

-総説-

インターフェロン誘導活性を有する アデニン誘導体の合成と構造活性相関に関する研究

風岡和憲、佐治木弘尚、廣田耕作

要約: 最近、著者らの研究室で 9-ベンジル-8-ヒドロキシアデニンに比較的高いインターフェロン (IFN) 誘導活性を見いだした。本研究では、8-ヒドロキシアデニン誘導体の効率のよい新規合成法の開発と構造活性相関を検討した。まず、アミノマロンニトリルとイソシアネート類から鍵中間体となる 2-ヒドロキシイミダゾール (3) を得、これにイミデート、グアニジン、尿素を反応させて対応する 2-置換アデニン誘導体 (55-59, 60, 79) を合成した。さらにここで得られた 2-OH 体 (60) および 2-NH₂ 体 (79) を選択的にアルキル化し、対応するアルキル体 (61-65, 81-86) を合成した。また、2-アルキルチオアデニン誘導体 (90-96) の合成は 3 とベンゾイルイソチオシアネートとの反応で得られる閉環体を S-アルキル化して得た。その結果、構造活性相関として、1) 6 位アミノ基および 8 位水酸基 (あるいはチオール基) は活性発現に必須ではないが、高活性を発現するのに効果的であること、2) 9 位ベンジル基が活性発現に最適であること、3) 2 位への置換基導入が活性に極めて効果的であり、その長さは 4-6 原子が最適であることを明らかにした。また、2-ブトキシ-8-ヒドロキシ体などリード化合物と比較して 10⁴ 倍高い活性を有する誘導体を見いだした。

索引用語: インターフェロン誘導活性、8-ヒドロキシアデニン、8-メルカプトアデニン、9-ベンジルアデニン、構造活性相関

Synthesis and Structure-Activity Relationship of Adenine Derivatives with Interferon-Inducing Activity

Kazunori KAZAOKA, Hironao SAJIKI and Kosaku HIROTA

Abstract: Recently, we found that 9-benzyl-8-hydroxyadenine possesses relatively potent interferon (IFN)-inducing activity as a lead compound. An efficient, general and novel method for the synthesis of 2,9-disubstituted 8-hydroxyadenines was developed to establish the structure-activity relationship (SAR) for the IFN-inducing activity. Thus, 5-amino-4-cyano-2-hydroxyimidazole (3) was prepared from aminomalonnitrile and isocyanates as key intermediates. The condensation of 3 with imidates, guanidine, and urea afforded 8-hydroxyadenines (55-59, 60, 79) possessing various substituents at the 2-position. Furthermore, selective alkylation of 2-hydroxy- and 2-aminoadenines (60 and 79) successively proceeded to give the corresponding 2-alkoxy- and 2-alkylaminoadenines (61-65 and 81-86), respectively. 2-Alkylthioadenines (90-96) were prepared by an analogous reaction of 3 with benzoyl-isothiocyanate and subsequent S-alkylation. The imidazole is the most useful intermediate for the synthesis of various 8-hydroxyadenine derivatives. 6-Modified 8-hydroxyadenines were prepared by application for the conventional synthetic method. Remarkable features in the SAR are as follows: 1) An amino group at the 6-position and a hydroxyl (or thiol) group carrying an acidic proton at the 8-position are required to express excellent IFN-inducing activity. 2) At the 9-position, a benzyl-type substituent is essential for the activity. 3) The introduction of an appropriate chain substituent at the 2-position resulted in a remarkable increase in the activity. Optimal IFN-inducing activity is seen when the chain length of the 2-substituent is 4-6 atoms. As a result of this study, we successfully found 2-butoxy analogues (8-hydroxy or mercaptoadenines) as the most active compounds, whose potencies were 10⁴-fold greater than that of the lead compound.

Keyphrases: interferon-inducing activity, 8-hydroxyadenine, 8-mercaptoadenine, 9-benzyladenine, structure-activity relationship

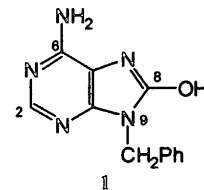
1. 緒言

C型肝炎はC型肝炎ウイルス(HCV)の感染により引き起こされる疾患であり、感染後、自覚症状がなく慢性化し、さらに数十年の長い年月を経て肝硬変、肝癌へと重篤化する。我が国における肝癌死亡数は過去30余年間増加の一途をたどり、年間約3万4千人(2000年)に達しており、その病因の約80%がHCV感染である。¹⁾ HCVは主に輸血や血液製剤、消毒が不十分な注射器や注射針を介して非経口的に感染する。²⁾ 我が国では、1992年以降、医療器具のディスポーザブル化や血液製剤に対するHCV検査の導入により、新しい感染患者の出現は非常に少なくなっている。¹⁾ しかし、2002年4月から老人保健法に基づく健康診断でHCV検査を無料で受けられるようになったことから、潜在的な患者が新たに見いだされることでHCV感染者数は急激に増加するものと予想され、推定では200万人近くになるとも言われている。³⁾

肝癌発生を予防するには感染そのものを予防することが重要であるが、HCV感染者を慢性肝炎の段階で肝硬変に移行させないように治療することも重要である。¹⁾ C型慢性肝炎の治療には原因療法と対症療法があるが、現在のところ、HCVを排除できる根治的治療法はインターフェロン(IFN)投与による治療のみである。しかし、IFN単独投与では効果が低く、現在、我が国でも治療効果を高めるべくリバビリンとの併用療法が承認されているが、使用期間の制限、および副作用(溶血性貧血、催奇形性)があるなどの問題点を有している。⁴⁾ また、IFNは生物製剤であるため高価であるとともに、徐放製剤化[PEG(IFN)]により投与回数を減少させることはできるものの長期間の筋肉注射による投与が必要であることから、患者の肉体的および経済的負担が大きい。一方、遺伝子組み換え型IFNによる治療では、中和抗体(抗IFN抗体)が産生され、IFNの抗ウイルス活性が減弱するという問題点を有している。⁵⁾ これらの問題点は、生体内でのIFN産生能を促進する薬物、すなわちIFN誘導剤の投与により解決できるものと考えられる。特に、低分子量のIFN誘導剤は経口投与が可能となり、合成医薬品であることからコストも安く、中和抗体の弊害もないことから早期開発が望まれるようになった。これまでも低分子量IFN誘導剤の開発研究は行われており、数多くのIFN誘導物質が報告されている。⁶⁾ その中で、Imiquimod⁷⁻⁹⁾(Fig. 1)が優れたIFN誘導活性を示し、臨床試験でPhase IIまで進んだが、嘔吐や肝障害などの副作用のため開発が断念されており、現在のところ治療に有効なIFN誘導剤は存在しない。

最近、著者の研究室において、ランダムスクリーニング

により9-ベンジル-8-ヒドロキシアデニン(1)に比較的高いIFN誘導活性が見いだされた。そこで、著者らは1をリード化合物としたIFN誘導活性の最適化を目的に、アデニン環2位、6位、8位および9位に種々の置換基を有する誘導体の合成を計画し、合成した誘導体のIFN誘導活性に関する構造活性相関の解析を検討した。本総説では研究の背景および本研究により得られた知見について論述する。



