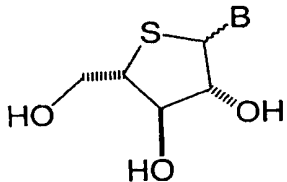
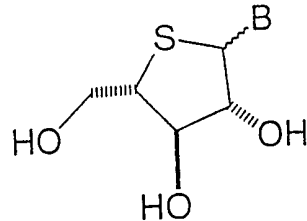




<p>(51) 国際特許分類6 C07H 19/06, 19/14, 19/16, 19/23, A61K 31/70</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/43690</p> <p>(43) 国際公開日 1999年9月2日(02.09.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00827</p> <p>(22) 国際出願日 1999年2月24日(24.02.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/43893 1998年2月25日(25.02.98)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 創薬技術研究所 (RATIONAL DRUG DESIGN LABORATORIES)[JP/JP] 〒960-1242 福島県福島市松川町美郷四丁目1番地の1 Fukushima, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 佐藤浩史(SATO, Hiroshi)[JP/JP] 〒288-0831 千葉県銚子市本城町3-149-1 Chiba, (JP) 吉村祐一(YOSHIMURA, Yuichi)[JP/JP] 〒314-0252 茨城県鹿島郡波崎町柳川2609-19 Ibaraki, (JP) 芦田則之(ASHIDA, Noriyuki)[JP/JP] 〒960-8253 福島県福島市泉字堀ノ内前18-12 Fukushima, (JP) 周藤健治(SUDO, Kenji)[JP/JP] 〒960-8062 福島県福島市清明町1-10 Fukushima, (JP)</p>	<p>横田智之(YOKOTA, Tomoyuki)[JP/JP] 〒960-0231 福島県福島市飯坂町平野字北下里20-1 Fukushima, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 佐藤一雄, 外(SATO, Kazuo et al.) 〒100-0005 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: L-4'-ARABINOFURANONUCLEOSIDE COMPOUND AND MEDICINE COMPOSITION COMPRISING THE SAME</p> <p>(54)発明の名称 L-4'-チオアラビノフラノヌクレオシド化合物およびそれを含む医薬組成物</p> <div style="text-align: center;">  <p>(1)</p> </div> <p>(57) Abstract A L-4'-thioarabinofuranonucleoside compound represented by formula (1) wherein B represents a nucleic acid base selected from among pyrimidine, purine, azapurine and deazapurine, each of which may be substituted with a halogen atom, an alkyl group, a haloalkyl group, an alkenyl group, a haloalkenyl group, an alkynyl group, an amino group, an alkylamino group, a hydroxyl group, a hydroxyamino group, an aminoxy group, an alkoxy group, a mercapto group, an alkylmercapto group, an aryl group, an aryloxy group or a cyano group, and a medicine composition comprising the compound as an active component, especially antihepatitis virus composition.</p>		

(57)要約

下式 [I] で表される L-4' -チオアラビノフラノヌクレオシド化合物および該化合物を活性成分として含有する医薬組成物、特に、抗肝炎ウイルス組成物に関する：



[I]

(式中、Bはピリミジン、プリン、アザプリンおよびデアザプリンからなる群より選択される核酸塩基を示し、それらはハロゲン原子、アルキル基、ハロアルキル基、アルケニル基、ハロアルケニル基、アルキニル基、アミノ基、アルキルアミノ基、水酸基、ヒドロキシアミノ基、アミノキシ基、アルコキシ基、メルカプト基、アルキルメルカプト基、アリール基、アリールオキシ基またはシアノ基によって置換されていてもよい。)

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SL シエラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BE ベルギー	GE ギルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	共和国	TR トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	マリ	TT トリニダード・トバゴ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴ	ID インドネシア	MN モンゴル	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MR モリタニア	US 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	VN ヴイエトナム
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	YU ユーゴスラビア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NO ノールウェー	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	
		RU ロシア	

明 細 書

L-4'-チオアラビノフラノヌクレオシド化合物および
それを含む医薬組成物

技 術 分 野

本発明は、L-4'-チオアラビノフラノヌクレオシド化合物および該化合物を活性成分として含有する医薬組成物、特に、抗肝炎ウィルス剤に関するものである。

背 景 技 術

最近、非天然型構造を有するL-ヌクレオシドの一部に抗ウィルス効果が認められ、その低い毒性と合わせて、注目を集めている。たとえば、2'-フルオロ-5-メチル- β -L-アラビノフラノシルウラシル (L-FMAU) は抗B型肝炎ウィルス (HBV) 活性を有し、しかも細胞毒性が低いことが報告されている (Antimicrob. Agents Chemother., (1995), 39(4), 979-981; Antimicrob. Agents Chemother., (1996), 40(2), 380-386)。

しかしながら、非天然型構造のL-ヌクレオシドの場合にはターゲットウィルス及びその活性を予想することは天然型の化合物以上に困難である。

たとえば、Antiviral Chemistry & Chemotherapy(1991), 2(2), 83-92 には、AZTの誘導体として抗HIV活性を期待して合成した3'-置換チミジンの α -L-ヌクレオシド誘導体が、顕著な抗ウィルス活性を示さないことが報告されている。

また、Antiviral Chemistry & Chemotherapy(1995), 6(3), 138-142 には、 α -L-アラビノフラノシルシトシン、 α -L-キシロフラノシルシトシンおよび

α -L-FMAUの α -L-アノマーに若干の抗HCMV（ヒトサイトメガロウイルス）活性が確認されたものの、上記以外の α -L-アノマーおよび上記化合物の β -L-アノマーには抗HCMV活性は確認されていない。

さらに、特表平8-504753号公報では、2', 3'-ジデヒドロ-2', 3'-ジデオキシ-4'-チオ- β -L-シチジンおよび2', 3'-ジデヒドロ-2', 3'-ジデオキシ-5-フルオロ-4'-チオ- β -L-シチジンの β -L-アノマーのみ抗HIV活性および抗HBV活性が報告されている。

さらにまた、J. Med. Chem., (1994), 37(6), 798-803 には、2', 3'-ジデオキシ-L-シチジンおよび2', 3'-ジデオキシ-5-フルオロ-L-シチジンの抗HIV活性および抗HBV活性において、 α -アノマーと β -アノマーでそれらの活性が異なることが報告されている。

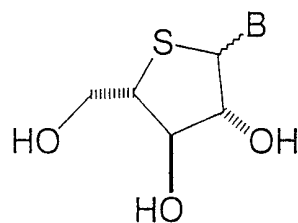
このように非天然型構造のL-ヌクレオシドの場合、天然型のヌクレオシドの抗ウイルス活性は何等参考にすることができず、また、合成した化合物が α -L-アノマーか β -L-アノマーかによってもその活性は大きく変化する。

このような状況下で、本発明者らは、抗肝炎ウイルス活性を有する化合物を見出すべく、種々の化合物をスクリーニングした結果、L-4'-チオアラビノフラノヌクレオシド化合物が選択性の一段と高い抗B型肝炎ウイルス活性を有することを見出し、本発明を完成させた。L-アラビノフラノヌクレオシド化合物に関しては種々のRNAおよびDNAウイルス（肝炎ウイルスを除く）に対して有意な抗ウイルス活性を示さないことが報告（NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, 10(6), 1345-1376(1991))されていただけに、全く意外な結果であった。

発明の開示

上記の知見に基づく本発明は、下記式 [I] で表されるL-4'-チオアラビノフラノヌクレオシド化合物および該化合物を活性成分として含有する医薬組成

物、特に、抗肝炎ウイルス組成物を提供するものである。



[I]

(式中、Bはピリミジン、プリン、アザプリンおよびデアザプリンからなる群より選択される核酸塩基を示し、それらはハロゲン原子、アルキル基、ハロアルキル基、アルケニル基、ハロアルケニル基、アルキニル基、アミノ基、アルキルアミノ基、水酸基、ヒドロキシアミノ基、アミノキシ基、アルコキシ基、メルカプト基、アルキルメルカプト基、アリール基、アリールオキシ基またはシアノ基によって置換されていてもよい。)

発明を実施するための最良の形態

(1) L-4' -チオアラビノフラノヌクレオシド化合物

本発明のL-4' -チオアラビノフラノヌクレオシド化合物は上記式 [I] で表されるL-アラビノフラノヌクレオシド化合物である。

式中、Bで表される塩基としてはピリミジン、プリン、アザプリンおよびデアザプリンからなる群より選択される核酸塩基を示し、それらはハロゲン原子、アルキル基、ハロアルキル基、アルケニル基、ハロアルケニル基、アルキニル基、アミノ基、アルキルアミノ基、水酸基、ヒドロキシアミノ基、アミノキシ基、アルコキシ基、メルカプト基、アルキルメルカプト基、アリール基、アリールオキ

