

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4922535号  
(P4922535)

(45) 発行日 平成24年4月25日 (2012. 4. 25)

(24) 登録日 平成24年2月10日 (2012. 2. 10)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 498/18 (2006. 01)

C O 7 D 498/18 3 1 1

A 6 1 K 31/537 (2006. 01)

A 6 1 K 31/537

A 6 1 P 31/00 (2006. 01)

A 6 1 P 31/00

A 6 1 P 31/12 (2006. 01)

A 6 1 P 31/12

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 34 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-521468 (P2002-521468)  
 (86) (22) 出願日 平成13年4月26日 (2001. 4. 26)  
 (65) 公表番号 特表2004-506738 (P2004-506738A)  
 (43) 公表日 平成16年3月4日 (2004. 3. 4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/010816  
 (87) 国際公開番号 W02002/016368  
 (87) 国際公開日 平成14年2月28日 (2002. 2. 28)  
 審査請求日 平成20年2月5日 (2008. 2. 5)  
 (31) 優先権主張番号 09/641, 348  
 (32) 優先日 平成12年8月18日 (2000. 8. 18)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502103829  
 イムノージェン インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国 O 2 4 5 1 マサチュー  
 セッツ州, ウォルサム, ウィンター スト  
 リート 8 3 0  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節  
 (74) 代理人 100111741  
 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 チオール含有メイタンシノイド類の製造および精製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

チオール含有メイタンシノイドの製造方法であって、

(1) 水素化リチウムトリメトキシアルミニウム ( $\text{LiAl}(\text{OMe})_3\text{H}$ )、水素化リチウムトリエトキシアルミニウム ( $\text{LiAl}(\text{OEt})_3\text{H}$ ) および水素化リチウムトリプロポキシアルミニウム ( $\text{LiAl}(\text{OPr})_3\text{H}$ ) からなる群から選択される還元剤でメイタンシノイドC-3エステルの還元的加水分解を行って、メイタンシノールを得る工程；

(2) 前記メイタンシノールを精製して、副生成物が存在する場合にはそれを除去する工程；

(3) 前記精製メイタンシノールをジスルフィドを含むN - メチル - L - アラニンのカルボン酸誘導体又はジスルフィドを含むN - メチル - L - システインのカルボン酸誘導体でエステル化して、ジスルフィド連結基を有するメイタンシノールのL-およびD-アミノアシルエステルの反応混合物を得る工程；

(4) メイタンシノールの前記ジスルフィド連結基を有するL-アミノアシルエステルを(3)で得られた反応混合物から分離する工程；

(5) メイタンシノールの前記ジスルフィド連結基を有するL-アミノアシルエステルを還元して、チオール含有メイタンシノイドを得る工程；ならびに

(6) 前記チオール含有メイタンシノイドを精製する工程を含む、製造方法。

【請求項 2】

10

20

(1)での前記還元剤が、水素化リチウムトリメトキシアルミニウムである請求項1に記載の方法。

【請求項3】

(1)での前記還元剤を、メイタンシノイドC-3エステル1モル当たり約5~100当量の濃度で使用する請求項1に記載の方法。

【請求項4】

(1)での前記還元剤を、メイタンシノイドC-3エステル1モル当たり約7.5~30当量の濃度で使用する請求項1に記載の方法。

【請求項5】

(1)での前記還元剤を、メイタンシノイドC-3エステル1モル当たり約10~20当量の濃度で使用する請求項1に記載の方法。 10

【請求項6】

(1)での前記還元的加水分解を、約-80 ~ 0 の温度で行う請求項1に記載の方法。

【請求項7】

(1)での前記還元的加水分解を、約-45 ~ -27.5 の温度で行う請求項1に記載の方法。

【請求項8】

(1)での前記還元的加水分解を、約-35 ~ 30 の温度で行う請求項1に記載の方法。

【請求項9】

(1)での前記還元剤を、約5~40分間かけて加える請求項1に記載の方法。 20

【請求項10】

(1)での前記還元剤を、約7~20分間かけて加える請求項1に記載の方法。

【請求項11】

(1)での前記還元剤を、約8~12分間かけて加える請求項1に記載の方法。

【請求項12】

(2)において前記メイタンシノールを、クロマトグラフィーによって精製する請求項1に記載の方法。

【請求項13】

前記クロマトグラフィーが、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、シリカゲルでの分取薄層クロマトグラフィーまたはシアノ結合シリカHPLCカラムクロマトグラフィーである請求項12に記載の方法。 30

【請求項14】

前記クロマトグラフィーが、シリカゲルカラムクロマトグラフィーである請求項12に記載の方法。

【請求項15】

前記精製を周囲温度で行う請求項12に記載の方法。

【請求項16】

前記メイタンシノールを約95%の純度まで精製する請求項12に記載の方法。

【請求項17】

(3)における前記ジスルフィドを含むN-メチル-L-アラニンのカルボン酸誘導体又はジスルフィドを含むN-メチル-L-システインのカルボン酸誘導体が、N-メチル-N-メチルジチオアセチル-L-アラニン、N-メチル-N-(3-メチルジチオ-プロパノイル)-L-アラニン、N-メチル-N-(3-メチルジチオ-ブタノイル)-L-アラニン、N-メチル-N-(4-メチルジチオ-ブタノイル)-L-アラニン、N-メチル-N-(5-メチルジチオ-ペンタノイル)-L-アラニン、N-メチル-N-(3-フェニルジチオ-プロパノイル)-L-アラニン、N-メチル-N-(3-(4-ニトロフェニルジチオ)-プロパノイル)-L-アラニン、N-アセチル-N-メチル-メチルジチオシステインおよびN-アセチル-N-メチル-メチルジチオホモシステインからなる群から選択される請求項1に記載の方法。 40

【請求項18】

(3)での前記ジスルフィドを含むN-メチル-L-アラニンのカルボン酸誘導体又はジ 50

スルフィドを含むN - メチル - L - システインのカルボン酸誘導体が、N-メチル-N-(3-メチルジチオ-プロパノイル)-L-アラニンである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