2. 研究の背景

2-1. 低分子量インターフェロン誘導剤の開発現況

これまでもIFN誘導剤の開発研究は行われており、数多くのIFN誘導物質が報告されている。⁶⁾ 主な低分子量IFN誘導物質をFig. 1に列挙した。低分子量のIFN誘導剤の開発研究は天然物であるCycloheximide⁹⁾やKanamycin¹⁰⁾にIFN誘導作用が認められたことがきっかけとなり始まった。1970年に低分子量IFN誘導物質としてTilorone¹¹⁾が発見されて以来、これまでに数多くの低分子量IFN誘導物質が報告されているが、その多くは毒性を示す、経口投与では作用が弱い、強い種差がある(マウスに投与した場合には作用を示すがヒトではほとんど作用を示さない)といった問題点を有していた。⁶⁾ その中で、Bropirimine [2-amino-5-bromo-6-phenyl-4(3H)-pyrimidinone; ABPP]¹⁸⁾は毒性が少なく臨床試験段階に進んだが、IFN誘導作用が弱いため、phase I以降の進展は報告されていない。また、米国3M社のImiquimod {1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amine; R-837, S-26308}⁷⁻⁸⁾はBropirimineよりはるかに強い活性を示し、臨床試験でphase IIまで進んだが、嘔吐や肝障害などの副作用のため内服あるいは注射剤としての開発が断念された。その後、Imiquimodよりも強力な活性を有する類縁体であるR-842、¹⁹⁾ S-27609、²⁰⁾ Resiquimod {4-amino-2-ethoxymethyl- α,α -dimethyl-1H-imidazo[4,5-c]quinoline-1-ethanol; R-848, S-28463}^{8,21)}およびS-28828²²⁾が見い出された。中でも、ResiquimodはImiquimodに比べ100倍強い活性を有することが報告されているが、現在のところImiquimodと共にパピローウイルス感染症を適応とした外用剤としてのみ認可を受けている。従って、これまでに医薬品として内服あるいは注射可能な低分子量IFN誘導剤は存在しない。

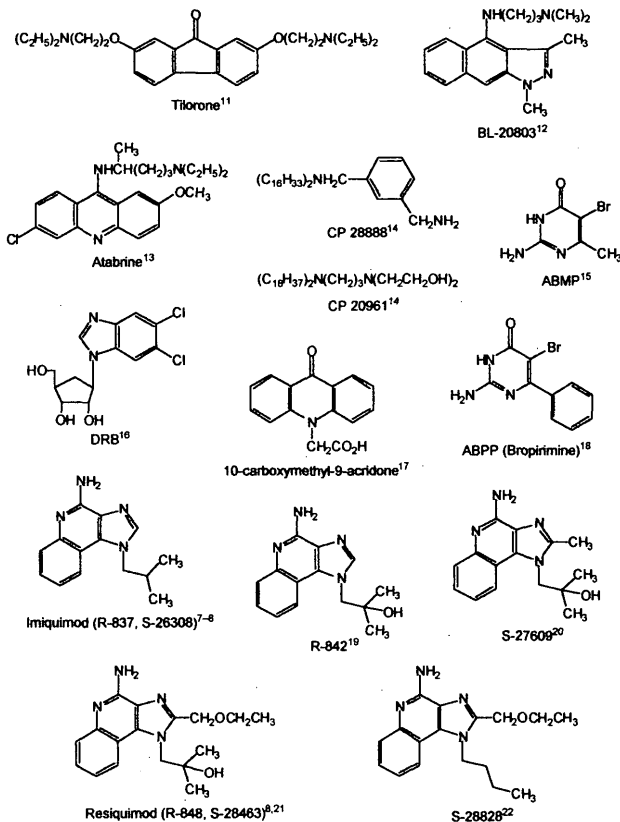


Fig. 1 Low molecular weight interferon inducers

2-2. ランダムスクリーニング

これまでに報告された IFN 誘導剤の中で Bropirime や Imiquimod などピリミジン環やイミダゾキノリン環を基本骨格に有する誘導体が優れた IFN 誘導活性を示し臨床試験にまで進んだ。そこで、新しいタイプの IFN 誘導剤を見出すべく、これまでに当研究室で合成した化合物ライブラリーからプリン誘導体など縮合ピリミジン類を選択し、マウス脾臓細胞を用いたスクリーニング (*in vitro*)²³⁻²⁴⁾を行った。その結果、9-ベンジル-8-ヒドロキシアデニン (1) および 9-ベンジル-8-メルカプトアデニン (2) が、それまでに最も高い活性を有する化合物として知られていた Imiquimod の 1/10 の IFN 誘導活性を有することを見いだした (Table 1)。しかしながら、8-メルカプト誘導体 2 はマウスを用いた *in vivo* 試験²³⁻²⁴⁾では不活性であったことから、8-ヒドロキシ誘導体 1 をリード化合物として選択した。なお、アデニン環 8 位に水酸基およびチオール基以外の置換基 (H, Cl, Br, I, CH₃, OCH₃, SCH₃, NHNH₂ 基) を有する 9-ベンジルアデニン誘導体は IFN 誘導活性を示さなかった (MEC = >10 μM)。そこで、リード化合物 1 の IFN 誘導活性の最適化を目的に、アデニン環 2 位、6 位および 9 位に種々の置換基を有する 8-ヒドロキシアデニン誘導体のデザインと合成に着手した。

Table 1. IFN-inducing activity of 8-substituted 9-benzyladenines

Compd	R	MEC ^a (μM)	MED ^b (mg/kg)
1	OH	10	10
2	SH	10	>30
Imiquimod		1	3

^aMinimum effective concentration (mice spleen cells): concentration of compounds required for more than 1IU/mL induction of IFN.
^bMinimum effective dose (mice po): dose of compounds required for more than 100 IU/mL induction of IFN.

3. 9-置換 8-ヒドロキシアデニン誘導体の合成とインターフェロン誘導活性

はじめに、9 位置換基の最適化を目的として種々の 9-置換 8-ヒドロキシアデニン誘導体の合成を検討した。これまでに報告されている 8-ヒドロキシアデニン誘導体の合成法は少なく、一般に 9-置換アデニンの 8 位を臭素化した後、加水分解する方法²⁵⁻²⁶⁾が一般的である。しかし、これらの従来法²⁷⁻²⁹⁾では 9 位に導入できる置換基が限定されるだけでなく 2 位への置換基導入が困難であり、多様な置換様式をもつ 8-ヒドロキシアデニン誘導体を合成する上で極めて不都合であった。そこで、これらの問題点を克服しうる新規合成法として、アミノマロノニトリルとイソシアネートからオルトアミノニトリル部分構造を有する 2-ヒドロキシイミダゾール誘導体を合成し、次いでアデニン環へと閉環する逆合成経路を考えた (Fig. 2)。

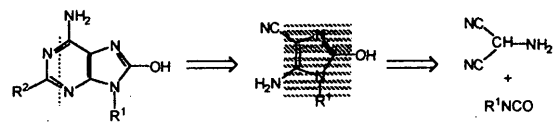


Fig. 2 Strategy for synthesis of 2,9-disubstituted 8-hydroxyadenines

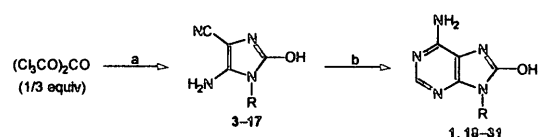
まず、鍵中間体である 2-ヒドロキシイミダゾール誘導体の合成にアミノマロノニトリル・*p*-トルエンスルホン酸塩に *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (1 当量) を加え塩を外した後、ベンジルイソシアネート (1.5 当量) を加え室温下反応したところ、目的とする 2-ヒドロキシイミダゾール誘導体 3 (R = CH₂Ph) を収率 19% で得ることができた。そこで、本反応の収率向上を目的に反応条件を詳細に検討した結果、*p*-トルエンスルホン酸塩を外すために加える塩基の当量数が本反応の進行に大きく影響することが