シ基またはシアノ基などの置換基を有していても構わない。また、そのような置換基の位置および数は特に制限されるものではない。

置換基としてのハロゲン原子としては、塩素、フッ素、ヨウ素、臭素が例示される。アルキル基としては、メチル、エチルなどの炭素数1～7の低級アルキル基が例示される。ハロアルキル基としては、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、プロモメチル、プロモエチルなどの炭素数1～7のアルキルを有するハロアルキル基が例示される。アルケニル基としては、ビニル、アリルなどの炭素数2～7のアルケニル基が例示される。ハロアルケニル基としては、プロモビニル、クロロビニルなどの炭素数2～7のアルケニル基を有するハロアルケニル基が例示される。アルキニル基としては、エチニル、プロピニルなどの炭素数2～7のアルキニル基が例示される。

アルキルアミノ基としては、メチルアミノ、エチルアミノなどの炭素数1～7のアルキル基を有するアルキルアミノ基が例示される。アルコキシ基としては、メトキシ、エトキシなどの炭素数1～7のアルコキシ基が例示される。アルキルメルカプト基としては、メチルメルカプト、エチルメルカプトなどの炭素数1～7のアルキル基を有するアルキルメルカプト基が例示される。アリール基としては、フェニル基；メチルフェニル、エチルフェニルなどの炭素数1～5のアルキルを有するアルキルフェニル基；メトキシフェニル、エトキシフェニルなどの炭素数1～5のアルコキシフェニル基；ジメチルアミノフェニル、ジエチルアミノフェニルなどの炭素数1～5のアルキルアミノを有するアルキルアミノフェニル基；クロロフェニル、プロモフェニルなどのハロゲノフェニル基などが例示される。

ピリミジン塩基を具体的に例示すれば、シトシン、ウラシル、5-フルオロシトシン、5-フルオロウラシル、5-クロロシトシン、5-クロロウラシル、5-プロモシトシン、5-プロモウラシル、5-ヨードシトシン、5-ヨードウラ

シル、5-メチルシトシン、5-メチルウラシル（チミン）、5-エチルシトシン、5-エチルウラシル、5-フルオロメチルシトシン、5-フルオロメチルウラシル、5-トリフルオロシトシン、5-トリフルオロウラシル、5-ビニルウラシル、5-プロモビニルウラシル、5-クロロビニルウラシル、5-エチニルシトシン、5-エチニルウラシル、5-プロピニルウラシル、ピリミジン-2-オン、4-ヒドロキシアミノピリミジン-2-オン、4-アミノオキシピリミジン-2-オン、4-メトキシピリミジン-2-オン、4-アセトキシピリミジン-2-オン、5-フルオロピリミジン-2-オンなどが挙げられる。

プリン塩基を具体的に例示すれば、プリン、6-アミノプリン（アデニン）、6-ヒドロキシプリン、6-フルオロプリン、6-クロロプリン、6-メチルアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、6-トリフルオロメチルアミノプリン、6-ベンゾイルアミノプリン、6-アセチルアミノプリン、6-ヒドロキシアミノプリン、6-アミノオキシプリン、6-メトキシプリン、6-アセトキシプリン、6-ベンゾイルオキシプリン、6-メチルプリン、6-エチルプリン、6-トリフルオロメチルプリン、6-フェニルプリン、6-メルカプトプリン、6-メチルメルカプトプリン、6-アミノプリン-1-オキシド、6-ヒドロキシプリン-1-オキシド、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン（グアニン）、2-アミノプリン、2, 6-ジアミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、2-アミノ-6-ヨードプリン、2-アミノプリン、2-アミノ-6-メルカプトプリン、2-アミノ-6-メチルメルカプトプリン、2-アミノ-6-ヒドロキシアミノプリン、2-アミノ-6-メトキシプリン、2-アミノ-6-ベンゾイルオキシプリン、2-アミノ-6-アセトキシプリン、2-アミノ-6-メチルプリン、2-アミノ-6-サイクロプロピルアミノメチルプリン、2-アミノ-6-フェニルプリン、2-アミノ-8-プロモプリン、6-シアノプリン、6-アミノ-2-クロロプリン、6-アミノ-2-フルオロプリンなどが挙げられる。

アザプリン塩基およびデアザプリン塩基を具体的に例示すれば、6-アミノ-3-デアザプリン、6-アミノ-8-アザプリン、2-アミノ-6-ヒドロキシ-8-アザプリン、6-アミノ-7-デアザプリン、6-アミノ-1-デアザプリン、6-アミノ-2-アザプリンなどが挙げられる。

本発明のL-4'-チオアラビノフラノヌクレオシド化合物としては、 α -L-4'-チオアラビノフラノヌクレオシドあるいは β -L-4'-チオアラビノフラノヌクレオシドのいずれであってもよい。なお、前記式(I)中の波線(~~~~)は、 α -アノマー或いは β -アノマーのいずれであってもよいことを意味している。

そのような化合物を活性成分として本発明の組成物に用いる場合は、 α -L-4'-チオアラビノフラノピリミジンヌクレオシド、 α -L-4'-チオアラビノフラノプリンヌクレオシド、 β -L-4'-チオアラビノフラノプリンヌクレオシドが好ましく、特に好適なものとして α -L-4'-チオアラビノフラノピリミジンヌクレオシドを挙げることができる。

本発明で用いるL-4'-チオアラビノフラノヌクレオシド化合物は、塩、水和物または溶媒和物の形態であってもよい。そのような塩としては、無機酸(塩酸、硫酸、リン酸など)または有機酸(フマル酸、酒石酸、コハク酸など)との酸付加塩、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、またはアンモニウム塩など薬学的に許容される塩を例示することができる。

また、水和物または溶媒和物としては、本発明化合物またはその塩1分子に対し、0.1~3.0分子の水または溶媒が付着したものを例示することができる。

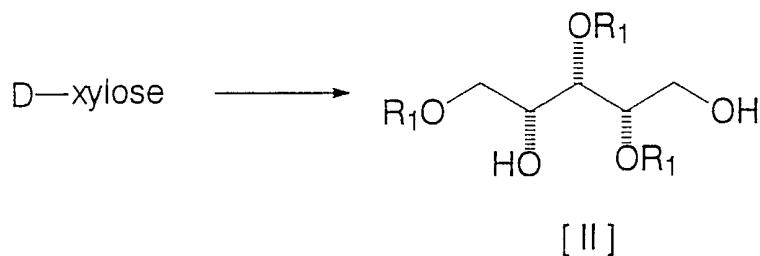
(2) L-4'-チオアラビノフラノヌクレオシド化合物の合成

本発明のL-4'-チオアラビノフラノヌクレオシド化合物は、以下に説明す

る4つの工程より合成することができる。

第1工程：

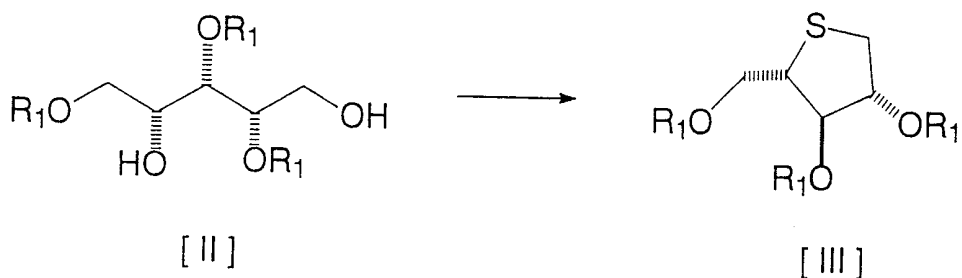
D-キシロースを、アルコール溶媒中、酸の存在下で1位をアルキル化した後、水酸基を保護し、次いで1位アルキル基の酸触媒による加水分解、引き続き還元剤による処理により式 [I I] で表される化合物を得る工程。



(式中、 R_1 はアルキル基を示す。)