(3)での前記エステル化を周囲温度で行う請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

(3)での前記エステル化が、ジシクロヘキシルカルボジイミドおよび塩化亜鉛の使用をさらに含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 1】

(4)での前記分離を、シアノ結合シリカHPLCカラムに前記反応混合物を通すことで行う請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 2】

(4)での前記分離を約25℃で行う請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

(5)での前記還元で、前記還元剤としてジチオトレイトールを用いる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

(5)での前記還元を、酢酸エチル - メタノール - 緩衝水溶液の混合物であって、緩衝塩、ジチオトレイトール、未還元メイタンシノイド類および還元メイタンシノイド類を溶液の状態に維持できる混合物中で行う請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記酢酸エチル - メタノール - 緩衝水溶液の混合物の酢酸エチル：メタノール：緩衝水溶液の体積比が、1：1.5：1である請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記チオール含有メイタンシノイドの濃度を、そのチオール含有メイタンシノイドが酢酸エチル - メタノール - 緩衝水溶液中に溶解した状態のままであるようなものとする請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記チオール含有メイタンシノイドの濃度が約4g/Lである請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

(5)での前記還元を、酸素を含まない雰囲気下で行う請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 9】

(5)での前記還元を約25℃で行う請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 0】

(6)での前記チオール含有メイタンシノイドの前記精製を、クロマトグラフィーによって行う請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 1】

(6)での前記チオール含有メイタンシノイドの前記精製を、シアノ結合HPLCカラムクロマトグラフィーによって行う請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記クロマトグラフィーを、有機溶媒で平衡とし、その溶媒で溶離するシアノ結合HPLCカラムによって行う請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記有機溶媒が、ヘキサン：2-プロパノール：酢酸エチルの混合物である請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記有機溶媒のヘキサン：2-プロパノール：酢酸エチルの体積比が78.0：5.5：16.5である請求項 3 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

10

20

30

40

50

本発明は、細胞傷害性薬剤の製造および精製方法に関する。より具体的には本発明は、チオール含有メイタンシノイド類(maytansinoids)を含む細胞傷害性薬剤の製造および精製方法に関するものである。この細胞傷害性薬剤は、チオール基を介してそれを細胞結合剤に連結し、次にそれをターゲティング様式で特定の細胞集団に送達することで、治療薬として用いることができる。

#### 【 0 0 0 2 】

##### 発明の背景

近年、モノクローナル抗体 - 薬剤コンジュゲートを用いた腫瘍細胞への特異的ターゲティングの試みに関する報告が非常に多くなってきた (R. V. J. Chari., 31 Adv. Drug Deliv. Res., 89-104 (1998); G. A. PieterszおよびK. Krauer, 2 J. Drug Targeting 183-215 (1994); Selaら, Immunoconjugates中、189-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghoseら, Targeted Drugs中、1-22 (E. Goldberg, ed. 1983); Dienerら, Antibody mediated delivery systems中、1-23 (J. Rodwell, ed., 1988); Pieterszら, Antibody mediated delivery systems中、25-53 (J. Rodwell, ed., 1988); Bumolら, Antibody mediated delivery systems中、55-79 (J. Rodwell, ed., 1988) )。メトトレキサート、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、メルファラン、マイトマイシンCおよびクロラムブシルなどの細胞傷害性薬剤について、各種マウスモノクローナル抗体への結合が行われている。場合によっては、血清アルブミン (Garnettら, 46 Cancer Res. 2407-2412 (1986); Ohkawaら, 23 Cancer Immunol. Immunother. 81-86 (1986); Endoら, 47 Cancer Res. 1076-1080 (1980) )、デキストラン (Hurwitzら, 2 Appl. Biochem. 25-35 (1980); Manabiら, 34 Biochem. Pharmacol. 289-291 (1985); Dillmanら, 46 Cancer Res. 4886-4891 (1986); Shovalら, 85 Proc. Natl. Acad. Sci. 8276-8280 (1988) ) またはポリグルタミン酸 (Tsukadaら, 73 J. Natl. Canc. Inst. 721-729 (1984); Katoら, 27 J. Med. Chem. 1602-1607 (1984); Tsukadaら, 52 Br. J. Cancer 111-116 (1985) ) などの中間担体分子を介して、薬剤分子を抗体分子に連結した。

#### 【 0 0 0 3 】

非常に多様なリンカー技術が、そのような免疫コンジュゲートの製造に用いられており、開裂性および非開裂性の両方のリンカーについて研究が行われている。しかしながらほとんどの場合、薬剤分子が標的部位で未修飾の形でコンジュゲートから放出され得る場合に限り、その薬剤が有し得る完全な細胞傷害性が認められると考えられる。

#### 【 0 0 0 4 】

抗体 - 薬剤コンジュゲートの製造に用いられてきた開裂性リンカーの一つは、受容体介在エンドサイトーシス時に遭遇するエンドソームおよびリソソームなどの各種細胞内区画の酸性環境を利用するシス-アコニット酸に基づく酸不安定性(acid-labile)リンカーである。ShenおよびRyserは、ダウノルビシンの巨大分子担体とのコンジュゲートの製造にこの方法を導入した (102 Biochem. Biophys. Res. Commun. 1048-1054 (1981) )。YangおよびReisfeldは、同一の技術を用いて、ダウノルビシンを抗メラノーマ抗体に結合させた (80 J. Natl. Canc. Inst. 1154-1159 (1988) )。Dillmanらも、酸不安定性リンカーを同様に用いて、ダウノルビシンの抗T細胞抗体とのコンジュゲートを製造した (48 Cancer Res. 6097-6102 (1988) )。Trailらは、酸不安定性ヒドラゾン結合を介して、ドキソルビシンを抗体に連結させた (52 Cancer Res. 5693-5700 (1992) )。

#### 【 0 0 0 5 】

Trouetらが研究した別途のアプローチには、ペプチドスパーサーアームを介して抗体にダウノルビシンを連結することが含まれた (79 Proc. Natl. Acad. Sci. 626-629 (1982) )。これは、リソソームペプチダーゼの作用により、遊離薬剤がそのようなコンジュゲートから放出され得るという前提のもとに行われたものである。