明らかとなり、0.8 当量が最適であった。この結果は、反応系が塩基性に傾くことにより遊離のアミノマロノニトリルがシアン化水素およびその二量体であるアミノシアノカルベンに容易に分解し、さらにこれらの反応種が重合化するという Moser らの報告³⁰⁾を考慮すると合理的に説明される。本反応は置換基の種類によって収率にばらつきが見られるものの一般性が確認された。しかし、本法は、用いるイソシアネート類は高価であり、試薬として入手可能な種類に限りがあるため、多彩な 9-置換アデニン誘導体の合成には不都合である。そこで、イソシアネート類を *in situ* で合成する方法として、トリホスゲンと 1 級アミン類からイソシアネートを発生させ、これを単離することなく直接アミノマロノニトリルと反応する方法を検討した。まず、トリホスゲン (1/3 当量) とベンジルアミン (1 当量) を *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (0.8 当量) 存在下反応後、アミノマロノニトリル (0.8 当量の塩基で塩を外したものを) を加えたところ、21%と低収率ながら目的の 3 を単離することができた。そこで、反応条件 (塩基の当量数や添加順序、反応温度) を詳細に検討した結果、塩基については、予めトリホスゲンと 2 種類のアミン (ベンジルアミンおよびアミノマロノニトリル) との反応により発生する 2 当量の塩化水素を中和するのに 1.6 当量の塩基を加えておき、1 当量の *p*-トルエンスルホン酸を中和するのに 0.8 当量の塩基を加える、すなわち常に塩基が当量以下になること、また、反応温度については、副生成物であるジベンジルウレアの生成を抑制するため、低温 (-80 °C) で実施したところ良好な結果を与えた。この最適条件下、各種 1 級アミン類を用いてイミダゾール誘導体 (4-17) の合成を検討したところ、芳香環上に電子供与基あるいは電子求引基のいずれが置換したベンジルアミンやアニリンを用いた場合にも目的とするイミダゾール誘導体を得ることができた。一方、アルキルアミンを用いた場合にも、収率の低下は認められたものの対応するイミダゾール誘導体が得られた。引き続き、得られたイミダゾール誘導体 3-17 を常法³¹⁾に従いホルムアミジン塩酸塩を用いて閉環し、アデニン環 9 位に種々の置換基を有する 8-ヒドロキシアデニン誘導体 (1, 18-31) を合成した (Scheme 1)。

次に、合成した種々の 9-置換 8-ヒドロキシアデニン誘導体の IFN 誘導活性を、マウス脾臓細胞を用いる²³⁻²⁴⁾ *in vitro* 測定を実施した。その結果を、それまでに最も高い活性を有する IFN 誘導物質として知られていた Imiquimod を比較対照薬として、Table 2 に示した。なお、IFN 誘導活性は 1 IU/mL 以上の IFN を誘導するのに必要な被験物質の濃度 (最小有効濃度: MEC) で表した。芳香環に電子供与基、電子求引基のいずれが置換したベンジル誘導体 (18-25) およびナフチルメチル体 (26) においてもリー

ド化合物 1 と同等の活性を示した。しかしながら、ブチル体 (27)、ヘプチル体 (28) といったアルキル置換体やフェニル体 (29)、フェネチル体 (30) は全く活性を示さなかった。一方、フェネチル基よりさらに炭素鎖を伸ばした 3-フェニルプロピル体 (31) はリード化合物 1 と同等の活性を示した。以上の結果から、IFN 誘導活性発現にはアデニン環 9 位窒素と芳香環との間のメチレン基は 1 個もしくは 3 個が適当であること、並びにベンジル基芳香環への置換基の導入は活性に大きな影響を及ぼさないことが明らかとなった。

Scheme 1.



Reagents and conditions: (a) i) RNH₂ (1 equiv), ^tPr₂NEt (1.6 equiv), dry THF, -80 °C; ii) (NC)₂CHNH₂·*p*-TsOH (1 equiv), ^tPr₂NEt (0.8 equiv), dry THF, rt (19-92%); (b) HC(NH)₂·HCl (4-8 equiv), 2-methoxyethanol, reflux (42-87%).

Table 2. IFN-inducing activity of 9-substituted 8-hydroxyadenines

Compd.	R	MEC ^a (μM)
18	2-methoxybenzyl	10
19	3-methoxybenzyl	10
20	4-methoxybenzyl	10
21	3,4-dimethoxybenzyl	10
22	4-methylbenzyl	10
23	4-chlorobenzyl	10
24	4-fluorobenzyl	10
25	2,5-difluorobenzyl	10
26	α-naphthylmethyl	10
27	butyl	>10
28	heptyl	>10
29	phenyl	>10
30	phenethyl	>10
31	3-phenylpropyl	10
1	benzyl	10
Imiquimod		1

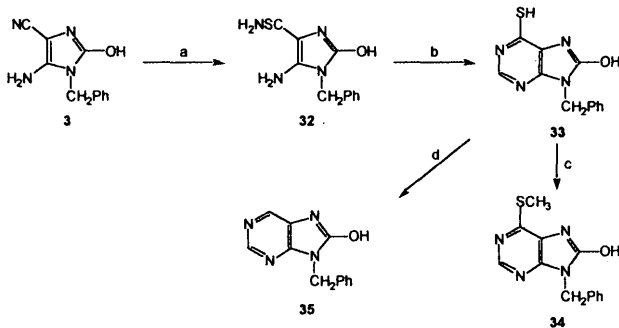
^aMinimum effective concentration (mice spleen cells): concentration of compounds required for more than 1 IU/mL induction of IFN.

4. 6-置換 9-ベンジル-8-ヒドロキシプリン誘導体の合成とインターフェロン誘導活性

前節で述べたように、アデニン環 9 位にベンジル型置換基あるいは 3-フェニルプロピル基が置換した 8-ヒドロキシアデニン誘導体がリード化合物と同等の活性を有していたことから、次に 6 位アミノ基が活性に及ぼす効果を明らかにする目的で、9 位置換基をベンジル基に固定して 6 位に種々の置換基を有する 8-ヒドロキシプリン誘導体の合成を検討した。

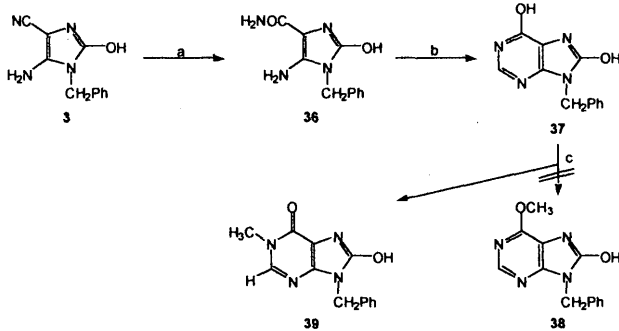
6-メルカプト体 (33) は、Taylor らの方法³²⁾を応用し、イミダゾール誘導体 3 をチオベンズアミドと熔融反応し 4 位シアノ基をチオアミド基に変換した後、ホルムアミジン塩酸塩で閉環して合成した。さらに、33 をメチル化して 6-メチルチオ体 (34) を、Raney Ni で脱硫して 6-無置換体 (35) を合成した (Scheme 2)。6-ヒドロキシ体 (37) はイミダゾール誘導体 3 の 4 位シアノ基を加水分解した後、ホルムアミジンで閉環して合成した。しかし、6-メトキシ体 (38) を得る目的で 37 のメチル化を行ったところ、1 位窒素にメチル化が進行した 39 が得られ 38 は全く得られ

Scheme 2



Reagents and conditions: (a) PhCSNH₂, neat; (69%) (b) HC(NH)NH₂·HCl, 2-methoxyethanol, reflux (87%); (c) CH₃I, K₂CO₃, DMF, rt (20%); (d) Raney Ni, NH₄OH, CH₃OH, reflux (36%).

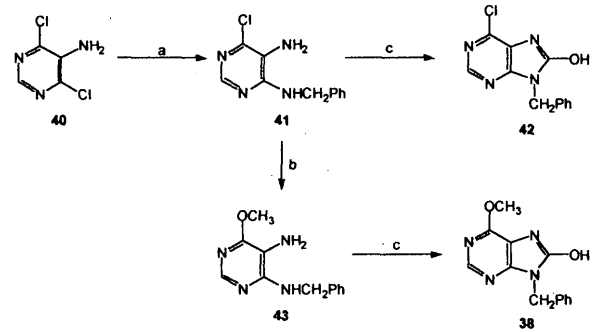
Scheme 3



Reagents and conditions: (a) c. H₂SO₄, 0 °C → rt (91%); (b) HC(NH)NH₂·HCl, 2-methoxyethanol, reflux (40%); (c) CH₃I, K₂CO₃, DMF, rt (41%).