第2工程：

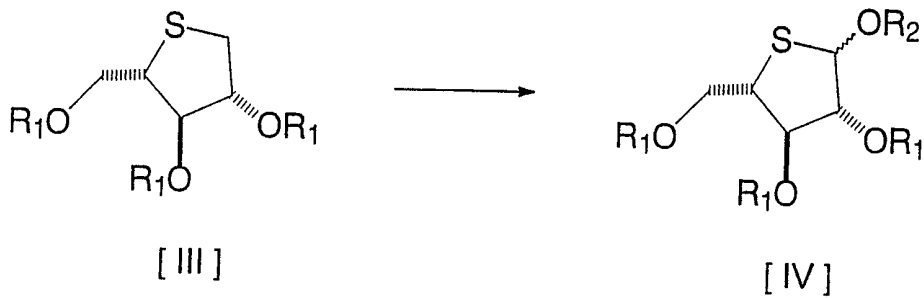
式 [I I] で表される化合物の水酸基をメシル化剤によりメシル化またはトシル化剤によりトシル化した後、硫化ナトリウムで処理して式 [I I I] で表される化合物を得る工程。



(式中、 R_1 は前記と同義。)

第3工程：

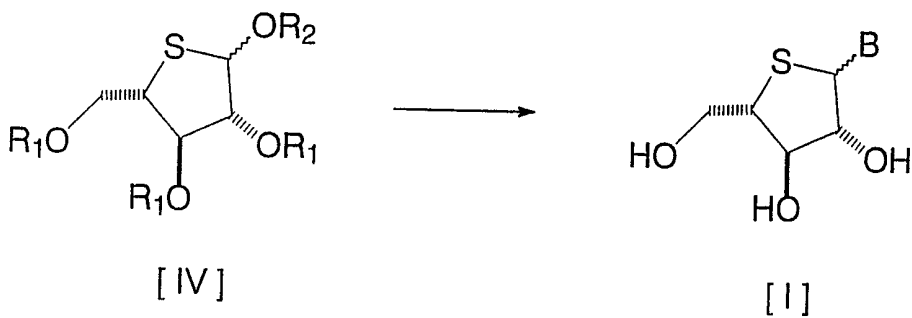
式 [III] で表される化合物を適当な酸化剤によりスルホキシド体に通じ、更に酸無水物で処理することでプンメラー (Pummerer) 転移を行ない、式 [IV] で表される化合物を得る工程。



(式中、 R_1 は、前記と同義。 R_2 はアシル基を示す。)

第4工程：

式 [IV] で表される化合物にグリコシル化反応により核酸塩基を導入し、更に糖部保護基を脱保護して式 [I] で表される化合物を得る工程。



(式中、B は前記と同義。)

以下、第1～第4工程をさらに詳しく説明する。

第1工程：

第1工程は、D-キシロースを、アルコール溶媒中、酸の存在下で1位をアルキル化した後、水酸基を保護し、次いで1位アルキル基の酸触媒による加水分解、引き続き還元剤による処理により式 [I I] で表される化合物を得る工程である。

1位のアルキル化と水酸基の保護については、公知の方法に従って行うことができる。即ち、1位のアルキル化は、D-キシロースを、メタノール、エタノール、イソプロパノールなどのアルコール溶媒中、p-トルエンスルホン酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、メタンスルホン酸などの有機酸もしくは塩酸、硫酸などの鉱酸の存在下 -20°C ～ 100°C で処理することにより行なうことができる。また、水酸基の保護は、THF、DMF、DMSOなどの単独溶媒中もしくは混合溶媒中、水素化ナトリウムなどの塩基の存在下、ベンジルクロリド、ベンジルブロミド、p-メトキシベンジルクロリドなどのアルキル化剤を、D-キシロース1モルに対して2～10モル、好ましくは3～6モル用い、 $0\sim 40^{\circ}\text{C}$ で反応させることにより実施することができる。

1位アルキル基の加水分解反応において用いる酸触媒としては、塩酸、硫酸、酢酸、トリフルオロ酢酸などを挙げるることができる。加水分解反応は、テトラヒドロフラン、ジオキサンなどの水溶性エーテル系の溶媒と酸水溶液との混合溶媒中、 $10\sim 100^{\circ}\text{C}$ で上記酸触媒を作用させることにより実施することができる。

還元反応において使用する還元剤としては、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素カルシウム、水素化ホウ素亜鉛、水素化アルミニウムリチウム、水素化ジイソブチルアルミニウムなどを挙げるることができる。還元反応は、メタノール、エタノールなどのアルコール系溶媒、もしくはエーテル、ジオキサン、THFなどのエーテル系溶媒中、D-キシロース1モルに対して1～20モル、好ましくは1～10モルの還元剤を用い、 $-100\sim 100^{\circ}\text{C}$ 、好

ましくは -80°C ~ 80°C で反応させることにより実施することができる。

このようにして調製した式 [I I] の化合物の単離は、通常の糖の分離精製手段を用いて行なえばよく、たとえば酢酸エチルと水で分配後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、*n*-ヘキサン-酢酸エチルなどの有機溶媒で溶出することにより分離精製できる。

第2工程：

第2工程は式 [I I] の化合物の水酸基をメシル化あるいはトシル化した後、硫化ナトリウムと処理して式 [I I I] で表される化合物を得る反応工程である。

メシル化およびトシル化は公知の方法に基づき行なうことができる。たとえば、ピリジン、トリエチルアミンなどの塩基の存在下、塩化メチレン、アセトニトリル、ジメチルホルムアミドなどの溶媒中、式 [I I] の化合物1モルに対して2~10モル、好ましくは2~4モルのメシル化剤（塩化メシルなど）もしくはトシル化剤を用い、 $0\sim 100^{\circ}\text{C}$ で反応させることにより実施することができる。

硫化ナトリウムとの処理は、ジメチルホルムアミドあるいはジメチルスルホキシド中、必要に応じてアルゴン、窒素などの不活性ガス雰囲気下、式 [I I] の化合物1モルに対して1~20モルの硫化ナトリウムを用い、室温~ 150°C の反応温度で反応させることにより実施できる。

このようにして調製した式 [I I I] の化合物の単離は、通常の糖の分離精製手段を用いて行なえばよく、たとえば酢酸エチルと水で分配後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、*n*-ヘキサン-酢酸エチルなどの有機溶媒で溶出することにより分離精製することができる。

第3工程：

第3工程は、式 [I I I] の化合物を酸化剤によりスルホキッド体に導き、更に酸無水物で処理することでプリンター転移を行ない、式 [I V] で表される化合物を得る工程である。

式 [I I I] の化合物のスルホキッドへの誘導は常法に従って行なえばよく、たとえば、塩化メチレン中、アルゴンまたは窒素などの不活性ガス気流下、 $-100\sim 0^{\circ}\text{C}$ においてm-クロロ過安息香酸と処理するか、あるいはメタノールなどのアルコール系の溶媒中、メタ過ヨウ素酸ナトリウムと処理することにより行なうことができる。

また、プリンター転移反応も同様に常法に従って行なえばよく、たとえば、無水酢酸などの酸無水物中、 60°C ～還流温度で処理することにより式 [I V] の化合物を得ることができる。

このようにして調製した式 [I V] の化合物の単離は、通常の糖の分離精製手段を用いて行なえばよく、たとえば中和後、有機溶媒を留去した後、クロロホルムにより水層より抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離精製することができる。

第4工程：

第4工程は、式 [I V] の化合物にグリコシル化反応により核酸塩基を導入し、更に糖部保護基を脱保護して式 [I] で表される化合物を得る工程である。

グリコシル化反応は、アルゴンまたは窒素などの不活性ガス気流下、塩化メチレン、クロロホルム、ジクロロエタン、アセトニトリル、ジメチルホルムアミドなどの溶媒中、式 [I V] の化合物1モルに対して必要によりシリル化またはアシル化した核酸塩基1～10モルを用い、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート、四塩化すず、四塩化チタン、塩化亜鉛、三フッ化ホウ素などのル

イス酸0.1~10モルの存在下、-50~100℃で処理することにより実施することができる。

糖部保護基の脱保護は、使用した保護基に応じて常法により行なうことができる。たとえば、ベンジル系保護基の場合、塩化メチレン中、アルゴンまたは窒素などの不活性ガス気流下、-100℃~室温で三塩化ホウ素あるいは三臭化ホウ素で処理することによりベンジル系保護基を脱保護することができる。

このようにして得られたL-4'-チオアラビノフラノヌクレオシド化合物は、一般のヌクレオシドの単離精製に使用されている方法を適宜組合せて分離精製することができる。たとえば、溶媒留去後、シリカゲルカラム、逆層カラムクロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、活性炭などの吸着カラムクロマトグラフィーなどにより精製し、エタノール等の適当な溶媒から結晶化すればよく、必要に応じて塩型として得ることもできる。