#### 【 0 0 0 6 】

しかしながらin vitroでの細胞傷害性試験から、抗体 - 薬剤コンジュゲートが、遊離の非コンジュゲート薬剤と同じ細胞傷害力を示すことは稀であることが明らかになっている。これは、薬剤分子が抗体から放出される機構が非常に効率の悪いものであることを示唆す

10

20

30

40

50

るものであった。免疫毒素の分野では、モノクローナル抗体と触媒活性タンパク質毒素との間のジスルフィド架橋を介して形成されるコンジュゲートが、他のリンカーを有するコンジュゲートより細胞傷害性が高いことが明らかになった (Lambertら, 260 J. Biol. Chem. 12035-12041 (1985); Lambertら, Immunotoxins中、175-209 (A. Frankel, ed. 1988); Ghetieら, 48 Cancer Res. 2610-2617 (1988)参照)。これは、抗体分子と毒素との間のジスルフィド結合の効果的な開裂に寄与する高い細胞内グルタチオン濃度によるものであった。それにもかかわらず、薬剤と巨大分子との間のコンジュゲート製造におけるジスルフィド架橋の使用については、ごくわずかな報告例しかない。Shenらは、メトトレキサートのメルカプトエチルアミド誘導体への変換とそれに続くジスルフィド結合を介したポリ-D-リジンとの結合について報告した (260 J. Biol. Chem. 10905-10908 (1985))。最近の報告では、トリスルフィド含有毒物であるカリケアマイシン (calicheamicin) と抗体とのコンジュゲートの製造について報告された (L. M. Hinmanら, 53 Cancer Res. 3336-3342 (1993); E. L. Sieversら, 93 Blood 3678-3684 (1999))。

10

#### 【0007】

ジスルフィド連結抗体 - 薬剤コンジュゲートがない理由の一つは、ジスルフィド架橋を介して抗体に薬剤を連結させるのに容易に使用可能な含硫黄原子部分を有する細胞傷害性薬剤が入手できないことにある。さらに、細胞傷害能力を低下させることなく既存の薬剤の化学修飾を行うことは困難である。

#### 【0008】

既存の抗体 - 薬剤コンジュゲートにおける別の主要な欠点は、標的抗原数が限られており、メトトレキサート、ダウノルビシンおよびビンクリスチンなどの癌抑制性薬剤 (cancerostatic drug) の細胞傷害性が比較的温和であるために、そのコンジュゲートによっては、標的部位に十分な濃度の薬剤を送達できないという点である。例えば、ドキソルビシンの抗体コンジュゲートについてヒト臨床試験での評価が行われたが、有効性がないことが認められた (Tolcherら, 17 J. Clinical Oncol. 478-484 (1999))。有意な細胞傷害性を得るには、抗体に直接あるいはポリマー担体分子を介して多数の薬剤分子を連結させることが必要になる。しかしながら、そのような高度に修飾された抗体は、標的抗原に対する結合能力低下および血流での急速な *in vivo* クリアランスを示す場合が多い。

20

#### 【0009】

メイタンシノイド類は、細胞傷害性の高い薬剤である。メイタンシンは最初に、Kupchanらによって、東アフリカの低木であるマイテヌス・セラッタ (*Maytenus serrata*) から単離され、メトトレキサート、ダウノルビシンおよびビンクリスチンなどの従来の癌化学療法薬よりも100~1000倍の細胞傷害性を有することが示された (米国特許第3896111号)。その後、一部の微生物も、メイタンシノールおよびメイタンシノールのC-3エステル類などのメイタンシノイド類を産生することが発見された (米国特許第4151042号)。メイタンシノールの合成C-3エステル類およびメイタンシノールの類似体も報告されている (Kupchanら, 21 J. Med. Chem. 31-37 (1978); Higashideら, 270 Nature 721-722 (1977); Kawaiら, 32 Chem. Pharm. Bull. 3441-3451 (1984))。C-3エステル類が製造されているメイタンシノール類似体の例としては、芳香環が修飾された (例: 脱クロロ) またはC-9、C-14 (例: ヒドロキシ化メチル基)、C-15、C-18、C-20およびC-4,5で修飾されたメイタンシノールなどがある。

30

40

#### 【0010】

天然および合成のC-3エステル類は、下記の2つの群に分類することができる:

(a) 簡単なカルボン酸とのC-3エステル類 (米国特許第4248870号、同4265814号、同4308268号、同4308269号、同4309428号、同4317821号、同4322348号および同4331598号)、および

(b) N-メチル-L-アラニンの誘導体とのC-3エステル類 (米国特許第4137230号、同4260608号、同5208020号、同5416064号および12 Chem. Pharm. Bull. 3441 (1984))。

#### 【0011】

群(b)のエステル類の方が群(a)のエステル類より、細胞傷害性がかなり高いことが認めら

50

れた。

【0012】

メイタンシンは有糸分裂インヒビターである。L1210細胞をin vivoにてメイタンシンで処理すると、細胞の67%が有糸分裂状態に留まることが報告されている。未処理の対照細胞は、3.2~5.8%の範囲の有糸分裂指数を示すことが報告された (Sieberら, 43 Comparative Leukemia Research 1975, Bibl. Haemat. 495-500 (1976))。ウニ卵およびハマグリ卵を用いた実験で、メイタンシンが、微小管タンパク質であるチューブリンの重合阻害を介して微小管形成を妨害することによって、有糸分裂を阻害することが示唆されている (Remillardら, 189 Science 1002-1005 (1975))。

【0013】

in vitroのP388、L1210およびLY5178マウス白血病細胞懸濁液が、用量 $10^{-3} \sim 10^{-1} \mu\text{g/mL}$ のメイタンシンによって阻害され、P388系が最も感受性が高いことが認められている。メイタンシンが、ヒト鼻咽頭癌細胞のin vitro増殖の活性インヒビターであることも明らかになっている。ヒト急性リンパ芽球性白血病系C.E.M.が、 $10^{-7} \mu\text{g/mL}$ という低濃度によって阻害されることが報告された (Wolpert-DeFillippesら, 24 Biochem. Pharmacol. 1735-1738 (1975))。