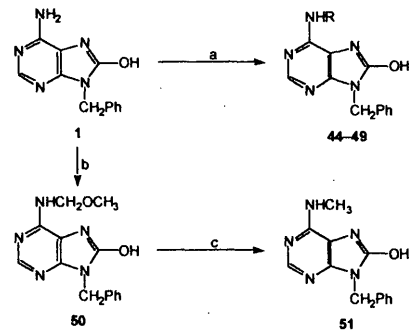
なかった (Scheme 3)。そこで、38 は Scheme 4 に示すようにピリミジン誘導体から合成した。さらに、リード化合物 1 の 6 位アミノ基を還元的アルキル化して³³⁾ 6-アルキルアミノ体 (44-49) を、また、酸無水物によりアシル化して 3 種の 6-アミド体 (52-54) を合成した (Scheme 5-6)。

Scheme 4



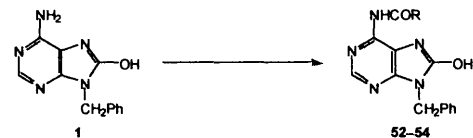
Reagents and conditions: (a) PhCH₂NH₂, (C₂H₅)₃N, C₄H₉OH, reflux (92%); (b) NaOCH₃, CH₃OH, reflux; (c) (Cl₃CO)₂CO, (C₂H₅)₃N, THF, rt (42: 88%, 38: 11% in 2 steps).

Scheme 5



Reagents and conditions: (a) aldehyde, NaBH₃CN, CH₃OH, 50 °C (35-78%); (b) (HCHO)_n, NaBH₄, CH₃OH, 50 °C (69%); (c) NaBH₄, CF₃CO₂H, THF, rt (27%).

Scheme 6

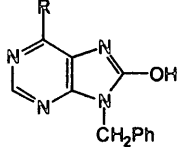


Reagents and conditions: (CH₃CO)₂O, c. H₂SO₄, rt (R = CH₃, 84%); (CF₃CO)₂O, reflux (R = CF₃, 35%); (PhCO)₂O, neat (R = Ph, 74%).

以上、合成した 6-置換 9-ベンジル-8-ヒドロキシプリン誘導体の IFN 誘導活性 (*in vitro*) を評価した結果を Table 3 に示した。トリフルオロアセチル体 (53) はリード化合物 1 と同等の活性を示したが、これは 53 が不安定であるため評価の過程で分解して 6-アミノ体 (1) となり活性を示したものと考えている。その他の 6 位置換体はいずれも今回の評価における被験物質の最高濃度である 10 μM では

不活性であった。以上の結果から、IFN 誘導活性発現にはプリン環 6 位にアミノ基が必須であることが明らかとなった。

Table 3. IFN-inducing activity of 6-substituted 9-benzyl-8-hydroxypurines



Compd.	R	MEC ^a (μM)
35	H	>10
42	Cl	>10
37	OH	>10
38	OCH ₃	>10
33	SH	>10
34	SCH ₃	>10
51	NHCH ₃	>10
44	NHC ₂ H ₅	>10
45	NHC ₃ H ₇	>10
46	NHC ₄ H ₉	>10
47	NHC ₅ H ₁₁	>10
48	NHC ₆ H ₁₃	>10
49	NHC ₄ H ₉	>10
52	NHCOCH ₃	>10
53	NHCOCF ₃	10
54	NHCOPh	>10
50	NHCH ₂ OCH ₃	>10
1	NH ₂	10
Imiquimod		1

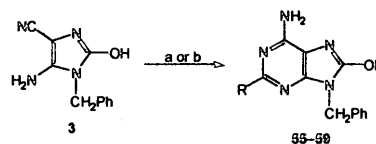
^aMinimum effective concentration (mice spleen cells): concentration of compounds required for more than 1 IU/mL induction of IFN.

5. 2-置換 9-ベンジル-8-ヒドロキシアデニン誘導体の合成とインターフェロン誘導活性

これまでの検討において、活性発現にはアデニン環 9 位にベンジル (型置換) 基が、6 位にアミノ基が必須であることが明らかとなった。次に、活性に及ぼすアデニン環 2 位の置換基効果を検討する目的で、アデニン環 2 位にアルキル基、アルコキシ基、アルキルアミノ基およびアルキルチオ基といった様々な置換基を有する 9-ベンジル-8-ヒドロキシアデニン誘導体の合成に着手した。

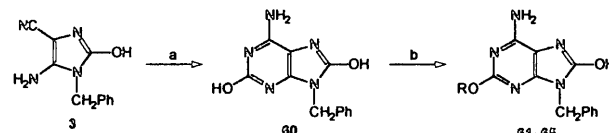
2-アルキル体 (55-59) は、2-ヒドロキシイミダゾール誘導体 3 とアミジン類³⁴⁻³⁵⁾、あるいはアミジンが市販されていない場合は対応するニトリルから用時調製したイミノエーテル類³⁶⁾との閉環反応により合成した (Scheme 7)。

Scheme 7



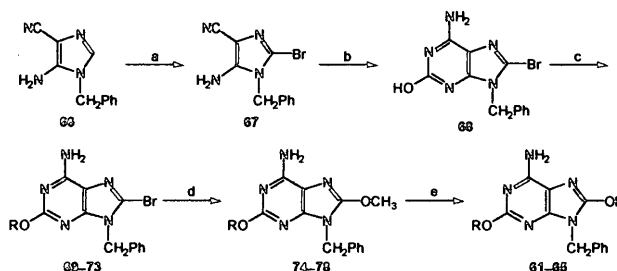
Reagents and conditions: (a) RC(NH)NH₂·HCl, NaOC₂H₅, C₂H₅OH, reflux (R= CH₃, Ph; 31-70%); (b) RC(NH)OC₂H₅·HCl, NaOC₂H₅, C₂H₅OH, reflux (R= C₂H₅-C₄H₉; 32-41%).

Scheme 8



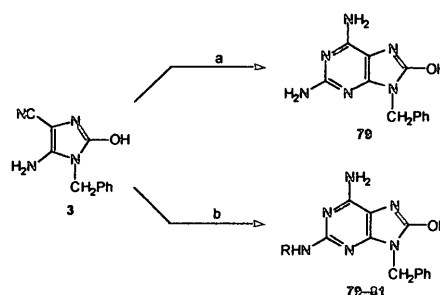
Reagents and conditions: (a) H₂NCONH₂, neat (72%); (b) RX, LiH, DMF, rt (R= CH₃-C₅H₁₁; 6-13%).

Scheme 9



Reagents and conditions: (a) NBS, THF, rt (88%); (b) H₂NCONH₂, neat (88%); (c) RX, K₂CO₃, DMF, rt (R= CH₃-C₅H₁₁; 23-74%); (d) 1N NaOH aq., CH₃OH, reflux (71-82%); (e) c. HCl, rt (74-87%).

Scheme 10

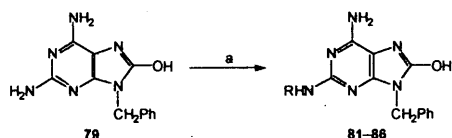


Reagents and conditions: (a) H₂NC(NH)NH₂·HCl, NaOC₂H₅, C₂H₅OH, reflux (72%); (b) RHNCSNH₂, neat (12-72%).

