine
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
rt: room temperature
SDS: sodium dodecyl sulfate
MS: mass spectrum
RLU: relative light unit
TBS: tris buffered saline

TEMED: *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine

TfOH: trifluoromethanesulfonic acid

THF: tetrahydrofuran

TMSCl: trimethylsilyl chloride

TsCl: *p*-toluenesulfonyl chloride

UPR: unfolded protein response

UV: ultraviolet

VEGF: vascular endothelial growth factor

VHL: von Hippel-Lindau

引用文献

- 1 Ngoi, N. Y. L. *et al.* Targeting cell metabolism as cancer therapy. *Antioxid. Redox. Signal.* **32**, 285-308, doi:10.1089/ars.2019.7947 (2020).
- 2 Luengo, A., Gui, D. Y. & Vander Heiden, M. G. Targeting metabolism for cancer therapy. *Cell Chem. Biol.* **24**, 1161-1180, doi:10.1016/j.chembiol.2017.08.028 (2017).
- 3 Hsu, P. P. & Sabatini, D. M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell.* **134**, 703-707, doi:10.1016/j.cell.2008.08.021 (2008).
- 4 Weinberg, S. E. & Chandel, N. S. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 9-15, doi:10.1038/nchembio.1712 (2015).
- 5 Porporato, P. E., Filigheddu, N., Pedro, J. M. B., Kroemer, G. & Galluzzi, L. Mitochondrial metabolism and cancer. *Cell Res.* **28**, 265-280, doi:10.1038/cr.2017.155 (2018).
- 6 Liu, Y. e. & Shi, Y. Mitochondria as a target in cancer treatment. *MedComm.* **1**, 129-139, <https://doi.org/10.1002/mco2.16> (2020).
- 7 Xu, Y., Xue, D., Bankhead, A., 3rd & Neamati, N. Why all the fuss about oxidative phosphorylation (OXPHOS)? *J. Med. Chem.* **63**, 14276-14307, doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01013 (2020).
- 8 Pathania, D., Millard, M. & Neamati, N. Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **61**, 1250-1275, doi:10.1016/j.addr.2009.05.010 (2009).
- 9 Roth, K. G., Mambetsariev, I., Kulkarni, P. & Salgia, R. The mitochondrion as an emerging therapeutic target in cancer. *Trends Mol. Med.* **26**, 119-134, doi:10.1016/j.molmed.2019.06.009 (2020).
- 10 Molina, J. R. *et al.* An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nat. Med.* **24**, 1036-1046, doi:10.1038/s41591-018-0052-4 (2018).
- 11 Nayak, A. P., Kapur, A., Barroilhet, L. & Patankar, M. S. Oxidative phosphorylation: a target for novel therapeutic strategies against ovarian cancer. *Cancers. (Basel)* **10**, <https://doi.org/10.3390/cancers10090337> (2018).
- 12 Ashton, T. M., McKenna, W. G., Kunz-Schughart, L. A. & Higgins, G. S. Oxidative phosphorylation as an emerging target in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **24**, 2482-2490, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3070 (2018).
- 13 Dong, L. & Neuzil, J. Targeting mitochondria as an anticancer strategy. *Cancer Commun.* **39**, 63 (2019).
- 14 Vasan, K., Werner, M. & Chandel, N. S. Mitochondrial metabolism as a target for cancer therapy. *Cell Metab.* **32**, 341-352 (2020).