【0014】

in vivoでのメイタンシンも活性であることが明らかになっている。P388リンパ球性白血病系での腫瘍成長が、高い治療指数を示唆する50~100倍の用量範囲で阻害されることが示された。さらに、L1210マウス白血病系、ヒトルイス肺癌系およびヒトB-16黒色腫系で、かなりの阻害活性を示すことができた (Kupchan, 33 Ped. Proc. 2288-2295 (1974))。

【0015】

メイタンシノイド類は非常に細胞傷害性が高いことから、癌などの多くの疾患の治療において有用であるものと期待されたが、その期待はまだ実現していない。メイタンシンを用いた臨床試験は、多くの副作用のために好ましいものではなかった (Isselら, 5 Can. Trtmnt. Rev. 199-207 (1978))。中枢神経系に対する有害効果および胃腸に関する症状のために、一部の患者は治療を続けることを拒絶することになり (Issel, 204)、メイタンシンが、累積的と考えられる末梢神経障害に関連しているように思われた (Issel, 207)。

【0016】

しかしながら、非常に細胞傷害性が高いが、なおも多くの疾患の治療において効果的に用いることができる形態のメイタンシノイド類が報告されている (米国特許第5208020号および同5416064号; Chariら, 52 Cancer Res. 127-131 (1992); Liuら, 93 Proc. Natl. Acad. Sci. 8618-8623 (1996))。

【0017】

本明細書で対象となるメイタンシノイド類の治療的使用におけるさらに別の欠点は、チオール含有メイタンシノイド類の製造および精製方法には、手間がかかり、大量化が困難であって、収率があまり高くない低効率のクロマトグラフィーのいくつかの段階が含まれるという点である。

【0018】

米国特許第5208020号および同5416064号には、最初にエステル基を有するメイタンシノイドをメイタンシノールに変換し、得られたメイタンシノールをN-メチル-L-アラニン誘導体またはN-メチル-L-システイン誘導体でエステル化してジスルフィド含有メイタンシノイド類を得て、次にジスルフィド基をジチオトレイトールで開裂させてチオール含有メイタンシノイド類とすることで、チオール含有メイタンシノイドを製造できることが開示されている。しかしながらこの方法には、手間を要し、収率があまり高くない低効率のいくつかの段階が含まれる。

【0019】

より具体的には、最初にメイタンシノールを、水素化アルミニウムリチウムなどでの還元

10

20

30

40

50

によって、メイタンシンまたはその他のメイタンシノールのエステルから誘導する (Kupchan, S. M.ら, 21 J. Med. Chem. 31-37 (1978); 米国特許第4360462号)。さらに、微生物のノカルジア(Nocardia)からメイタンシノールを単離することも可能である (Higashideら, 米国特許第4151042号参照)。具体的な例では、-5 でのテトラヒドロフラン中の水素化アルミニウムリチウムを用いた還元的加水分解によるアンサマイトシンP-3のメイタンシノールへの変換が、米国特許第4162940号に記載された。しかしながら、水素化アルミニウムリチウムとの反応によって副生成物がいくつか生成し、それらは注意深いシリカゲルでの分取薄層クロマトグラフィーによってのみ除去可能である。従って、この方法は工業的規模での使用には適さない。

#### 【0020】

この方法における次の段階は、N-メチル-L-アラニン誘導体またはN-メチル-L-システイン誘導体ならびにジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) および触媒量の塩化亜鉛などの好適な薬剤を用いたメイタンシノールの各種エステル誘導体への変換である (米国特許第4137230号; Kawaiら, 32 Chem. Pharm. Bull. 3441-3951 (1984); 米国特許第4260609号参照)。DおよびL-アミノアシル側鎖を有する2種類のジアステレオマー生成物が生じ、それとともに少量の未反応メイタンシノールが得られる。未反応のメイタンシノールは、シリカゲルでのカラムクロマトグラフィーによってエステル類から容易に分離されるが、ジアステレオマーメイタンシノイドエステル類は、ほとんど分離できない。前述の方法では (Kupchan, S. M.ら, 21 J. Med. Chem. 31-37 (1978); 米国特許第4360462号)、2本のシリカゲルカラムでの精製とそれに続くシリカゲルでの分取薄層クロマトグラフィーによるさらなる精製後に、所望のL-アミノアシルエステルが得られる。従ってこの方法も、工業的規模での使用には適さない。

#### 【0021】

この方法における最後の段階、すなわちジスルフィド含有メイタンシノイド類の対応するチオール含有メイタンシノイド類への還元は、ジチオトレイトール (DTT) による処理、C-18カラムおよび直線勾配で55%から80%のアセトニトリル/H<sub>2</sub>Oによる溶出を用いるHPLCによる精製によって達成される。しかしながらこの段階では収率が低く、やはり工業的規模での使用には適さない。チオール含有メイタンシノイド類は、この反応に用いられるエタノール/水混合溶媒にはあまり溶けない。さらに、移動相としてアセトニトリル/水を用いる逆相C-18カラムでのHPLCによる精製では回収率が低く、一部の生成物は二量化する場合がある。

#### 【0022】

従って、方法の複雑さを軽減し、スケーラビリティ (scalability) が可能であって、収率が上昇するチオール含有メイタンシノイド類の改良された製造および精製方法が強く望まれている。

#### 【0023】

##### 発明の概要

そこで本発明の目的は、方法の複雑さを軽減し、スケーラビリティが可能であって、収率を向上させるチオール含有メイタンシノイド類の改良された製造および精製方法を提供することにある。