2-アルコキシ体 (61-65) は、常法³⁷⁾に従い 3 をウレアで閉環し 2-ヒドロキシ体 (60) にした後、2 位水酸基をアルキル化して合成した (Scheme 8)。しかし、本アルキル化反応は選択性に乏しく低収率であったので最終的に Scheme 9 に示すように、反応工程が長くなるものの、アルキル化の選択性に優れた方法で合成した。一方、2-アミノ体 (79) は 3 をグアニジンで閉環して合成した。³⁵⁾ また、チオウレアと反応した場合にも脱硫が優先して閉環し、

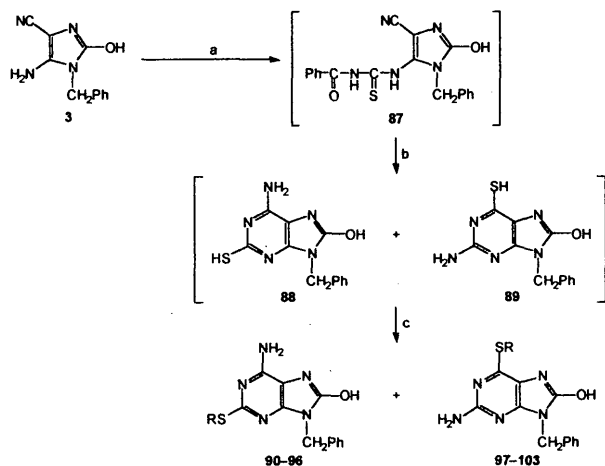
79 が選択的に得られた (Scheme 10)。さらに、アルキル鎖の短いアルキルアミノ体 (80-81) は、3 を *N*-アルキルチオウレア類で閉環して (Scheme 10)、アルキル鎖の長いアルキルアミノ体 (81-86) は、2-アミノ体 79 の 2 位アミノ基を位置選択的に還元的アルキル化して合成した (Scheme 11)。また、2-アルキルチオ体 (90-96) は、3 にベンゾイルイソチオシアネートを反応させベンゾイルチオウレア中間体 (87) に導き、これをアルカリ処理して 2-メルカプト体 (88) とした後、2 位チオール基をアルキル化して合成した。なお、本反応では、目的物 90-96 の位置異性体である 2-アミノ-6-アルキルチオ体 (97-103) が副生した (Scheme 12)。加えて、2-ブチルチオ体 93 を *m*CPBA で酸化して 2-ブチルスルホキシド体 (104) および 2-ブチルスルホン体 (105) も合成した。

Scheme 11



Reagents and conditions: (a) aldehyde, NaBH₃CN, CH₃OH, rt (R= C₂H₅-C₆H₁₃; 53-94%).

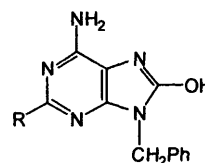
Scheme 12



Reagents and conditions: (a) PhCONCS, THF, rt; (b) 2N NaOH, THF, reflux; (c) RX, K₂CO₃, DMF, rt or 60 °C (R= CH₃-C₃H₁₁, CH₂Ph, CH₂CH₂OH; 90-96: 21-43%, 97-103: 12-20% in 3 steps).

以上、合成した 2-置換 9-ベンジル-8-ヒドロキシアデニン誘導体のインターフェロン誘導活性 (*in vitro*) を Table 4 に示した。2 位への置換基導入により活性は顕著に上昇した。例えば、メチル体 (55)、エチル体 (56) およびプロピル体 (57) はリード化合物である 2 位無置換体 (1) と比較して 10 倍、さらにブチル体 (58) では、約 100 倍高い活性を示した。一方、フェニル基を導入した場合には活性向上は認められなかった。酸素型置換基の場合では、ヒドロキシ体 (60)、メトキシ体 (61) およびエトキシ体 (62)

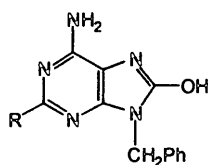
Table 4. IFN-inducing activity *in vitro* of 2-substituted 9-benzyl-8-hydroxyadenines



Compd.	R	MEC ^a (μM)
55	CH ₃	1
56	C ₂ H ₅	1
57	C ₃ H ₇	1
58	C ₄ H ₉	0.03
59	Ph	10
60	OH	0.1
61	OCH ₃	0.1
62	OC ₂ H ₅	0.1
63	OC ₃ H ₇	0.01
64	OC ₄ H ₉	0.001
65	OC ₅ H ₁₁	0.01
79	NH ₂	10
80	NHCH ₃	1
81	NHC ₂ H ₅	1
82	NHC ₃ H ₇	0.1
83	NHC ₄ H ₉	0.1
84	NHC ₅ H ₁₁	0.1
85	NHC ₆ H ₁₃	1
86	NHC ₄ H ₉	0.1
88	SH	10
90	SCH ₃	0.1
91	SC ₂ H ₅	0.1
92	SC ₃ H ₇	0.01
93	SC ₄ H ₉	0.01
94	SC ₃ H ₁₁	10
95	SCH ₂ Ph	0.1
96	SCH ₂ CH ₂ OH	0.1
104	S(O)C ₄ H ₉	0.01
105	SO ₂ C ₄ H ₉	0.01
1	H	10
Imiquimod		1

^aMinimum effective concentration (mice spleen cells): concentration of compounds required for more than 1 IU/mL induction of IFN.

はリード化合物 1 より 100 倍、プロポキシ体 (63) は 1000 倍高い活性を示した。さらに、ブトキシ体 (64) は 1 より 10000 倍高い活性を示し、今回合成した誘導体の中では最も強力な活性を有していた。しかしながら、アルキル鎖をさらに伸長すると活性は減弱した。同様の傾向が窒素型置

Table 5. IFN-inducing activity *in vivo* of 2-substituted 9-benzyl-8-hydroxyadenines

Compd.	R	MED ^a (μM)
55	CH ₃	3
56	C ₂ H ₅	3
57	C ₃ H ₇	3
58	C ₄ H ₉	0.3
59	Ph	>30
60	OH	1
61	OCH ₃	>1
62	OC ₂ H ₅	0.3
63	OC ₃ H ₇	0.3
64	OC ₄ H ₉	0.1
65	OC ₅ H ₁₁	0.3
79	NH ₂	nt ^b
80	NHCH ₃	nt ^b
81	NHC ₂ H ₅	nt ^b
82	NHC ₃ H ₇	1
83	NHC ₄ H ₉	0.1
84	NHC ₅ H ₁₁	0.3
85	NHC ₆ H ₁₃	nt ^b
86	NH ^t C ₄ H ₉	nt ^b
88	SH	nt ^b
90	SCH ₃	0.1
91	SC ₂ H ₅	0.1
92	SC ₃ H ₇	0.1
93	SC ₄ H ₉	0.3
94	SC ₅ H ₁₁	1
95	SCH ₂ Ph	>1
96	SCH ₂ CH ₂ OH	nt ^b
104	S(O)C ₄ H ₉	1
105	SO ₂ C ₄ H ₉	nt ^b
1	H	30
Imiquimod		3

^aMinimum effective dose (mice po): dose of compounds required for more than 100 IU/mL induction of IFN. ^bNot tested.

換基の場合でも見られた。すなわち、アミノ体 (79) はリード化合物 1 と同等の活性を示したのに対し、メチルアミノ体 (80)、エチルアミノ体 (81) は 1 の 10 倍、プロピルアミノ体 (82)、ブチルアミノ体 (83) およびペンチルアミノ体 (84) は 100 倍高い活性を示した。しかしながら、

ヘキシルアミノ体 (85) は 1 と同等の活性を示すに留まった。また、分岐のアルキル鎖を有するイソブチルアミノ体 (86) の活性は直鎖のブチルアミノ体 83 と同等であった。硫黄型置換基においても同様に、メルカプト体 (88) が 1 と同等の活性を示したのに対して、メチルチオ体 (90)、エチルチオ体 (91) が 1 と比較して 100 倍、プロピルチオ体 (92) およびブチルチオ体 (93) が 1000 倍高い活性を示したが、ペンチルチオ体 (94) では活性が極端に低下した。一方、ベンジルチオ体 (95) および末端に水酸基を有する 96 も 1 に比べ 100 倍強力な活性を有していた。一方、ブチルスルホキシド体 (108) およびブチルスルホン体 (109) はブチルチオ体 93 と同等の活性を示し、興味もたれる。以上のように、いずれのタイプのアルキル鎖を導入した場合にも活性の向上が認められたが、その効果の大きさは、酸素型置換基>硫黄型置換基>窒素型置換基>アルキル鎖といった傾向が認められた。