(3) 本発明の組成物

L-4'-チオアラビノフラノヌクレオシド化合物の投与量は、患者の年齢及び体重、疾病、患者の重篤度、薬物による忍容性、投与方法などにより異なり、これらの条件を総合した上で適宜決定されるものであるが、通常1日当たり0.001~1000mg/kg体重、好ましくは0.01~100mg/kg体重の範囲内から選ばれ、一回または複数回に分けて投与される。

投与方法は、経口、非経口、経腸、局所投与などのいずれの経路によっても投与することができる。

L-4'-チオアラビノフラノヌクレオシド化合物の製剤化に際しては、通常使用される製剤用担体、賦形剤、その他の添加剤を用い、組成物とする。担体としては、乳糖、カオリン、ショ糖、結晶セルロース、コーンスターチ、タルク、寒天、ペクチン、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、レシチン、塩化ナ

トリウムなどの固体状担体、グリセリン、落花生油、ポリビニルピロリドン、オリーブ油、エタノール、ベンジルアルコール、プロピレングリコール、水などの液状担体を例示することができる。

剤型としては任意の形態を採ることができ、たとえば固体状担体を使用する場合には錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル化剤、座剤、トローチ剤などを、液状担体を使用する場合にはシロップ、乳液、軟ゼラチンカプセル、クリーム、ゲル、ペースト、スプレー、注射剤などをそれぞれ例示することができる。

実施例

以下、本発明を下記の例でもって、より具体的に説明するが、本発明はこれらの例によって何等限定されるものではない。

合成例1：L-4'-チオアラビノフラノシルシトシン（式 [I]、B=シトシン）の合成

(1) 2, 3, 5-トリ-O-ベンジル-D-キシリトール（式 [II]、R₁=ベンジル）の合成

D-キシロース6.0gをメタノール160mlに懸濁し、トシル酸740mgを加えて一晩反応させた。反応後、トリエチルアミン1mlを加えて反応を停止し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、1-メチル体（6.33g, 96%）を得た。

1-メチル体6.33gをDMF200mlに溶かし、アルゴン気流下、0℃で60%ナトリウムヒドライド5.4gを加え、更にベンジルクロライド17.7mlを滴下した。滴下後、室温に戻して一晩反応させた。反応後、氷水に反応液を加えて反応を停止した。エーテルを加えて分配し、有機層を水で3回洗った後、飽和食塩水で洗った。有機層を芒硝で乾燥した後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムにより精製し、トリベンジル体（10.2g, 61%）を得た。

トリベンジル体9. 16 gをTHF 75 mlに溶かし、6 N塩酸150 mlを加えて室温で3日間反応させた。反応後、炭酸水素ナトリウムを加えて中和し、有機層を分液して得た。得られた有機層の溶媒を留去し、残渣を酢酸エチルで溶かし、水3回と飽和食塩水で洗った。有機層を芒硝乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をTHF 120 mlに溶かし、水素化ホウ素リチウム460 mgを加えて2時間反応させた。酢酸で中和した後、溶媒を留去した。残渣を酢酸エチルで溶かし、有機層を水3回と飽和食塩水で洗って芒硝で乾燥した。溶媒を留去した後、シリカゲルカラムで精製し、題記化合物(5.84 g, 66%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 7.36–7.22 (15H, m), 4.68–4.43 (6H, m), 4.07–4.03 (1H, m), 3.83–3.75 (2H, m), 3.72 (1H, dd, $J=2.0, 5.9\text{ Hz}$), 3.67 (1H, dt, $J=3.9, 5.9\text{ Hz}$), 3.51 (1H, dd, $J=6.4, 9.3\text{ Hz}$), 3.42 (1H, dd, $J=6.4, 9.3\text{ Hz}$), 2.81 (1H, brd, D_2O exchangeable, $J=5.4\text{ Hz}$), 2.57 (1H, br, D_2O exchangeable)

FAB-MS m/z : 423 ($\text{M}^+ + \text{H}$)

元素分析 ($\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ として)

計算値: C, 70.89; H, 7.32

分析値: C, 71.22; H, 7.01

$[\alpha]_{\text{D}}$ = -12.7 (c 1.1, CHCl_3)

(2) 1, 4-アンヒドロ-2, 3, 5-トリ- O -ベンジル-4-チオ-D-アラビトール (式 [III]、 R_1 =ベンジル) の合成

2, 3, 5-トリ- O -ベンジル-D-キシリトール (式 [II]、 R_1 =ベ

ンジル) 5. 22 gをピリジン60 mlに溶かし、アルゴン気流下、0°Cでメタン
スルホニルクロリド2. 88 mlを滴下した。滴下後、室温に戻して1. 5時
間攪拌した。氷水を加えて反応を停止し、溶媒を留去した。残渣を酢酸エチルに
溶かし、水で3回と飽和食塩水で洗って有機層を乾燥させた。溶媒を留去し、残
渣をDMF 100 mlに溶かし、硫化ナトリウム9水和物8. 93 gを加えて1
00°Cで3時間反応させた。反応後、室温に戻し、溶媒を留去した後、酢酸エチ
ルに溶かし、水で3回と飽和食塩水で洗って、有機層を芒硝で乾燥した。溶媒を
留去した後、シリカゲルカラムで精製し、題記化合物(4. 38 g, 84%)を
得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 7. 35–7. 27 (15H, m), 4. 61
(2H, s), 4. 55–4. 46 (4H, m), 4. 19 (1H, q, $J=4.$
4 Hz), 4. 11 (1H, t, $J=3. 9$ Hz), 3. 69 (1H, dd, J
 $=7. 8, 8. 8$ Hz), 3. 56 (1H, ddd, $J=3. 9, 6. 4, 7.$
8 Hz), 3. 50 (1H, dd, $J=5. 9, 8. 8$ Hz), 3. 08 (1H,
dd, $J=4. 9, 11. 2$ Hz), 2. 90 (1H, dd, $J=4. 4, 11.$
2 Hz)

FAB-MS m/z : 421 ($\text{M}^+ + \text{H}$)

元素分析 ($\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_3$ Sとして)

理論値: C, 74. 25; H, 6. 71

分析値: C, 74. 17; H, 6. 75

$[\alpha]_D = -0. 38$ (c 2. 5, CHCl_3)

(3) 1-Oアセチル-2, 3, 5-トリ-O-ベンジル-4-チオ-D-アラ
ビノース (式 [IV]、 $\text{R}_1 = \text{ベンジル}$ 、 $\text{R}_2 = \text{アセチル}$) の合成

1, 4-アンヒドロ-2, 3, 5-トリ-O-ベンジル-4-チオ-D-アラビトール (式 [I I I]、 R_1 = ベンジル) 3.43 g を塩化メチレン 40 ml に溶かし、アルゴン気流下、 -78°C で m-クロロ過安息香酸 1.76 g を含んだ塩化メチレン溶液 (40 ml) を滴下した。滴下後、 -78°C で 30 分間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加えて反応を停止し、クロロホルムで 3 回抽出した。有機層を 10% チオ硫酸ナトリウム溶液、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で分配した後、芒硝で乾燥した。溶媒を留去し、残渣を無水酢酸 40 ml に溶解し、3 時間、 100°C に保った。溶媒を留去した後、トルエンで 3 回共沸した。残渣を酢酸エチルに溶かし、飽和炭酸ナトリウム溶液で 3 回と飽和食塩水で洗って有機層を乾燥させた。溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムで精製し、題記化合物 (1.94 g, 50%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 7.35–7.24 (15H, m), 6.07 (0.7H, d, $J=3.9\text{ Hz}$), 5.98 (0.3H, d, $J=2.9\text{ Hz}$), 4.83–4.48 (6H, m), 4.26 (0.3H, dd, $J=2.9, 5.4\text{ Hz}$), 4.18 (0.7H, dd, $J=4.4, 8.8\text{ Hz}$), 4.12 (0.7H, dd, $J=6.4, 8.8\text{ Hz}$), 4.03 (0.3H, dd, $J=5.4, 6.4\text{ Hz}$), 3.77 (0.3H, q, $J=6.4\text{ Hz}$), 3.71 (0.3H, dd, $J=5.9, 9.3\text{ Hz}$), 3.68 (0.7H, dd, $J=5.9, 9.3\text{ Hz}$), 3.51 (0.7H, dd, $J=6.8, 9.3\text{ Hz}$), 3.46 (0.3H, dd, $J=6.4, 9.3\text{ Hz}$), 3.40 (0.7H, q, $J=6.4\text{ Hz}$), 2.06 (3H, s)