#### 【0024】

上記目的および他の目的は、チオール含有メイタンシノイド類の改良された製造および精製方法を提供することによって達成された。

#### 【0025】

1 実施形態において本発明は、チオール含有メイタンシノイドの製造方法であって、(1)水素化リチウムトリメトキシアルミニウム (LiAl(OMe)<sub>3</sub>H)、水素化リチウムトリエトキシアルミニウム (LiAl(OEt)<sub>3</sub>H)、水素化リチウムトリプロポキシアルミニウム (LiAl(OPr)<sub>3</sub>H)、水素化ナトリウムトリメトキシアルミニウム (NaAl(OMe)<sub>3</sub>H)、水素化ナトリウムトリエトキシアルミニウム (NaAl(OEt)<sub>3</sub>H) および水素化ナトリウムトリプロポキシアルミニウム (NaAl(OPr)<sub>3</sub>H) からなる群から選択される還元剤でメイタンシノイドC-3エ

ステルの還元的加水分解を行って、メイタンシノールを得る工程；

(2)前記メイタンシノールを精製して、副生成物が存在する場合にはそれを除去する工程；

(3)前記精製メイタンシノールをカルボン酸でエステル化して、メイタンシノールのL-およびD-アミノアシルエステルの反応混合物を得る工程；

(4)メイタンシノールの前記L-アミノアシルエステルを(3)で得られた反応混合物から分離する工程；

(5)メイタンシノールの前記L-アミノアシルエステルを還元して、チオール含有メイタンシノイドを得る工程；ならびに

(6)前記チオール含有メイタンシノイドを精製する工程を含む、製造方法を提供する。

10

【0026】

好ましくは(1)での還元剤は、水素化リチウムトリメトキシアルミニウムである。

【0027】

やはり好ましくは、(1)での還元剤は、メイタンシノイドC-3エステル1モル当たり約5~100当量の濃度で使用する。より好ましくは(1)での還元剤は、メイタンシノイドC-3エステル1モル当たり約7.5~30当量の濃度で使用する。最も好ましくは(1)での還元剤は、メイタンシノイドC-3エステル1モル当たり約10~20当量の濃度で使用する。

【0028】

好ましくは(1)での還元的加水分解は、約-80 ~ 0 の温度で行う。より好ましくは(1)での還元的加水分解は、約-45 ~ -27.5 の温度で行う。最も好ましくは(1)での還元的加水分解は、約-35 ~ -30 の温度で行う。

20

【0029】

好ましくは(1)での還元剤は、約5~40分間かけて加える。より好ましくは(1)での還元剤は、約7~20分間かけて加える。最も好ましくは(1)での還元剤は、約8~12分間かけて加える。

【0030】

好ましくは、(2)においてメイタンシノールは、クロマトグラフィーによって精製する。より好ましくは、(2)においてメイタンシノールは、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、シリカゲルでの分取薄層クロマトグラフィーまたはシアノ結合シリカHPLCカラムクロマトグラフィーであるクロマトグラフィーによって精製する。最も好ましくは、(2)においてメイタンシノールは、シリカゲルカラムクロマトグラフィーであるクロマトグラフィーによって精製する。

30

【0031】

好ましくは(2)での精製は、周囲温度で行う。

【0032】

好ましくは(2)でのメイタンシノールは、約95%の純度まで精製する。

【0033】

好ましくは(3)でのカルボン酸は、N-メチル-N-メチルジチオアセチル-L-アラニン、N-メチル-N-(3-メチルジチオ-プロパノイル)-L-アラニン、N-メチル-N-(3-メチルジチオ-ブタノイル)-L-アラニン、N-メチル-N-(4-メチルジチオ-ブタノイル)-L-アラニン、N-メチル-N-(5-メチルジチオ-ペンタノイル)-L-アラニン、N-メチル-N-(3-フェニルジチオ-プロパノイル)-L-アラニン、N-メチル-N-[3-(4-ニトロフェニルジチオ)-プロパノイル]L-アラニン、N-アセチル-N-メチル-メチルジチオシステインおよびN-アセチル-N-メチルメチルジチオホモシステインからなる群から選択される。より好ましくは(3)でのカルボン酸は、N-メチル-N-(3-メチルジチオ-プロパノイル)-L-アラニンである。

40

【0034】

好ましくは(3)でのエステル化は、周囲温度で行う。

【0035】

好ましくは(3)でのエステル化は、ジシクロヘキシルカルボジイミドおよび塩化亜鉛の使

50



用をさらに含む。

【0036】

好ましくは(4)での分離は、シアノ結合シリカHPLCカラムに前記反応混合物を通すことで行う。

【0037】

好ましくは(4)での分離は、約25 で行う。

【0038】

好ましくは(5)での還元では、還元剤としてジチオトレイトールを用いる。

【0039】

好ましくは(5)での還元は、酢酸エチル - メタノール - 緩衝水溶液の混合物であって、緩衝塩、ジチオトレイトール、未還元メイタンシノイド類および還元メイタンシノイド類を溶液の状態に維持できる混合物中で行う。より好ましくは、酢酸エチル - メタノール - 緩衝水溶液の混合物の酢酸エチル：メタノール：緩衝水溶液の体積比は1：1.5：1である。

10

【0040】

好ましくはチオール含有メイタンシノイドの濃度は、そのチオール含有メイタンシノイドが酢酸エチル - メタノール - 緩衝水溶液中に溶解した状態のままであるようなものとする。好ましくはチオール含有メイタンシノイドの濃度は約4g/Lである。

【0041】

好ましくは(5)での還元は、酸素を含まない雰囲気下で行う。

【0042】

20

好ましくは(5)での還元は、約25 で行う。

【0043】

好ましくは(6)でのチオール含有メイタンシノイドの精製はクロマトグラフィーによって行う。より好ましくはそのクロマトグラフィーは、シアノ結合HPLCカラムによって行う。最も好ましくはそのクロマトグラフィーは、有機溶媒で平衡とし、その溶媒で溶離するシアノ結合HPLCカラムによって行う。好ましくは前記有機溶媒は、ヘキサン：2-プロパノール：酢酸エチルの混合物であり、より好ましくは前記有機溶媒のヘキサン：2-プロパノール：酢酸エチルの体積比は78.0：5.5：16.5である。

【0044】

#### 図面の簡単な説明

30

(図面の説明については下記参照)