さらに、最も高い活性を与えたプトキシ体 (64) を選択し、ヒトの末梢血単核細胞 (PBMC) を用いて IFN 誘導活性を測定した。その結果、ヒト細胞においても IFN 誘導が認められ、MEC= 0.01 μM を示した (MEC は 1 pg/mL 以上の IFN を誘導する化合物の最小有効濃度)。これまでに報告された IFN 誘導剤にはマウスでは作用を示すがヒトでは作用を示さない、すなわち強い種差があるものが存在するが、64 はこのような問題点を全く示さなかった。

以上のように、多数の 2 位置換アデニン誘導体がマウス脾臓細胞を用いた *in vitro* の評価において優れた活性を示したことから、引き続き、これら誘導体の *in vivo* (マウス経口投与) での IFN 誘導活性²³⁻²⁴⁾ を測定した。その結果を Table 5 に示した。なお、活性は 100 IU/mL 以上の IFN を誘導するのに必要な被験物質の投与量 (最小有効投与量: MED) で表した。 *in vitro* において高い活性を示した誘導体は *in vivo* においても優れた活性を示した。特に、プトキシ体 (64)、ブチルアミノ体 (83)、メチルチオ体 (90)、エチルチオ体 (91) およびプロピルチオ体 (92) はリード化合物である無置換体 (1) と比較して 100 倍以上優れた活性を示した (MED= 0.1 mg/kg)。また、これら誘導体の *in vivo* における IFN 誘導活性は用量依存的であった。代表例としてプトキシ体 (64) およびブチルチオ体 (93) の *in vivo* における用量活性相関を Fig. 3 に示した。両化合物の活性は 3 mg/kg でほぼプラトーに達し、10 mg/kg ではプトキシ体 64 は約 2500 IU/mL、ブチルチオ体 93 は約 3600 IU/mL の IFN を誘導した。一般に、C 型肝炎患者の治療に必要な血漿中の IFN 濃度は 50-100 IU/mL である。化合物 64 および 93 はそれぞれ 0.1 mg/kg、0.3 mg/kg において 250 IU/mL 以上の IFN を誘導している。対照薬である imiquimod は 3 mg/kg において 67±21 IU/mL の IFN を誘導

することと比較すると、化合物 **64** および **93** はより低濃度で優れた活性を示すといえる。

さらに、毒性についても検討を加えた。最も優れた活性を示したプトキシ体 (**64**) の *in vitro* で細胞毒性を MTS 法 (ホルマザン比色定量) にて測定したが、今回の評価における被験物質の最高濃度である 10 μ M でも全く毒性を示さなかった。また、*in vivo* では、**64** を MED の 100 倍量経口投与したが、毒性症状は観察されなかった。

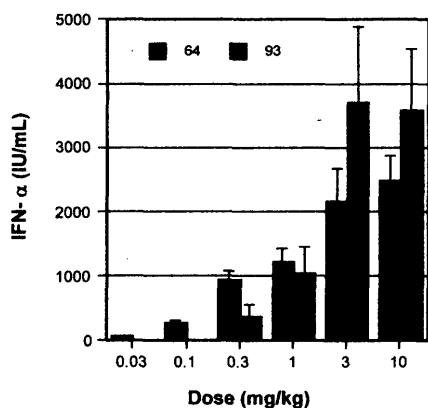


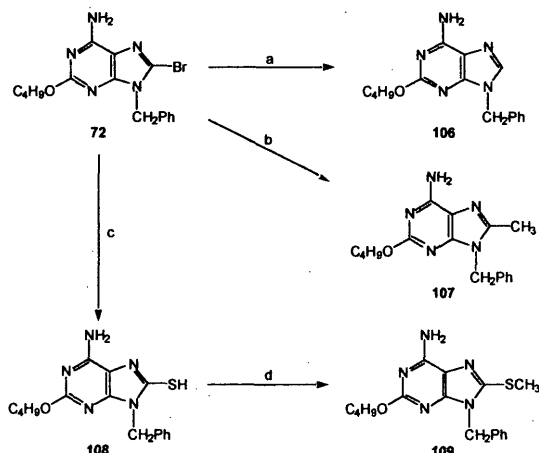
Fig. 3. Dose-dependent effect of compounds **64** and **93** on IFN- α inducing activity in mice by oral administration.

6. 6位アミノ基および8位水酸基のインターフェロン誘導活性における重要性

前述のように、IFN 誘導活性発現にはアデニン環 6 位にアミノ基、8 位にアルコール型置換基 (水酸基やチオール基) および 9 位にベンジル型置換基が必須であり、2 位への置換基導入が活性向上に効果的であることが明らかとなった。そこで、活性発現に対する 6 位アミノ基および 8 位水酸基の必要性をさらに詳細に検討する目的で、アデニン環 2 位にプトキシ基など高い活性を与える置換基を有する 2,8-二置換 9-ベンジルアデニン誘導体および 2,6-二置換 9-ベンジル-8-ヒドロキシプリン誘導体の合成に着手した。

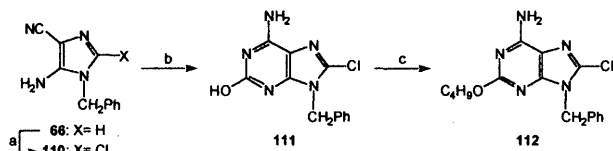
アデニン環 2 位にプトキシ基を有する 8-置換 9-ベンジルアデニン誘導体は前述の 9-ベンジル-8-プロモ-2-プトキシアデニン (**72**) を出発原料に用いて合成した。8 位無置換体 (**106**) は **72** の 8 位臭素を接触還元することにより合成した。8-メチル体 (**107**) はトリメチルアルミニウムを用いたカップリング反応³⁸⁾を適用して合成した。また、8-メルカプト体 (**108**) は Lin らの方法³⁹⁾に従い合成し、さらに **108** の 8 位チオール基をメチル化し 8-メチルチオ体 (**109**) へ誘導した (Scheme 13)。さらに、8-クロロ体

Scheme 13



Reagents and conditions: (a) 10% Pd/C, (C₂H₅)₃N, H₂ (balloon), CH₃OH, rt (94%); (b) Al(CH₃)₃, PdCl₂, Ph₃P, THF, reflux (96%); (c) H₂NCSNH₂, C₂H₅OH, reflux (86%); (d) CH₃I, K₂CO₃, DMF, rt (88%).

Scheme 14



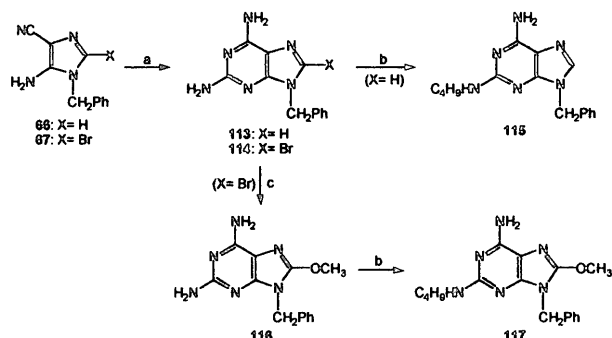
Reagents and conditions: (a) NCS, THF, rt (87%); (b) H₂NCONH₂, neat (78%); (c) C₆H₅Br, K₂CO₃, DMF, rt (66%).