FAB-MS m/z : 419 ($\text{M}^+ - \text{OAc}$)

元素分析 ($\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_5 \cdot 0.25\text{H}_2\text{O}$ として)

理論値: C, 69.61; H, 6.36

分析値：C, 69.42; H, 6.26

$[\alpha]_D = +29.8$ (c 2.0, CHCl_3)

(4) L-4'-チオアラビノフラノシルシトシン (式 [I]、B=シトシン)

の合成

N4-アセチルシトシン459mgをアセトニトリル10mlに溶解し、BSA860 μ lを加えアルゴン気流下、5.5時間還流した。減圧下溶媒を留去後、残渣をアセトニトリル5mlに溶解し、1-Oアセチル-2,3,5-トリ-O-ベンジル-4-チオ-D-アラビノース (式 [IV]、 R_1 =ベンジル、 R_2 =アセチル) 479mgを加えた。この溶液にTMSトリフレート290 μ lを加え、室温で1.5時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加えて反応を停止し、不溶物をセライトろ過した。ろ液をクロロホルムで3回抽出し、有機層を乾燥した。濃縮した後、シリカゲルカラムにより精製を行ない、ヌクレオシド化合物445mg (78%)を得た。

ヌクレオシド化合物417mgを塩化メチレン10mlに溶解し、-78 $^{\circ}$ Cに冷却した。この溶液に1M三塩化ホウ素塩化メチレン溶液4.38mlを滴下し、-78 $^{\circ}$ Cで30分間攪拌した。-20 $^{\circ}$ Cに昇温し、更に3時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加えて反応を停止した。溶媒を留去し、残渣にメタノール5ml、濃アンモニア水5mlを加え、室温で一晩攪拌した。溶媒を留去し、残渣をエタノールで3回共沸し、シリカゲルカラムにより精製した。得られたアノマー混合物をODSカラムクロマトにより精製並びにアノマーの分離を行ない、題記化合物の α -アノマー (64mg, 34%) 及び β -アノマー (36mg, 19%)を得た。

β -アノマー：

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 7.96 (1H, d, $J=7.8\text{ Hz}$), 7.10, 7.01 (total 2H, brs, D_2O exchangeable), 6.33 (1H, d, $J=4.9\text{ Hz}$), 5.69 (1H, d, $J=7.8\text{ Hz}$), 5.56 (1H, d, $J=4.9\text{ Hz}$, D_2O exchangeable), 5.35 (1H, d, $J=3.9\text{ Hz}$, D_2O exchangeable), 5.05 (1H, t, $J=5.4\text{ Hz}$, D_2O exchangeable), 3.98–3.92 (2H, m), 3.78 (1H, dt, $J=5.4, 11.2\text{ Hz}$), 3.58 (1H, dt, $J=5.9, 11.2\text{ Hz}$), 3.18–3.13 (1H, m)

FAB MS m/z : 260 ($\text{M}+\text{H}^+$)

元素分析 ($\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ として)

理論値: C, 40.29; H, 5.26; N, 15.66

分析値: C, 40.22; H, 5.06; N, 15.38

α -アノマー:

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 7.89 (1H, d, $J=7.3\text{ Hz}$), 7.14, 7.08 (total 2H, brs, D_2O exchangeable), 5.85 (1H, d, $J=7.3\text{ Hz}$), 5.76 (1H, d, $J=7.3\text{ Hz}$), 5.57 (1H, d, $J=5.9\text{ Hz}$, D_2O exchangeable), 5.44 (1H, d, $J=4.9\text{ Hz}$, D_2O exchangeable), 4.87 (1H, t, $J=5.4\text{ Hz}$, D_2O exchangeable), 3.93 (1H, q, $J=6.8\text{ Hz}$), 3.82 (1H, dt, $J=4.4, 10.7\text{ Hz}$), 3.64 (1H, dt, $J=4.9, 7.3\text{ Hz}$), 3.45 (1H, dt, $J=3.9, 7.8\text{ Hz}$), 3.36 (1H, ddd, $J=5.9, 8.3, 10.7\text{ Hz}$)

FAB MS m/z : 260 ($\text{M}+\text{H}^+$)

元素分析 ($C_9 H_{13} N_3 O_4 S \cdot 0.25 H_2 O$ として)

理論値: C, 40.98; H, 5.16; N, 15.93

分析値: C, 41.01; H, 5.04; N, 15.82

合成例2: L-4'-チオアラビノフラノシルチミン (式 [I]、B=チミン)

の合成

N4-アセチルシトシンの代わりにチミンを用い、上記と同様の方法により題記化合物 α -アノマー (64mg, 34%) 及び β -アノマー (56mg, 19%) を得た。

β -アノマー:

1H -NMR (DMSO- d_6) δ 11.25 (1H, s, D_2O exchangeable), 7.93 (1H, d, $J=1.0$ Hz), 6.07 (1H, d, $J=5.9$ Hz), 5.69 (1H, d, $J=5.4$ Hz, D_2O exchangeable), 5.40 (1H, d, $J=4.9$ Hz, D_2O exchangeable), 5.21 (1H, t, $J=5.1$ Hz, D_2O exchangeable), 4.00 (1H, q, $J=5.9$ Hz), 3.94 (1H, q, $J=5.4$ Hz), 3.75 (1H, dt, $J=4.9, 11.2$ Hz), 3.66 (1H, dt, $J=5.9, 11.2$ Hz), 3.13 (1H, q, $J=5.4$ Hz), 1.77 (3H, s)

FAB MS m/z : 275 ($M+H^+$)

元素分析 ($C_{10} H_{14} N_2 O_5 S$ として)

理論値: C, 43.79; H, 5.14; N, 10.21

分析値: C, 43.64; H, 5.31; N, 10.20

α -アノマー:

1H -NMR (DMSO- d_6) δ 11.27 (1H, s, D_2O exchangeable)

ngeable), 7.84 (1H, s), 5.74 (1H, d, J=7.8 Hz), 5.67 (1H, d, J=5.7 Hz, D₂O exchangeable), 5.52 (1H, d, J=4.9 Hz, D₂O exchangeable), 4.89 (1H, t, J=5.1 Hz, D₂O exchangeable), 3.99 (1H, dt, J=5.7, 7.8 Hz), 3.87-3.82 (1H, m), 3.60 (1H, dt, J=4.9, 8.3 Hz), 3.52 (1H, dt, J=3.4, 8.3 Hz), 3.40-3.35 (1H, m), 1.81 (3H, s)

FAB MS m/z : 275 (M+H⁺)

元素分析 (C₁₀H₁₄N₂O₅Sとして)

理論値 : C, 43.79; H, 5.14; N, 10.21

分析値 : C, 43.50; H, 5.10; N, 9.82

合成例3 : L-4'-チオアラビノフラノシルアデニン (式 [I]、B=アデニン) の合成

N4-アセチルシトシンの代わりにアデニンを用い、上記と同様の方法により題記化合物α-アノマー (16mg) 及びβ-アノマー (106mg, crude) を得た。

β-アノマー :

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 8.36 (1H, s), 8.13 (1H, s), 7.22 (2H, br, D₂O exchangeable), 6.06 (1H, d, J=4.9 Hz), 5.77 (1H, d, J=4.9 Hz, D₂O exchangeable), 5.58 (1H, d, J=4.4 Hz, D₂O exchangeable), 5.24 (1H, t, J=5.4 Hz, D₂O e

xchangeable), 4.16-4.10 (2H, m), 3.85 (1H, dt, $J=4.9, 10.7$ Hz), 3.73 (1H, dt, $J=5.9, 10.7$ Hz), 3.28-3.24 (1H, m)

FAB MS m/z : 284 ($M+H^+$)

α -アノマー:

1 H-NMR (DMSO- d_6) δ 8.40 (1H, s), 8.15 (1H, s), 7.24 (2H, br, D_2O exchangeable), 5.80 (1H, br, D_2O exchangeable), 5.73 (1H, d, $J=7.3$ Hz), 5.63 (1H, br, D_2O exchangeable), 4.93 (1H, br, D_2O exchangeable), 4.56 (1H, t, $J=7.3$ Hz), 3.89 (1H, dd, $J=3.4, 10.7$ Hz), 3.74 (1H, t, $J=7.8$ Hz), 3.66 (1H, dt, $J=3.9, 7.8$ Hz), 3.43 (1H, dd, $J=7.8, 10.7$ Hz)

FAB MS m/z : 284 ($M+H^+$)