- 15 Pecinova, A. *et al.* Pleiotropic effects of biguanides on mitochondrial reactive oxygen species production. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 7038603, <https://doi.org/10.1155/2017/7038603> (2017).
- 16 Pistoni, M. *et al.* Exploring metabolic reprogramming in melanoma via acquired resistance to the oxidative phosphorylation inhibitor phenformin. *Melanoma Res.* **30**, 1-13 (2020).
- 17 Orecchioni, S. *et al.* The biguanides metformin and phenformin inhibit angiogenesis, local and metastatic growth of breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells. *Int. J. Cancer.* **136**, E534-E544 (2015).
- 18 García Rubiño, M. *et al.* Phenformin as an anticancer agent: challenges and prospects. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3316 (2019).
- 19 Saraei, P., Asadi, I., Kakar, M. A. & Moradi-Kor, N. The beneficial effects of metformin on cancer prevention and therapy: a comprehensive review of recent advances. *Cancer Manag. Res.* **11**, 3295 (2019).
- 20 Saito, S. *et al.* Chemical genomics identifies the unfolded protein response as a target for selective cancer cell killing during glucose deprivation. *Cancer Res.* **69**, 4225-4234, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2689> (2009).
- 21 Saito, S. *et al.* Compound C prevents the unfolded protein response during glucose deprivation through a mechanism independent of AMPK and BMP signaling. *PLoS One.* **7**, e45845, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045845> (2012).
- 22 Narise, K., Okuda, K., Enomoto, Y., Hirayama, T. & Nagasawa, H. Optimization of biguanide derivatives as selective antitumor agents blocking adaptive stress responses in the tumor microenvironment. *Drug Des. Devel. Ther.* **8**, 701-717, <https://doi.org/10.2147/DDDT.S59679> (2014).
- 23 Oh-Hashi, K. *et al.* Elucidation of a novel phenformin derivative on glucose-deprived stress responses in HT-29 cells. *Mol. Cell. Biochem.* **419**, 29-40 (2016).
- 24 Oh-Hashi, K. *et al.* Elucidating the rapid action of 2-(2-chlorophenyl)ethylbiguanide on HT-29 cells under a serum- and glucose-deprived condition. *Cell Biol. Toxicol.* **34**, 279-290 (2018).
- 25 Oh-Hashi, K. *et al.* Effects of 2-(2-Chlorophenyl)ethylbiguanide on ERAD component expression in HT-29 cells under a serum- and glucose-deprived condition. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **188**, 1009-1021 (2019).
- 26 Chipurupalli, S., Kannan, E., Tergaonkar, V., D'Andrea, R. & Robinson, N. Hypoxia induced ER stress response as an adaptive mechanism in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, <https://doi.org/10.3390/ijms20030749> (2019).
- 27 Rajeshkumar, N. V. *et al.* Treatment of pancreatic cancer patient-derived xenograft

- panel with metabolic inhibitors reveals efficacy of phenformin. *Clin. Cancer Res.* **23**, 5639-5647, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1115> (2017).
- 28 Bridges, H. R., Sirvio, V. A., Agip, A. N. & Hirst, J. Molecular features of biguanides required for targeting of mitochondrial respiratory complex I and activation of AMP-kinase. *BMC Biol.* **14**, 65, <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0287-9> (2016).
- 29 Matsuo, J. *et al.* Hyperactivation of 4E-binding protein 1 as a mediator of biguanide-induced cytotoxicity during glucose deprivation. *Mol. Cancer Ther.* **11**, 1082-1091 (2012).
- 30 Mayer, S., Daigle, D. M., Brown, E. D., Khatri, J. & Organ, M. G. An expedient and facile one-step synthesis of a biguanide library by microwave irradiation coupled with simple product filtration. Inhibitors of dihydrofolate reductase. *J. Comb. Chem.* **6**, 776-782 (2004).
- 31 Butini, S. *et al.* Exploiting Protein Fluctuations at the Active-Site Gorge of Human Cholinesterases: Further optimization of the design strategy to develop extremely potent inhibitors. *J. Med. Chem.* **51**, 3154-3170 (2008).
- 32 Landge, K. P., Jang, K. S., Lee, S. Y. & Chi, D. Y. Approach to the synthesis of indoline derivatives from diaryliodonium salts. *J. Org. Chem.* **77**, 5705-5713 (2012).
- 33 Wyffels, L., De Bruyne, S., Blanckaert, P., Lambert, D. M. & De Vos, F. Radiosynthesis, in vitro and in vivo evaluation of ¹²³I-labeled anandamide analogues for mapping brain FAAH. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 49-56 (2009).
- 34 Moussa, I. A. *et al.* Design, synthesis, and structure-affinity relationships of regioisomeric N-benzyl alkyl ether piperazine derivatives as sigma-1 receptor ligands. *J. Med. Chem.* **53**, 6228-6239 (2010).
- 35 Barker, C. A. *et al.* Degradation of MAC13243 and studies of the interaction of resulting thiourea compounds with the lipoprotein targeting chaperone Lola. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 2426-2431 (2013).
- 36 Leach, C. A. & Smith, S. A. Preparation of pyridinone and pyrimidinone compounds as Lp-PLA2 inhibitors for treating atherosclerosis. WO2003042206A1 (2003).
- 37 Kan, T. & Fukuyama, T. Ns strategies: a highly versatile synthetic method for amines. *Chem. Commun. (Camb.)*, 353-359 (2004).
- 38 Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* **148**, 399-408, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021> (2012).
- 39 Park, H. R. *et al.* Effect on tumor cells of blocking survival response to glucose deprivation. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 1300-1310, <https://doi.org/10.1093/jnci/djh243> (2004).
- 40 Charton, M. Steric effects. I. Esterification and acid-catalyzed hydrolysis of esters. *J.*