(**112**) は Scheme 9 に示した方法を応用して合成した (Scheme 14)。

一方、2 位にブチルアミノ基を有する 8-置換アデニン誘導体は Scheme 15 および 16 に示す方法で合成した。すなわち、8 位無置換体 (**115**) は 2 位無置換のイミダゾール (**66**) をグアニジンで閉環して得られる 2-アミノ-9-ベンジルアデニン (**113**) の 2 位アミノ基を還元的ブチル化して合成した。また、8-メトキシ体 (**117**) は 2-プロモイミダゾール (**67**) をグアニジンで閉環後、8 位臭素をメタノリシスして 2-アミノ-8-メトキシアデニン誘導体 (**116**) へ導き、これを還元的ブチル化して合成した (Scheme 15)。また、8-メルカプト体 (**121**) は、前述の 2-ヒドロキシイミダゾール誘導体の合成法を適用し、アミノマロノニトリルをベンジルイソチオシアネートと反応し 2-ベンジルアミノチアゾール誘導体 (**118**) とした後、グアニジンで閉環して得られる 2-アミノ-8-メルカプトアデニン誘導体 (**120**) の 2 位アミノ基を還元的ブチル化して合成した。なお、中間体 **120** は Sen らの方法⁴⁰⁾に従い、チアゾール誘導体 **118** を塩基処理して 2-メルカプトイミダゾール誘導体 **119** に環変換したのち、グアニジンで閉環することでも得られた (Scheme 16)。

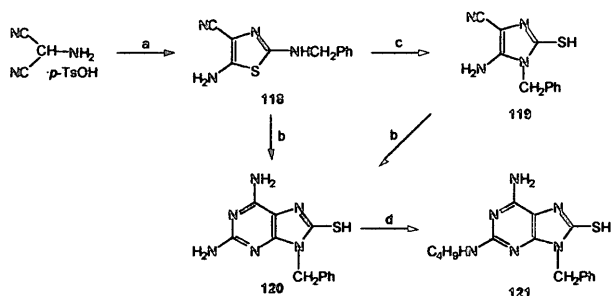
以上、合成した 2,8-二置換 9-ベンジルアデニン誘導体のインターフェロン誘導活性 (*in vitro*) の評価結果を Table

Scheme 15



Reagents and conditions: (a) $\text{H}_2\text{NC}(\text{NH})\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$, NaOC_2H_5 , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, reflux (113: 99%, 114: 89%); (b) $\text{C}_3\text{H}_7\text{CHO}$, NaBH_3CN , CH_3OH , rt (115: 84%, 117: 85%); (c) 1N NaOH aq., CH_3OH , reflux (70%).

Scheme 16

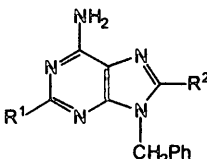


Reagents and conditions: (a) PhCH_2NCS , Pr_2NEt , THF , 40°C (86%); (b) $\text{H}_2\text{NC}(\text{NH})\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$, NaOC_2H_5 , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, reflux (76% from 118, 69% from 119); (c) 5% Na_2CO_3 aq., reflux (84%); (d) $\text{C}_3\text{H}_7\text{CHO}$, NaBH_3CN , CH_3OH , rt (72%).

6に示した。アデニン環2位にプトキシ基を有する誘導体では8位に水酸基以外の置換基を導入した場合でもリード化合物(1)と同等もしくはそれ以上の活性を示した。8位無置換体(106)、クロロ体(112)、プロモ体(72)およびメチル体(107)はいずれもリード化合物1に比べ10倍高い活性を示した。8-メルカプト体(108)は8-ヒドロキシ体(64)と同じく1より10000倍高い活性を有していたが、64の水酸基および108のチオール基にメチル基を導入したメトキシ体(77)およびメチルチオ体(109)では極端に活性が减弱し、リード化合物1と同等の活性であった。一方、2位にブチルアミノ基を有する誘導体でも同様な傾向を示し、無置換体(115)では1より10倍高い活性を示したが、メトキシ体(117)は不活性であった。興味深いことに、8-メルカプト体(121)は優れた活性を示し、8-ヒドロキシ体(83)よりもさらに10倍高い活性を示した。以上の結果から、アデニン環8位水酸基は活性発現に必須ではないが、高活性を得るのに不可欠であることが明らかとなった。さらに、8位チオール基も水酸基と同等の効果を与えることが判明した。

次に、アデニン環6位アミノ基のIFN誘導活性発現に

Table 6. IFN-inducing activities of 2,8-disubstituted 9-benzyladenines



Compd.	R ¹	R ²	MEC ^a (μM)
106	OC ₄ H ₉	H	1
112	OC ₄ H ₉	Cl	1
72	OC ₄ H ₉	Br	1
107	OC ₄ H ₉	CH ₃	1
77	OC ₄ H ₉	OCH ₃	10
108	OC ₄ H ₉	SH	0.001
109	OC ₄ H ₉	SCH ₃	10
115	NHC ₄ H ₉	H	1
117	NHC ₄ H ₉	OCH ₃	>10
121	NHC ₄ H ₉	SH	0.01
64	OC ₄ H ₉	OH	0.001
83	NHC ₄ H ₉	OH	0.1
1	H	OH	10
2	H	SH	10
Imiquimod			1

^aMinimum effective concentration (mice spleen cells); concentration of compounds required for more than 1 IU/mL induction of IFN.

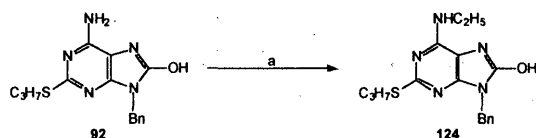
おける重要性を検討する目的で、6位無置換体として、合成の容易さから2位の置換基としてブチルアミノ基を選択し、2-ブチルアミノ-8-ヒドロキシプリン誘導体(123)の合成を行った。出発原料としてScheme 12に示した2-アルキルチオアデニン誘導体の合成において生じる副生成物である2-アミノ-9-ベンジル-6-エチルチオ-8-ヒドロキシプリン(98)を用いた。98の6位エチルチオ基をラネーニッケルで脱硫したのち、2位アミノ基を選択的に還元的ブチル化して目的の123を得た(Scheme 17)。また、6位アミノ基へのエチル基の導入も検討した。Table 4で示したように、高い活性を示す9-ベンジル-8-ヒドロキシ-2-プロピルチオアデニン(92)を選択し、6位アミノ基を還元的エチル化し、N⁶-エチル体(124)を合成した(Scheme 18)。

Scheme 17



Reagents and conditions: (a) Raney Ni, NH_4OH , CH_3OH , reflux (61%); (b) $\text{C}_3\text{H}_7\text{CHO}$, NaBH_3CN , CH_3OH , rt (40%).

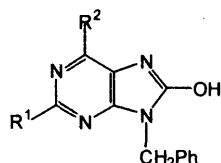
Scheme 18



Reagents and conditions: (a) CH_3CHO , NaBH_3CN , CH_3OH , 50°C (69%).

合成した2,6-二置換9-ベンジル-8-ヒドロキシアデニン誘導体のIFN誘導活性 (*in vitro*) の評価結果をTable 7に示した。2-ブチルアミノアデニン誘導体(83)の6位アミノ基を除去した123の活性は83と比較すると幾分劣ってはいたが、リード化合物1より優れた活性を示した。一方、2-プロピルチオアデニン誘導体(93)の6位アミノ基にエチル基を導入した124は、93と比較すると極端に活性が減少し、リード化合物1と同等の活性を示すに留まった。これらの結果から、6位アミノ基は高活性の発現には必要であることが明らかとなった。

Table 7. IFN-inducing activity of 2,6-disubstituted 9-benzyl-8-hydroxypurines



Compd.	R ¹	R ²	MEC ^a (μM)
123	NHC ₄ H ₉	H	1
124	SC ₃ H ₇	NHC ₂ H ₅	10
83	NHC ₄ H ₉	NH ₂	0.1
93	SC ₃ H ₇	NH ₂	0.01
1	H	NH ₂	10
Imiquimod			1

^aMinimum effective concentration (mice spleen cells): concentration of compounds required for more than 1 IU/mL induction of IFN.