元素分析 ($C_{10}H_{13}N_5O_3 \cdot 0.5H_2O$)

理論値: C, 41.09; H, 4.83; N, 23.96

分析値: C, 41.41; H, 4.56; N, 23.64

合成例4: 2, 6-ジアミノ-(L-4'-チオアラビノフラノシル)プリン
(式 [I]、B=2, 6-ジアミノプリン) の合成

N4-アセチルシトシンの代わりに2, 6-ジアミノプリンを用い、上記と同様の方法により題記化合物 α -アノマー (82 mg, 23%) 及び β -アノマー (44 mg, 12%) を得た。

β -アノマー:

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 7.91 (1H, s), 6.64 (2H, br, D_2O exchangeable), 5.93 (1H, d, $J=5.4\text{Hz}$), 5.76 (2H, br, D_2O exchangeable), 5.70 (1H, d, $J=5.4\text{Hz}$, D_2O exchangeable), 5.45 (1H, d, $J=4.9\text{Hz}$, D_2O exchangeable), 5.12 (1H, t, $J=5.4\text{Hz}$, D_2O exchangeable), 4.11 (1H, q, $J=5.4\text{Hz}$), 4.02 (1H, q, $J=5.9\text{Hz}$), 3.83 (1H, dt, $J=5.4, 10.7\text{Hz}$), 3.66 (1H, dt, $J=5.9, 10.7\text{Hz}$), 3.23-3.19 (1H, m)

FAB MS m/z : 299 ($\text{M}+\text{H}^+$)

α -アノマー:

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 7.99 (1H, s), 6.66 (2H, br, D_2O exchangeable), 5.76 (2H, br, D_2O exchangeable), 5.75 (1H, d, $J=5.9\text{Hz}$, D_2O exchangeable), 5.57 (1H, d, $J=5.4\text{Hz}$, D_2O exchangeable), 5.55 (1H, d, $J=7.3\text{Hz}$), 4.89 (1H, t, $J=5.4\text{Hz}$, D_2O exchangeable), 4.42 (1H, q, $J=7.3\text{Hz}$), 3.85 (1H, dt, $J=4.4, 10.7\text{Hz}$), 3.69 (1H, dt, $J=4.9, 7.8\text{Hz}$), 3.57 (1H, dt, $J=3.9, 7.8\text{Hz}$), 3.40 (1H, ddd, $J=5.9, 7.8, 10.7\text{Hz}$)

FAB MS m/z : 299 ($\text{M}+\text{H}^+$)

試験例

1) インビトロ抗B型肝炎ウイルス (HBV) 活性 :

(1) 細胞

HBV遺伝子が導入されたヒト肝ガン細胞株、HB611 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 444-448(1987)) を用い、周藤らの方法 (Microbiol. Immunol., 40(2), 153-159(1996)) に若干の変更を加え、薬剤の抗HBV活性を測定した。すなわち、HB611細胞を10%牛胎児血清、100IU/mlペニシリンG、100 μ g/mlストレプトマイシンおよび1mg/mlゲネチシンを含むダルベッコ変法MEMに懸濁し、96穴マルチウエルプレートに1ウエル当たり20000個播種した。炭酸ガスインキュベーター内で37 $^{\circ}$ C、3日間培養し、細胞を集密的 (confluent) に生育させた後、試験に供した。試験薬剤を通常100 μ g/mlの濃度から10倍段階希釈で4段階、培地で希釈して細胞に加え、培養した。薬剤を含む培地で2日後及び4日後に培地交換を行なった。対照とする細胞は、薬剤を含まない培地で培養した。7日後に各ウエルから培養上清を回収し、別の96穴マルチウエルプレートに移し、-80 $^{\circ}$ Cに保存した。

(2) 培養上清からのHBV DNAの精製

丸底の96穴マルチウエルプレート (コーニング社製) の各ウエルに等張リン酸緩衝液 (PBS) で10 μ g/mlに希釈した抗HBV表面抗原マウス抗体 (Zymed Laboratories 製) 50 μ lを加え、4 $^{\circ}$ Cで約16時間放置した。各ウエルの液層を捨て、0.1%の牛血清アルブミン (BSA) を含むPBS100 μ lを加えて37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした後、使用直前まで4 $^{\circ}$ Cで保存した。各ウエルを0.01%のTween 20を含むPBS (PBS-0.01% Tween 20) で3回洗浄し、0.035%のTween 20を含むPBSを10 μ lおよび回収保存しておいた培養上清25 μ lを加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置し、培

養上清中のHBV粒子をプレートに吸着させた。各ウエルをPBS-0.01% Tween 20で3回及びPBSで2回洗浄した後、0.09NのNaOHと0.01%のNonidet P-40を含む溶液25 μ lを加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし、HBV粒子からHBVのDNAを溶出させた。0.09NのHClを含む100mMトリス-塩酸緩衝液25 μ lを加えて中和し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に供した。

(3) PCRでの増幅

PCRは市販のキット、TaKaRa Taq (宝酒造製)と、Gene Amp system 9600 (Perkin Elmer製)とを用いた。プライマーはHBVのS遺伝子内の372番から483番が増幅されるように設定したものをを用いた。すなわち、5'-末端にビオチンが結合した(+)372-401のプライマー(5'-ビオチン-TCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTAT)および(-)460-483のプライマー(5'-TAGAGGACAAACGGGCAACATACC)とを用いた。抽出したHBVのDNA溶液5 μ lにPCR用混合溶液45 μ lを加え(最終濃度:10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM of each dNTP、6.25pmol of each プライマー、1.25U AmpliTaq DNAポリメラーゼ)、PCRを行なった。94 $^{\circ}$ C、5分インキュベーションした後、94 $^{\circ}$ C、30秒-55 $^{\circ}$ C、15秒-72 $^{\circ}$ C、1分を30サイクル行ない、最後に72 $^{\circ}$ Cで5分間反応させ、4 $^{\circ}$ Cで保存した。

(4) ハイブリダイゼーションおよびHBV DNAの検出

平底の96穴マルチウエルプレート(コーニング社製)の各ウエルに50mM クエン酸緩衝液(pH9.6)で10 μ g/mlに希釈したストレプトアビジン

25

の溶液を75 μ lずつ加え、4°Cで約16時間放置した。各ウエルの液層を捨て、0.1%BSAを含むPBS 100 μ lを加えて37°Cで2時間インキュベーションした後、使用直前まで4°Cに保存した。0.05%Tween 20を含む0.1XSSPE溶液(0.1XSSPE-0.05% Tween 20)で2回洗浄した後、PCR産物10 μ lを加えて室温で1時間インキュベーションし、アビジンでコートされたプレートに、5'末端にビオチンを有する増幅されたDNAを吸着させた。0.1NのNaOHと0.15MのNaClを含む溶液を10 μ l加えて5分間放置し、吸着したDNAを変性させた。

0.1XSSPE-0.05%Tween 20で3回洗浄後、ジゴキシゲニンで標識された1 pmolのプロープ((-)411-437:5'-digoxigenin-AAGAAGATGAGGCATAGCAGCAGGATG)を含む40 μ lのハイブリダイゼーション溶液(4X SSPE, 2.5X Denhardt's solution, 100 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.1), 0.25 mg/ml heat-denatured salmon sperm DNA, 0.5 mg/ml poly (A), 0.05% Tween 20)を加え、42°Cで2時間インキュベーションした。0.1XSSPE-0.05% Tween 20で3回およびPBSで2回洗浄した後、2000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合抗ジゴキシゲニン抗体(Boehringer Mannheim GmbH製)を100 μ l加え、室温で1時間インキュベーションした。0.1XSSPE-0.05% Tween 20で4回洗浄した後、100 mMのNaClと50 mMのMgCl₂とを含む100 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 9.5)で1 mg/mlに調整した4-ニトロフェニルフォスフェイト溶液100 μ lを加え、37°Cで発色するまで5から15分インキュベーションをした。各ウエルの405 nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定して被験薬剤の抗HBV活性を算出した。薬剤を添加していない対照の吸光度を、50%減少させる被験薬剤の濃度を、50%有効濃度(EC

50) とした。

2) 細胞毒性測定法 :