#### 発明の説明

本発明は、高い細胞傷害性を保持し、かつ細胞結合剤に効果的に連結することができるチオール含有メイタンシノイド誘導体の合成に基礎をおくものである。当該技術分野では、チオール含有メイタンシノイド類の既存の製造方法が複雑で、スケラビリティが困難であり、生成物の収率の低いものであることがわかっている。本発明は、方法の複雑さを低減し、スケラビリティを可能とし、生成物収率を向上させるチオール含有メイタンシノイド類の新規な製造方法を開示することで、これらの問題を克服するものである。

【0045】

従って本発明は、腫瘍細胞（特に固形腫瘍細胞）、ウイルス感染細胞、微生物感染細胞、寄生生物感染細胞、自己免疫細胞（自己抗体を産生する細胞）、活性化細胞（移植片拒絶または移植片対宿主病に関与する細胞）あるいは他のいずれかの種類の病変細胞または異常細胞のような殺滅または溶解させるべき病変細胞または異常細胞を排除する上で有用であって、しかも副作用の少ない薬剤であるチオール含有メイタンシノイド類の新規な製造方法を提供する。

40

【0046】

このチオール含有メイタンシノイド類は、結合型(bound form)もしくは遊離型(released form)あるいはその両方の状態で高い細胞傷害性を保持しながら、細胞結合剤に化学的に連結することができる。高い細胞傷害性とは、in vitroにて薬剤に24時間曝露したKB細胞で測定した場合に、IC<sub>50</sub>（生存率0.5となる、毒性物質の阻害濃度）が約10<sup>-8</sup> M以下の毒

50

性を示すことと定義される。

#### 【 0 0 4 7 】

本発明の化合物の治療薬としての有効性は、適切な細胞結合剤の注意深い選択によって決まる。細胞結合剤は、現在公知のあるいは今後公知となるいかなる種類のものであっても良く、ペプチド類および非ペプチド類などがある。一般にはそれは、抗体（特にはモノクローナル抗体）、リンホカイン、ホルモン、増殖因子、栄養素輸送分子（トランスフェリンなど）または他のいずれかの細胞結合性分子もしくは物質であることができる。

#### 【 0 0 4 8 】

##### 好適なメイタンシノイド類

細胞傷害性薬剤として使用可能なメイタンシノイド類およびメイタンシノイド誘導体の製造について説明した開示は多くある。好適なメイタンシノイドの例としては、メイタンシノールおよびメイタンシノール類似体などがある。好適なメイタンシノール類似体の例としては、修飾芳香環を有するものならびに他の位置に修飾を有するものなどがある。

#### 【 0 0 4 9 】

修飾芳香環を有する好適なメイタンシノール類似体およびその製造方法の具体例には、以下のものなどがある：

- (1)C-19-脱クロロ体（米国特許第4256746号）（アンサマイトシンP-2の水素化リチウムアルミニウム還元によって製造）；
- (2)C-20-ヒドロキシ（またはC-20脱メチル）および／またはC-19-脱クロロ体（米国特許第4361650号および同4307016号）（ストレプトミセス属菌(*Streptomyces*)もしくはアクチノミセス属菌(*Actinomyces*)を用いる脱メチル化またはLAHを用いる脱塩素化によって製造）；ならびに
- (3)C-20-脱メトキシ、C-20-アシルオキシ（-OCOR）および／または脱クロロ体（米国特許第4294757号）（塩化アシル類を用いるアシル化によって製造）。

#### 【 0 0 5 0 】

他の位置の修飾を有する好適なメイタンシノール類似体の具体例には、以下のものなどがある：

- (1)C-9-SH体（米国特許第4424219号）（メイタンシノールと $H_2S$ または $P_2S_5$ との反応によって製造）；
- (2)C-14-アルコキシメチル体（脱メトキシ/ $CH_2OR$ ）（米国特許第4331598号）；
- (3)C-14-ヒドロキシメチルまたはアシルオキシメチル体（ $CH_2OH$ または $CH_2OAc$ ）（米国特許第4450254号）（ノカルジア属菌(*Nocardia*)から取得）；
- (4)C-15-ヒドロキシ／アシルオキシ体（米国特許第4364866号）（メイタンシノールのストレプトミセス属菌による変換によって製造）；
- (5)C-15-メトキシ体（米国特許第4313946号および同4315929号）（トレウィア・ヌーディフローラ(*Trewia nudiflora*)から単離）；
- (6)C-18-N-脱メチル体（米国特許第4362663号および同4322348号）（メイタンシノールのストレプトミセス属菌による脱メチル化によって製造）；ならびに
- (7)4,5-デオキシ体（米国特許第4371533号）（メイタンシノールの三塩化チタン／LAH還元によって製造）。

#### 【 0 0 5 1 】

メイタンシノイドを細胞結合剤に連結させるには、連結基を用いる。

#### 【 0 0 5 2 】

好適な連結基は当業界では公知であり、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性(labile)基、光不安定性(photolabile)基、ペプチダーゼ不安定性基およびエステラーゼ不安定性基などがある。好ましいものはジスルフィド基およびチオエーテル基である。

#### 【 0 0 5 3 】

本発明によれば、連結基は、開示の方法によってメイタンシノイドに共有結合させた化学部分の一部である。好ましい実施形態において、その化学部分は、エステル結合を介してメイタンシノイドに共有結合している。

## 【0054】

メイタンシノイド上の多くの位置が連結箇所として有用であると予想されるが、それは連結の種類によって決まる。例えばエステル結合を形成するには、水酸基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC-14位、水酸基で修飾されたC-15位および水酸基を有するC-20位がいずれも有用であると予想される。しかしながら、C-3位が好ましく、メイタンシノールのC-3位が特に好ましい。

## 【0055】

メイタンシノールのN-メチル-L-アラニン含有C-3エステルおよびメイタンシノールのN-メチル-L-システイン含有C-3エステルあるいはそれらの類似体も好ましい。

## 【0056】

本発明は、メイタンシノールのC-3位に連結基があるチオール含有メイタンシノイドの製造および精製方法に関するものである。

## 【0057】

工程1：エステルを有するメイタンシノイドからのメイタンシノール(2)の合成

チオール含有メイタンシノイド類の製造および精製における第1工程では、メイタンシノイドC-3エステルの還元的加水分解を行ってメイタンシノール(2)を得ることを含む。