7. 結論

最近、著者の研究室で見いだされたIFN誘導活性を有する9-ベンジル-8-ヒドロキシアデニン(1)をリード化合物として、活性の最適化を目的に本研究を実施した。

これらの構造活性相関には、多様な置換様式をもつ8-ヒドロキシアデニン誘導体を合成する必要がある、従来法では合成困難なため、新規合成法を開発した。アミノマロンニトリルとイソシアネート類との反応から鍵中間体である5-アミノ-4-シアノ-2-ヒドロキシイミダゾール(3)を合成し、これをC-N試薬で閉環する合成法

を確立した。本法で合成した種々のプリン誘導体のIFN誘導活性から、構造活性相関に関する2, 3の知見が得られた。第一に、アデニン環2位にヘテロ原子を含め4-6原子の置換基の導入が活性向上に極めて効果的であった。特に、2-ブトキシ-8-ヒドロキシアデニン誘導体(64)はリード化合物1と比較して10,000倍高い活性が認められた。第二に、6位アミノ基および8位水酸基(またはチオール基)は活性発現には必須ではないが、高い活性を得るには不可欠であった。また、9位はベンジル型置換基が活性発現に最適であった。

最も活性の高かった2-ブトキシ体(64)はヒト細胞においてもIFN誘導作用を示した。また、64はマウスに経口投与した場合にもこれまでの最も優れたIFN誘導剤であるImiquimodより低用量でIFNを誘導し、高用量投与しても毒性症状は認められなかった。

なお、IFN誘導作用のメカニズムは現在のところ明確にはなっていないが、最近、HemmiらがImiquimodやResiquimodなどイミダゾキノリン系化合物がToll様受容体7(TLR7)に親和性が高いことを見い出しており、⁴¹⁾今回合成したアデニン誘導体もTLR7を介してIFN誘導作用を発現している可能性が高いと考えられる。

これまでに治験まで進んだ代表的なIFN誘導剤であるBropiramineやImiquimodは作用が弱い、あるいは嘔吐作用などの副作用が発現するといった理由から開発が断念された。本研究で見いだされた64はこれらの問題点を克服しており、今後、TNF- α などの他のサイトカイン類の発現誘導を伴わず選択的にIFNのみを誘導すること、また連用による活性の低下を抑制するための間歇投与方法の開発など、検討すべき課題がいくつか提示されているが、C型肝炎治療薬開発への進展が期待される。

8. 謝辞

本研究の実施にあたり、インターフェロン誘導活性を測定して頂きましたジャパンエナジー株式会社医薬・バイオ研究所(現、住友製薬株式会社総合研究所)・林秀也博士、磯部義明博士ならびに関係諸氏に深謝致します。

また、本研究に際して御協力頂きました岐阜薬科大学薬品化学教室の諸氏に感謝致します。

9. 引用文献

- 井廻道夫 感染・炎症・免疫 **2002**, 32(2), 10.
- World Health Organization: Weekly Epidemiological Record **1999**, N-49.
- 辻孝夫 医薬ジャーナル **2002**, 38(8), 63.

- 4) 熊田博光 *日本薬剤師会雑誌* 2002, 54(9), 81.
- 5) Rönnblom, L. E.; Tiensuu Janson, E.; Perers, A.; Öberg, K. E.; Alm, G. V. *Clin. Exp. Immunol.* 1992, 89, 330.
- 6) Wierenga, W. *Annu. Rep. Med. Chem.* 1982, 17, 151.
- 7) Weeks, C. E.; Reiter, M. J. *J. Invest. Dermatol.* 1989, 93, 584.
- 8) Dockrell, D. H.; Kinghorn, G. R. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001, 48, 751.
- 9) Youngner, J. S.; Stinebring, W. R.; Taube, S. E. *Virology* 1965, 27, 541.
- 10) Lukás, B.; Hrusková, J. *Acta Virol.* 1968, 12, 263.
- 11) Krueger, R. F.; Mayer, G. D. *Science* 1970, 169, 1213.
- 12) Siminoff, P.; Bernard, A. M.; Hursky, V. S.; Price, K. E. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1973, 3, 742.
- 13) Gláz, E. T.; Szolgay, E.; Stöger, I.; Tálás, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1973, 3, 537.
- 14) Hoffman, W. W.; Korst, J. J.; Niblack, J. F.; Cronin, T. H. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1973, 3, 498.
- 15) Nichol, F. R.; Weed, S. D.; Underwood, G. E. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1976, 9, 433.
- 16) Tamm, I.; Sehgal, P. B. *J. Exp. Med.* 1977, 145, 344.
- 17) Taylor, J. L.; Schoenherr, C. K.; Grossberg, S. E. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1980, 18, 20.
- 18) Wierenga, W.; Skulnick, H. I.; Stringfellow, D. A.; Weed, S. D.; Renis, H. E.; Eidson, E. E. *J. Med. Chem.* 1980, 23, 237.
- 19) Weeks, C. E.; Gibson, S. J. *J. Interferon Res.* 1994, 14, 81.
- 20) Testerman, T. L.; Gerster, J. F.; Imbertson, L. M.; Reiter, M. J.; Miller, R. L.; Gibson, S. J.; Wagner, T. L.; Tomai, M. A. *J. Leuk. Biol.* 1995, 58, 365.
- 21) Tomai, M. A.; Gibson, S. J.; Imbertson, L. M.; Miller, R. L.; Myhre, P. E.; Reiter, M. J.; Wagner, T. L.; Tamulinas, C. B.; Beaurline, J. M.; Gerster, J. F.; Horton, V. L. *Antiviral Res.* 1995, 28, 253.
- 22) Karaca, K.; Sharma, J. M.; Tomai, M. A.; Miller, R. L. *J. Interferon Cytokine Res.* 1996, 16, 327.
- 23) Watanabe, Y.; Kawade, Y. In *Lymphokines and Interferons: a practical approach*; Clemens, M. J.; Morris, A. G.; Gearing, A. J. H., Eds.; IRL Press: Oxford, 1987; pp 1-14.
- 24) Pestka, S. *Method in Enzymology*, Pestka, S., Ed.; Academic Press: New York, 1986; Vol. 119, pp 14-23.
- 25) Robins, R. K. *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 80, 6671.
- 26) Holy, A.; Kohoutová, J.; Merta, A.; Votruba, I. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1986, 51, 459.
- 27) Altman, J.; Ben-Ishai, D. *J. Heterocycl. Chem.* 1968, 5, 679.
- 28) Beck, J. P.; Arvanitis, A. G.; Curry, M. A.; Rescinito, J. T.; Fitzgerald, L. W.; Gilligan, P. J.; Zaczek, R.; Trainor, G. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999, 9, 967.
- 29) Itaya, T.; Takada, Y.; Fujii, T. *Chem. Pharm. Bull.* 1996, 44, 2025.
- 30) Moser, R. E.; Claggett, A. R.; Matthews, C. N. *Tetrahedron Lett.* 1968, No.13, 1605.
- 31) Ferris, J. P.; Orgel, L. E. *J. Am. Chem. Soc.* 1966, 88, 3829.
- 32) Taylor, E. C.; Zoltewicz, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1960, 82, 2656.
- 33) Borch, R. F.; Bernstein, M. D.; Durst, H. D. *J. Am. Chem. Soc.* 1971, 93, 2897.
- 34) Ochiai, M.; Morita, K. *Tetrahedron Lett.* 1967, 2349.
- 35) Graboyes, H.; Jaffe, G. E.; Pachter, I. J.; Rosenbloom, J. P.; Villani, A. J.; Wilson, J. W.; Weinstock, J. *J. Med. Chem.* 1968, 11, 568.
- 36) Dox, A. W. *Org. Synth.* 1941, 1, 5.
- 37) Rosowsky, A.; Modest, E. J. *J. Org. Chem.* 1966, 31, 2607.
- 38) Hirota, K.; Kitade, Y.; Kanbe, Y.; Maki, Y. *J. Org. Chem.* 1992, 57, 5268.
- 39) Lin, T.-S.; Cheng, J.-C.; Ishiguro, K.; Sartorelli, A. C. *J. Med. Chem.* 1985, 28, 1194.
- 40) Sen, A. K.; Ray, S. *Indian J. Chem.* 1976, 14B, 351.
- 41) Hemmi, H.; Kaisho, T.; Takeuchi, O.; Sato, S.; Sanjo, H.; Hoshino, K.; Horiuchi, T.; Tomizawa, H.; Takeda, K.; Akira, S. *Nature Immunol.* 2002, 3, 196.

* 本総説は岐阜薬科大学博士論文（甲第 89 号）の内容を中心にまとめたものである。