被験薬剤の細胞毒性はMTT法で測定した。培養上清を回収した後のHB611細胞に新しい培地100 μ lと7.5mg/mlのMTT溶液20 μ lとを加えて炭酸ガスインキュベーター内で37 $^{\circ}$ C、3時間培養した。10% (v/v) Triton X-100を含む酸性のイソプロパノール (イソプロパノール500mlに対し、濃塩酸を2ml加えたもの) 溶液を100 μ l加えてフォルマザンを溶出した。完全にフォルマザンが溶解した後マイクロプレートリーダーで540および690nmの吸光度を測定し、被験薬剤の細胞毒性を算出した。薬剤を添加していない対照の吸光度を、50%減少させる被験薬剤の濃度を、50%細胞毒性濃度 (CC₅₀) とした。

3) 試験結果 :

試験結果を下記表に示す。

化 合 物	抗HBV活性		細胞毒性	
	EC ₅₀ : μ g/ml	CC ₅₀ : μ g/ml	EC ₅₀ : μ g/ml	CC ₅₀ : μ g/ml
α -L-4'-チオアラビノフラノシルシトシン	15.3	>100		
α -L-4'-チオアラビノフラノシルチミン	6.80	>100		
2,6-ジアミノ-(α -L-4'-チオアラビノ フラノシル) プリン	19.8	>100		
2,6-ジアミノ-(β -L-4'-チオアラビノ フラノシル) プリン	4.37	>100		
α -L-4'-チオアラビノフラノシルアデニン	5.15	>100		

28

製剤例 1 : 錠剤

本発明化合物	30.0mg
微粉末セルロース	25.0mg
乳糖	39.5mg
スターチ	40.0mg
タルク	5.0mg
ステアリン酸マグネシム	0.5mg

上記組成から常法によって錠剤を調製する。

製剤例 2 : カプセル剤

本発明化合物	30.0mg
乳糖	40.0mg
スターチ	15.0mg
タルク	5.0mg

上記組成から常法によってカプセル剤を調製する。

製剤例 3 : 注射剤

本発明化合物	30.0mg
グルコース	100.0mg

上記組成を注射用精製水に溶解して注射剤を調製する。

産業上の利用可能性

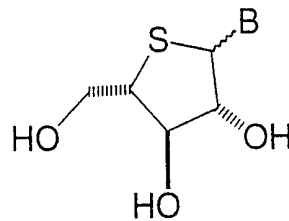
前述の試験例の結果から明らかなように、本発明の L-4'-チオアラビノフラヌクレオシド化合物は毒性がなく、B型肝炎ウイルス (HBV) に対して顕著な抑制効果を有すことから抗肝炎ウイルス組成物、特に、抗 B型肝炎ウイルス

剤として有用であり、医薬品としての開発が期待されうるものである。

また、前述したL-4'-チオアラビノフラノヌクレオシド化合物の合成法は、天然糖のD-キシロースから簡便な方法で目的化合物を導くことができ、極めて実用的な方法である。

請求の範囲

1. 下式 [I] で表される L-4' -チオアラビノフラノヌクレオシド化合物:

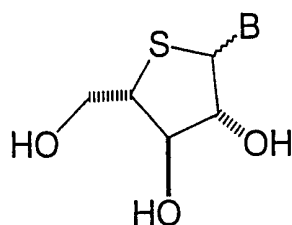


[I]

(式中、Bはピリミジン、プリン、アザプリンおよびデアザプリンからなる群より選択される核酸塩基を示し、それらはハロゲン原子、アルキル基、ハロアルキル基、アルケニル基、ハロアルケニル基、アルキニル基、アミノ基、アルキルアミノ基、水酸基、ヒドロキシアミノ基、アミノキシ基、アルコキシ基、メルカプト基、アルキルメルカプト基、アリール基、アリールオキシ基またはシアノ基によって置換されていてもよい。)

2. α -L-4' -チオアラビノフラノピリミジンヌクレオシドである、請求項1記載のL-4' -チオアラビノフラノヌクレオシド化合物。
3. α -L-4' -チオアラビノフラノプリンヌクレオシドである、請求項1記載のL-4' -チオアラビノフラノヌクレオシド化合物。
4. β -L-4' -チオアラビノフラノプリンヌクレオシドである、請求項1記載のL-4' -チオアラビノフラノヌクレオシド化合物。
5. 下式 [I] で表されるL-4' -チオアラビノフラノヌクレオシド化合物を活性成分として含有する医薬組成物:

31



[1]

(式中、Bはピリミジン、プリン、アザプリンおよびデアザプリンからなる群より選択される核酸塩基を示し、それらはハロゲン原子、アルキル基、ハロアルキル基、アルケニル基、ハロアルケニル基、アルキニル基、アミノ基、アルキルアミノ基、水酸基、ヒドロキシアミノ基、アミノキシ基、アルコキシ基、メルカプト基、アルキルメルカプト基、アリール基、アリールオキシ基またはシアノ基によって置換されていてもよい。)

6. L-4'-チオアラビノフラノヌクレオシド化合物が、 α -L-4'-チオアラビノフラノプリンヌクレオシドまたは β -L-4'-チオアラビノフラノプリンヌクレオシドから選ばれる、請求項5記載の組成物。

7. L-4'-チオアラビノフラノヌクレオシド化合物が、 α -L-4'-チオアラビノフラノピリミジンヌクレオシドである、請求項5記載の組成物。

8. 抗肝炎ウイルス組成物である、請求項5記載の組成物。

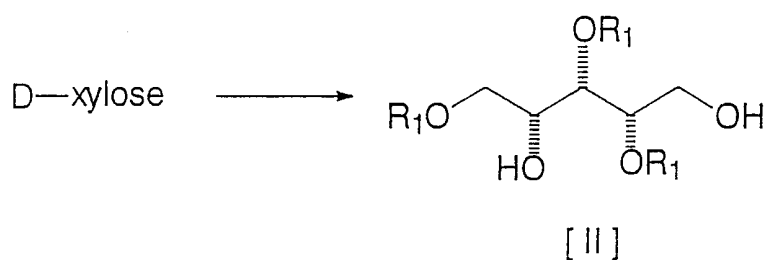
9. 抗B型肝炎ウイルス剤である、請求項5記載の組成物。

10. 下記の4つの工程を含んでなるL-4'-チオアラビノフラノヌクレオシド化合物の合成法：

第1工程：

D-キシロースを、アルコール溶媒中、酸の存在下で1位をアルキル化した後、

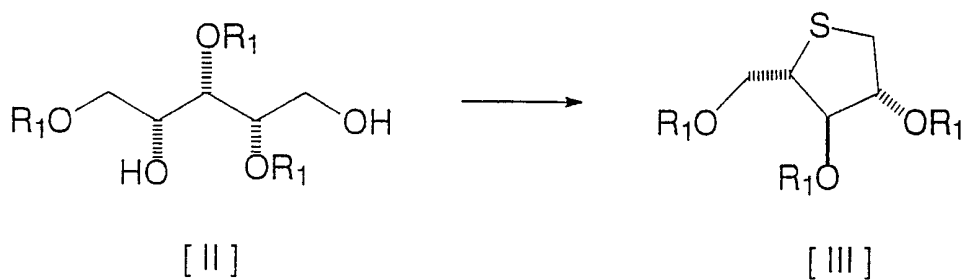
水酸基を保護し、次いで1位アルキル基の酸触媒による加水分解、引き続き還元剤による処理により式 [I I] で表される化合物を得る工程：



(式中、 R_1 はアルキル基を示す)

第2工程：

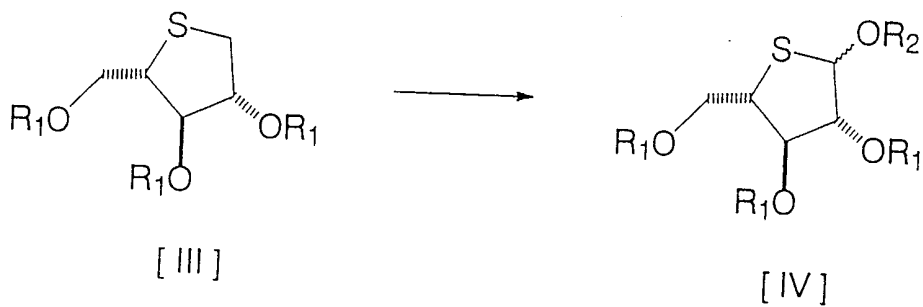
式 [I I] で表される化合物の水酸基をメシル化剤によりメシル化またはトシル化剤によりトシル化した後、硫化ナトリウムで処理して式 [I I I] で表される化合物を得る工程：



(式中、 R_1 は前記と同義)