## 【0058】

A)メイタンシノイドC-3エステルを無水溶媒に溶かし、それを不活性ガス雰囲気下に置き、冷却する。

## 【0059】

好ましくはメイタンシノイドC-3エステルはメイタンシンまたはアンサマイトシンP-3(1c)である。アンサマイトシンP-4、P-3、P-2およびP-1などのアンサマイトシン(1a-e) (Asaiら, 35 Tetrahedron 1079-1085 (1979); 米国特許第4450234号; Hatanoら, 48 Agric. Biol. Chem. 1721-1729 (1984)に記載)も使用可能であり、より好ましくはアンサマイトシンP-3(1c)である。メイタンシンは、Kupchanらの報告(Kupchanら, 42 J. Org. Chem. 2349-2357 (1977))に記載の方法に従って得ることができる。アンサマイトシンP-3(1c)の微生物的製造が米国特許4450234号およびハタノらの報告(Hatanoら, 48 Agric. Biol. Chem. 1721-1729 (1984))に記載されている。

## 【0060】

好ましくは前記無水溶媒は、テトラヒドロフラン(THF)、2-メトキシエチルエーテル、ジオキサンまたはジエチルエーテルである。ただし、他の溶媒も使用可能である。より好ましくは無水溶媒はテトラヒドロフランである。好ましくは、エステル1 g当たり前記無水溶媒20~30 mLを使用し、より好ましくは25 mL/gとする。好ましくは前記不活性ガスはアルゴン、窒素またはヘリウムである。ただし、他のガスも使用可能である。より好ましくは不活性ガスはアルゴンである。好ましくは前記溶液は、ドライアイス-アセトン浴で約0~-80、より好ましくは約-30~-50、最も好ましくは約-35~-45に維持する。

## 【0061】

B)還元剤も冷却してから、メイタンシノイドC-3エステルの冷却溶液に移し入れる。反応液を、不活性ガス雰囲気下および低温に維持し、撹拌する。

## 【0062】

好ましくは還元剤は、水素化リチウムトリメトキシアルミニウム( $\text{LiAl}(\text{OMe})_3\text{H}$ )、水素化リチウムトリエトキシアルミニウム( $\text{LiAl}(\text{OEt})_3\text{H}$ )、水素化リチウムトリプロポキシアルミニウム( $\text{LiAl}(\text{OPr})_3\text{H}$ )、水素化ナトリウムトリメトキシアルミニウム( $\text{NaAl}(\text{OMe})_3\text{H}$ )、水素化ナトリウムトリエトキシアルミニウム( $\text{NaAl}(\text{OEt})_3\text{H}$ )または水素化ナトリウムトリプロポキシアルミニウム( $\text{NaAl}(\text{OPr})_3\text{H}$ )である。より好ましくは還元剤は、水素化リチウムトリメトキシアルミニウム( $\text{LiAl}(\text{OMe})_3\text{H}$ )である。好ましくは、還元剤は、ドライアイス-アセトン浴で約-30~-40まで冷却する。好ましくは、冷却した還元剤を、カニューレを介してメイタンシノイドC-3エステルの冷却溶液に移し入れる。好ましくは前記不活性ガスはアルゴン、窒素またはヘリウムである。ただし、他のガスも使用

10

20

30

40

50

可能である。より好ましくは不活性ガスはアルゴンである。

【0063】

好ましくは還元剤は、メイタンシノイドC-3エステル1モル当たり約5~100当量、より好ましくは約7.5~30当量/モル、最も好ましくは約10~20当量/モルの濃度で使用する。当業者であれば、メイタンシノイドC-3エステル1モル当たり約100当量を超える量で還元剤を使用すると、望ましくない副生成物が生じる場合があることは明らかであろう。好ましくは還元剤は、約5~40分間、より好ましくは約7~20分間、最も好ましくは約8~12分間の時間をかけて、メイタンシノイドC-3エステルの冷却溶液に加える。好ましくは反応液は、不活性ガス雰囲気下、約-25~-80、より好ましくは約-27~-45、最も好ましくは約-30~-35の温度範囲に維持する。好ましくは反応液は、約30分間~3時間、より好ましくは約3時間攪拌する。

10

【0064】

当業者であれば、使用する還元剤の量、反応時に維持される温度、還元剤を加える時間の長さおよび反応時間は、それぞれ互いに依存していることは明らかであろう。例えば、還元剤の量が少ないほど、反応時間は長くなる。同様に、温度が低いほど、より過剰量の還元剤が必要となり、反応を完結させるのに要する時間が長くなる。さらに、還元剤を加える速度が遅くなるほど、反応を完結させるのに要する反応時間が長くなる。

【0065】

C) 反応停止を行い、抽出し、脱水し、濾過する。溶媒を減圧留去して、粗メイタンシノールを得る。

20

【0066】

好ましくは反応停止は、飽和塩化ナトリウム溶液、水または塩化アンモニウム溶液を加えることで行い、より好ましくは飽和塩化ナトリウム溶液を加えるで行う。好ましくは反応停止は、使用するメイタンシノイドエステル1g当たり前記溶液約20~40mLを用いて行う。好ましくは反応液は、酢酸エチル、塩化メチレン、トルエン、クロロホルムまたはエーテルで抽出し、より好ましくは酢酸エチルで抽出する。好ましくは反応液は、使用するメイタンシノイド1g当たり約4×80~4×200mLの速度で抽出する。好ましくは、合わせた酢酸エチル抽出液を硫酸ナトリウムまたは硫酸マグネシウム、より好ましくは硫酸ナトリウムで脱水し、濾過する。