- Am. Chem. Soc.* **97**, 1552-1556 (1975).
- 41 Tada, Y. *et al.* Optimal lipophilicity of sulfonium *p*-toluenesulfonate as anti-allergic drug. *Chem-Bio Informatics Journal*. **12**, 25-38 (2012).
- 42 Biagi, G. L., Barbaro, A. M., Gandolfi, O., Guerra, M. C. & Cantelli-Forti, G. Rm values of steroids as an expression of their lipophilic character in structure-activity studies. *J. Med. Chem.* **18**, 873-883 (1975).
- 43 Wagner, D. J., Hu, T. & Wang, J. Polyspecific organic cation transporters and their impact on drug intracellular levels and pharmacodynamics. *Pharmacol. Res.* **111**, 237-246 (2016).
- 44 Sogame, Y., Kitamura, A., Yabuki, M. & Komuro, S. A comparison of uptake of metformin and phenformin mediated by hOCT1 in human hepatocytes. *Biopharm. Drug Dispos.* **30**, 476-484 (2009).
- 45 Potter, M., Newport, E. & Morten, K. J. The Warburg effect: 80 years on. *Biochem. Soc. Trans.* **44**, 1499-1505, <https://doi.org/10.1042/BST20160094> (2016).
- 46 Wu, H., Ying, M. & Hu, X. Lactic acidosis switches cancer cells from aerobic glycolysis back to dominant oxidative phosphorylation. *Oncotarget*. **7**, 40621-40629, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9746> (2016).
- 47 Strickland, M. & Stoll, E. A. Metabolic reprogramming in glioma. *Front Cell Dev Biol* **5**, 43, <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00043> (2017).
- 48 Maxwell, P. H. *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. **399**, 271-275 (1999).
- 49 Cybulsky, A. V. The intersecting roles of endoplasmic reticulum stress, ubiquitin-proteasome system, and autophagy in the pathogenesis of proteinuric kidney disease. *Kidney Int.* **84**, 25-33, <https://doi.org/10.1038/ki.2012.390> (2013).
- 50 Ferrara, N., Hillan, K. J. & Novotny, W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**, 328-335 (2005).
- 51 Folkman, J. Angiogenesis in psoriasis: therapeutic implications. *J. Invest. Dermatol.* **59**, 40-43 (1972).
- 52 Folkman, J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann. Surg.* **175**, 409-416 (1972).
- 53 Caporarello, N. *et al.* Classical VEGF, Notch and Ang signalling in cancer angiogenesis, alternative approaches and future directions (Review). *Mol. Med. Rep.* **16**, 4393-4402, <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7179> (2017).
- 54 Itatani, Y., Kawada, K., Yamamoto, T. & Sakai, Y. Resistance to anti-angiogenic therapy in cancer-alterations to anti-VEGF pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **19**,