第3工程：

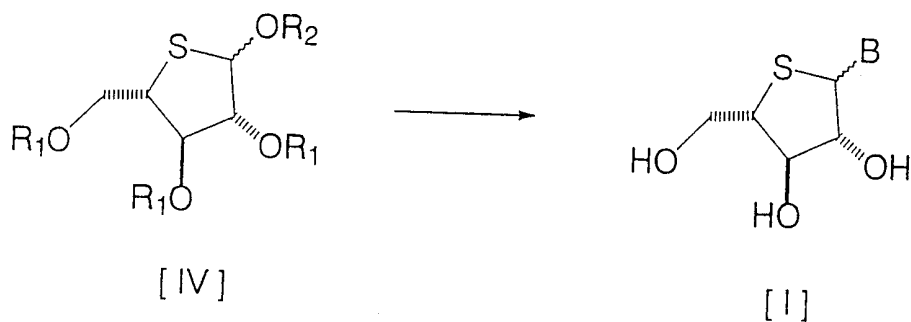
式 [III] で表される化合物を適当な酸化剤によりスルホキシド体に通じ、更に酸無水物で処理することでプンメラ（Pummerer）転移を行ない、式 [IV] で表される化合物を得る工程：



(式中、 R_1 は、前記と同義； R_2 はアシル基を示す)

第4工程：

式 [IV] で表される化合物にグリコシル化反応により核酸塩基を導入し、更に糖部保護基を脱保護して式 [I] で表される化合物を得る工程：



(式中、B はピリミジン、プリン、アザプリンおよびデアザプリンからなる群よ

り選択される核酸塩基を示し、それらはハロゲン原子、アルキル基、ハロアルキル基、アルケニル基、ハロアルケニル基、アルキニル基、アミノ基、アルキルアミノ基、水酸基、ヒドロキシアミノ基、アミノキシ基、アルコキシ基、メルカプト基、アルキルメルカプト基、アリール基、アリールオキシ基またはシアノ基によって置換されていてもよい。)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00827

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07H19/06, C07H19/14, C07H19/16, C07H19/23, A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07H19/06, C07H19/14, C07H19/16, C07H19/23, A61K31/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAplus (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX/ PA	SATOH H., et al., "Synthesis of L-Enantiomers of 4'-Thioarabinofuranosyl Pyrimidine Nucleosides", Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, Vol. 8, No. 5 (May 1998) p.989-992	1-7, 10/ 8, 9
PX/ PA	JOHN A. SECRIST III, et al., "Synthesis and Biological Activity of Certain 4'-Thio-D-arabinofuranosylpurine Nucleosides", Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 41, No. 20 (September 24, 1998) p.3865-3871	1, 3-6/ 2, 7-10
PX/ PA	MACHIDA H., et al., "Anti-herpesvirus activity profile of 4'-thioarabinofuranosyl purine and uracil nucleosides and activity of 1-β-D-2'-fluoro-4'-thioarabinofuranosyl guanine and 2,6-diaminopurine against clinical isolates of human cytomegalovirus", Antiviral Research, Vol. 39, No. 2 (August 1998) p.129-137	1, 5, 6/ 2-4, 7-10

 Further documents are listed in the continuation of Box C.
 See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 May, 1999 (19. 05. 99)Date of mailing of the international search report
1 June, 1999 (01. 06. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.


INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00827

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/ A	JP, 9-249690, A (Yamasa Corp.), 22 September, 1997 (22. 09. 97) & US, 5817639, A	1, 3-6/ 2, 7-10
X/ A	JP, 9-25289, A (Yamasa Corp.), 28 January, 1997 (28. 01. 97) (Family: none)	1, 2/ 10
X/ A	JP, 5-505791, A ((The) University of Birmingham), 26 August, 1993 (26. 08. 93) & EP, 421777, B1 & WO, 9104982, A1 & PT, 95510, A & DE, 69025529, E & ES, 2086376, T3 & IE, 74701, B	1, 5/ 10
X/ A	YOSHIMURA Y., et al., "SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF 2'-MODIFIED 4'-THIONUCLEOSIDES", NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, Vol. 16, No. 7-9 (1997) p.1103-1106	1, 4-6/ 10
X/ A	JOHN A. SECRIST III, et al., "THE SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF CERTAIN 4'- THIONUCLEOSIDES", NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, Vol. 14, No. 3-5 (1995) p.675-686	1, 3, 4/ 5, 10
X/ A	YOSHIMURA Y., et al. "A Facile, Alternative Synthesis of 4'-Thioarabinonucleosides and Their Biological Activities", Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 40, No. 14 (1997) p.2177-2183	1-6/ 7-10
X	SIDDIQI S.M., et al., "Search for New Purine- and Ribose-Modified Adenosine Analogues as Selective Agonists and Antagonists at Adenosine Receptors", Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 38, No. 7 (1995) p.1174-1188	1, 5
X/ A	OTOTANI N., et al., "Preparation and Antitumor Activity of 4'-Thio Analogs of 2,2'-Anhydro-1-β- D-arabinofuranosylcytosine", Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 17, No. 5 (1974) p.535-537	1, 5/ 10
X/ A	WHISTLER R.L., et al., "4-Thio-D- arabinofuranosylpyrimidine Nucleosides", J. Org. Chem., Vol. 36, No. 1 (1971) p.108-110	1, 2/ 10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁶ C07H19/06, C07H19/14, C07H19/16, C07H19/23, A61K31/70		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁶ C07H19/06, C07H19/14, C07H19/16, C07H19/23, A61K31/70		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus (STN), REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X / P A	SATOH H., et al., "Synthesis of L-Enantiomers of 4'-Thioarabinofuranosyl Pyrimidine Nucleosides", Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, Vol. 8, No. 5 (May 1998) p. 989-992	1-7, 10/ 8, 9
P X / P A	JOHN A. SECRIST III, et al., "Synthesis and Biological Activity of Certain 4'-Thio-D-arabinofuranosylpurine Nucleosides", Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 41, No. 20 (September 24, 1998) p. 3865-3871	1, 3-6/ 2, 7-10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献
国際調査を完了した日 19.05.99	国際調査報告の発送日 01.06.99	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 中木 亜希	4 P 9 2 8 2 
電話番号 03-3581-1101		内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X/ P A	MACHIDA H., et al., "Anti-herpesvirus activity profile of 4'-thioarabinofuranosyl purine and uracil nucleosides and activity of 1- β -D-2'-fluoro-4'-thioarabinofuranosyl guanine and 2,6-diaminopurine against clinical isolates of human cytomegalovirus", Antiviral Research, Vol. 39, No. 2 (August 1998) p. 129-137	1, 5, 6/ 2-4, 7-10
X/ A	JP, 9-249690, A (ヤマサ醤油株式会社) 22. 9月. 1997 (22. 09. 97) &US, 5817639, A	1, 3-6/ 2, 7-10
X/ A	JP, 9-25289, A (ヤマサ醤油株式会社) 28. 1月. 1997 (28. 01. 97) (ファミリーなし)	1, 2/ 10
X/ A	JP, 5-505791, A (エハートンティ オブ ハーミンガム) 26. 8月. 1993 (26. 08. 93) &EP, 421777, B1 & WO, 9104982, A1 & PT, 95510, A & DE, 69025529, E &ES, 2086376, T3 & IE, 74701, B	1, 5/ 10
X/ A	YOSHIMURA Y., et al., "SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF 2'-MODIFIED 4'-THIONUCLEOSIDES", NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, Vol. 16, No. 7-9 (1997) p. 1103-1106	1, 4-6/ 10
X/ A	JOHN A. SECRIST III, et al., "THE SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF CERTAIN 4'-THIONUCLEOSIDES", NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, Vol. 14, No. 3-5 (1995) p. 675-686	1, 3, 4/ 5, 10
X/ A	YOSHIMURA Y., et al., "A Facile, Alternative Synthesis of 4'-Thioarabinonucleosides and Their Biological Activities", Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 40, No. 14 (1997) p. 2177-2183	1-6/ 7-10
X	SIDDIQI S. M., et al., "Search for New Purine- and Ribose-Modified Adenosine Analogues as Selective Agonists and Antagonists at Adenosine Receptors", Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 38, No. 7 (1995) p. 1174-1188	1, 5
X/ A	OTOTANI N., et al., "Preparation and Antitumor Activity of 4'-Thio Analogs of 2,2'-Anhydro-1- β -D-arabinofuranosylcytosine", Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 17, No. 5 (1974) p. 535-537	1, 5/ 10
X/ A	WHISTLER R. L., et al., "4-Thio-D-arabinofuranosylpyrimidine Nucleosides", J. Org. Chem., Vol. 36, No. 1 (1971) p. 108-110	1, 2/ 10