- <https://doi.org/10.3390/ijms19041232> (2018).
- 55 Soraya, H. *et al.* Anti-angiogenic Effects of metformin, an AMPK activator, on human umbilical vein endothelial cells and on granulation tissue in Rat. *Iranian journal of basic medical sciences.* **15**, 1202-1209 (2012).
- 56 Dong, D. *et al.* A critical role for GRP78/BiP in the tumor microenvironment for neovascularization during tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* **71**, 2848-2857, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3151> (2011).
- 57 Dong, D. *et al.* Critical role of the stress chaperone GRP78/BiP in tumor proliferation, survival, and tumor angiogenesis in transgene-induced mammary tumor development. *Cancer Res.* **68**, 498-505 (2008).
- 58 Shing, Y. *et al.* Angiogenesis is stimulated by a tumor-derived endothelial cell growth factor. *J. Cell. Biochem.* **29**, 275-287 (1985).
- 59 Kasai, S., Nagasawa, H., Shimamura, M., Uto, Y. & Hori, H. Design and synthesis of antiangiogenic/heparin-binding arginine dendrimer mimicking the surface of endostatin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 951-954 (2002).
- 60 Ribatti, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reprod. Toxicol.* **70**, 97-101 (2017).
- 61 Birsoy, K. *et al.* Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature.* **508**, 108-112 (2014).
- 62 Rose, S. *et al.* Oxidative stress induces mitochondrial dysfunction in a subset of autism lymphoblastoid cell lines in a well-matched case control cohort. *PLoS One.* **9**, e85436, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085436> (2014).
- 63 Nicholas, D. *et al.* Advances in the quantification of mitochondrial function in primary human immune cells through extracellular flux analysis. *PLoS One.* **12**, e0170975, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170975> (2017).
- 64 Suhara, T. *et al.* Inhibition of the oxygen sensor PHD2 in the liver improves survival in lactic acidosis by activating the Cori cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 11642-11647, <https://doi.org/10.1073/pnas.1515872112> (2015).
- 65 Nicholas, D. *et al.* Advances in the quantification of mitochondrial function in primary human immune cells through extracellular flux analysis. *PLoS One* **12**, e0170975, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170975> (2017).
- 66 Bardaweel, S. K., Alsalamat, H. A., Aleidi, S. M. & Bashatwah, R. M. Glucose Deprivation enhances the antiproliferative effects of oral hypoglycemic biguanides in different molecular subtypes of breast cancer: an in Vitro Study. *Acta. Pharm.* **68**, 517-524, <https://doi.org/10.2478/acph-2018-0031> (2018).
- 67 Ben Sahra, I. *et al.* Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and

- 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res.* **70**, 2465-2475, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2782> (2010).
- 68 Vilaivan, T. *et al.* Synthesis of solution-phase combinatorial library of 4,6-diamino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine and identification of new leads against A16V+S108T mutant dihydrofolate reductase of *Plasmodium falciparum*. *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 217-224 (2003).
- 69 Ma, X., Poon, T. Y., Wong, P. T. & Chui, W. K. Synthesis and in vitro evaluation of 2,4-diamino-1,3,5-triazine derivatives as neuronal voltage-gated sodium channel blockers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 5644-5647 (2009).
- 70 Yuta Murai, K. M., Yui Ogasawara, Lei Wang, Yasuyuki Hashidoko, & Yasumaru Hatanaka, S. I., Takuya Kobayashi, and Makoto Hashimoto. Synthesis of Photoreactive 2-Phenethylamine derivatives – synthesis of adenosine derivatives enabling functional analysis of adenosine receptors by photoaffinity labeling. *Eur. J. Org. Chem.*, 2428 (2013).
- 71 Sato, S., Murata, A., Shirakawa, T. & Uesugi, M. Biochemical target isolation for novices: affinity-based strategies. *Chem. Biol.* **17**, 616-623, [doi:10.1016/j.chembiol.2010.05.015](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.05.015) (2010).
- 72 Khan, H. *et al.* Metabolic rewiring in response to biguanides is mediated by mROS/HIF-1 α in malignant lymphocytes. *Cell Rep.* **29**, 3009-3018 e3004, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.007> (2019).
- 73 Pollak, M. Potential applications for biguanides in oncology. *J. Clin. Invest.* **123**, 3693-3700, <https://doi.org/10.1172/JCI67232> (2013).
- 74 Zhang, X., Shetty, M., Clemente, V., Linder, S. & Bazzaro, M. Targeting mitochondrial metabolism in clear cell carcinoma of the ovaries. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, [https://doi:10.3390/ijms22094750](https://doi.org/10.3390/ijms22094750) (2021).
- 75 Fons, P. *et al.* Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood.* **108**, 2608-2615 (2006).
- 76 Shapiro, S. L., Parrino, V. A. & Freedman, L. Hypoglycemic agents. III. N1-Alkyl- and aralkylbiguanides. *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 3728-3736, [doi:10.1021/ja01523a060](https://doi.org/10.1021/ja01523a060) (1959).
- 77 Baker, B. R. & Ho, B.-T. Analogs of tetrahydrofolic acid. XXIII. 1-(ω -Phenylalkyl)-4,6-diamino-1,2-dihydro-s-triazines as inhibitors of dihydrofolic reductase. *J. Heterocycl. Chem.* **2**, 72-79 (1965).
- 78 Leftheris, K. *et al.* The discovery of orally active triaminotriazine aniline amides as inhibitors of p38 MAP kinase. *J. Med. Chem.* **47**, 6283-6291 (2004).
- 79 Liu, M.-C., Lin, T.-S., Penketh, P. & Sartorelli, A. C. Synthesis and antitumor activity of

- 4- and 5-substituted derivatives of isoquinoline-1-carboxaldehyde thiosemicarbazone. *J. Med. Chem.* **38**, 4234-4243 (1995).
- 80 Mark, G. 17 α -Hydroxylase/C17,20-lyase inhibitors. *WO2012035078A1*.
- 81 Wyffels, L. *et al.* Synthesis, in vitro and in vivo evaluation, and radiolabeling of aryl anandamide analogues as candidate radioligands for in vivo imaging of fatty acid amide hydrolase in the brain. *J. Med. Chem.* **52**, 4613-4622 (2009).
- 82 Subbarao, K. V., Damodaran, N. P. & Dev, S. Photochemical transformations — V a: Organic iodides (part 4) : solution photochemistry of 4-phenyl-1-iodobutane and 4-phenyl-1-bromobutane. *Tetrahedron.* **43**, 2543-2548 (1987).
- 83 Lai, G., Tan, P.-Z. & Ghoshal, P. A One-pot method for the efficient conversion of aryl- and acyl-substituted methyl alcohols into chlorides. *Synth. Commun.* **33**, 1727-1732, <https://doi.org/10.1081/scc-120018934> (2003).
- 84 Vechorkin, O., Proust, V. r. & Hu, X. Functional group tolerant kumada–corriu–tamao coupling of nonactivated alkyl halides with aryl and heteroaryl nucleophiles: catalysis by a nickel pincer complex permits the coupling of functionalized grignard reagents. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 9756-9766, (2009).
- 85 Butini, S. *et al.* Discovery of potent inhibitors of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *J. Med. Chem.* **55**, 6898-6915, (2012).
- 86 Bunnett, J. F. & Skorcz, J. A. Homocyclic ring closures via benzyne intermediates. A new synthesis of 1-substituted benzocyclobutenes. *J. Org. Chem.* **27**, 3836-3843, (1962).
- 87 Lamattina, J. L. 2-Amino-5-hydroxy-4-methylpyrimidine derivatives. EP138464A2 (1985).
- 88 Jarboe, S. G., Terrazas, M. S. & Beak, P. The endocyclic restriction test: the geometries of nucleophilic substitutions at sulfur(VI) and sulfur(II). *J. Org. Chem.* **73**, 9627-9632, (2008).

主論文の基礎となる公表論文

- 1) Takayuki Sakai, Yoshiyuki Matsuo, Kensuke Okuda, Kiichi Hirota, Mieko Tsuji, Tasuku Hirayama, Hideko Nagasawa, Development of antitumor biguanides targeting energy metabolism and stress responses in the tumor microenvironment. *Sci. Rep.* **11**, 4852, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83708-w> (2021).

参考論文

- 1) Kentaro Oh-hashii, Nao Irie, Takayuki Sakai, Kensuke Okuda, Hideko Nagasawa, Yoko Hirata, Kazutoshi Kiuchi, Elucidation of a novel phenformin derivative on glucose-deprived stress responses in HT-29 cells. *Mol. Cell. Biochem.* **419**, 29-40 (2016).
- 2) Kentaro Oh-hashii, Shiori Matsumoto, Takayuki Sakai, Yuki Nomura, Kensuke Okuda, Hideko Nagasawa, Yoko Hirata, Elucidating the rapid action of 2-(2-chlorophenyl)ethylbiguanide on HT-29 cells under a serum- and glucose-deprived condition. *Cell Biol. Toxicol.* **34**, 279-290 (2018).
- 3) Kentaro Oh-hashii, Shiori Matsumoto, Takayuki Sakai, Yoko Hirata, Kensuke Okuda, Hideko Nagasawa, Effects of 2-(2-Chlorophenyl)ethylbiguanide on ERAD component expression in HT-29 cells under a serum- and glucose-deprived condition. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **188**, 1009-1021 (2019).