【0067】

30

D) 得られた粗メイタンシノール(2)は、必要に応じてクロマトグラフィーによって精製することができる。

【0068】

好ましい実施形態では、粗メイタンシノール(2)は、それを最小量の酢酸エチル、塩化メチレン、エーテル、クロロホルムまたはトルエン、より好ましくは酢酸エチルに溶かし、塩化メチレン、クロロホルム、酢酸エチルまたはトルエン、より好ましくは塩化メチレンを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行うことで精製することができる。好ましくはメイタンシノール(2)は、塩化メチレンもしくは酢酸エチルから出発する段階的濃度勾配で、または塩化メチレン：酢酸エチル：アルコール、クロロホルム：酢酸エチルもしくはトルエン：酢酸エチル、好ましくは体積比77:23:0の塩化メチレン：酢酸エチル：アルコールの混合液で溶離する。アルコールの濃度を、0%から約20%まで、好ましくは0%から約10%まで徐々に上昇させる。所望の生成物を含む分画をまとめ、減圧下に溶媒留去して、純粋なメイタンシノール(2)を白色固体として得る。精製は周囲温度で行うことができる。好ましくは、精製は、約20~約25の温度で行う。好ましくは、前記アルコールは、メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、n-、イソ-、sec-もしくはtert-ブタノールであり、より好ましくはメタノールである。

40

【0069】

別の好ましい実施形態では、粗メイタンシノール(2)は、移動相に有機溶媒を用いる順相で溶離を行うシアノ結合シリカHPLCカラムを用いて精製することができる。粗メイタンシノール(2)を酢酸エチル、酢酸エチル：イソプロパノール：ヘキサン(移動相)または酢

50

酸エチル・イソプロパノール、好ましくは酢酸エチルに溶かし、カラムに注入し、該当するピークを回収する。好ましくは、分離に使用するシアノ結合HPLCカラムは、シリカ骨格に安定に結合したシアノプロピル基およびシアノ・ジイソプロピル基を有するものである。そのようなカラムは、数例挙げると、商品名ジアゼム (Diazem; 商標名)、ゾルバックス (Zorbax; 商標名)、モノクロム (Monochrom; 商標名) およびクロマジル (Kromasil; 商標名) で入手可能である。好ましくは移動相で使用される有機溶媒は、ヘキサン:2-プロパノール:塩化メチレン:酢酸エチルである。好ましくはその有機溶媒の各成分の濃度は、それぞれ体積比65~75:2~4:15~20:5~10の範囲である。より好ましくはその有機溶媒の各成分の濃度は、体積比72:3:18:7である。

【0070】

好ましくは、この方法によって精製されたメイトンシノール(2)は、少なくとも90%の純度、より好ましくは少なくとも95%の純度のものである。当業者であれば、純度90%未満のメイトンシノール(2)をその後の工程で用いると、追加の精製工程が必要になる場合があることは明らかであろう。

【0071】

当業者であれば、前記還元反応によって、メイトンシノール(2)以外に、少量の望ましくない副生成物が生じる場合があることは明らかであろう。従って、その混入物を除去するために精製を行う必要が生じる場合がある。しかしながら、詳細な時間、温度および量が確立している場合のように、副生成物が生じない場合は、精製工程は必要ない。

【0072】

工程2: 連結基を有するメイトンシノール(2)のエステルの合成

次に、工程1で得られた(2)を、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)および塩化亜鉛存在下に、ジスルフィドを含むN-メチル-L-アラニン誘導体6a-gまたはN-メチル-L-システイン誘導体9a-bでエステル化して、ジスルフィド連結基を有するメイトンシノールのL-およびD-アミノアシルエステル10a-gおよび12a-bを得る。これらの立体異性体を分離し、L-アミノアシルエステルを回収する。このエステル化反応により、アミノ酸誘導体6a-gおよび9a-bのキラル中心で何らかのエピマー化が生じることから、当業者であれば、前記立体異性体に代えて、工程2で6a-gおよび9a-bのラセミ体(すなわち、D、L-混合物)を用いることが可能であることは明らかであろう。

【0073】

A) 1実施形態において、ジスルフィド基を有するN-メチル-L-アラニン誘導体6a-gは、各種鎖長の $\alpha$ -メルカプト-カルボン酸3a-eを、メタンチオールスルホン酸メチルまたはジフェニルジスルフィドなどのアリールジスルフィド、ならびに環置換ジフェニルジスルフィドおよび2,2'-ジチオピリジンなどの複素環ジスルフィドと反応させることで、それらの個々のメチルジチオ誘導体、例えば4a-e(nは1~4であり、分岐および環状の脂肪族化合物を含む)またはアリール-ジチオ誘導体、例えば5a-bに変換することによって製造される。これらのカルボン酸を次に、N-メチル-L-アラニンと反応させて、ジスルフィド基を有する所望のN-メチル-L-アラニン誘導体6a-gを形成する。それをメイトンシノール(2)と縮合させて、ジスルフィド連結基を有するメイトンシノイド10a-gを形成する。

【0074】

N-メチル-L-アラニンは、文献記載の方法(Fu, S. J. & Birnbaum, S. M., 75 J. Amer. Chem. Soc., 918 (1953)参照)に従って製造することができるか、あるいは市販されている(Sigma Chemical Company)。

【0075】

好ましくは、ジスルフィド基を有するN-メチル-L-アラニン誘導体は、N-メチル-N-メチルジチオアセチル-L-アラニン、N-メチル-N-(3-メチルジチオ-プロパノイル)-L-アラニン、N-メチル-N-(4-メチルジチオ-ブタノイル)-L-アラニン、N-メチル-N-(3-メチルジチオ-ブタノイル)-L-アラニン、N-メチル-N-(5-メチルジチオ-ペンタノイル)-L-アラニン、N-メチル-N-(3-フェニルジチオ-プロパノイル)-L-アラニンおよびN-メチル-N-[3-(4-ニトロフェニルジチオ)-プロパノイル]-L-アラニンである。

## 【0076】

B)別の実施形態では、N-メチル-L-システイン(7a)またはN-メチル-L-ホモシステイン(7b)を個々のジスルフィド誘導体8a-b(それぞれn=1および2)に変換することができ、次にそれをアシル化して、ジスルフィド基を有するN-メチル-L-システインまたはN-メチル-L-ホモシステイン誘導体9a-b(それぞれn=1および2)を得る。これらのジスルフィド含有誘導体9a-bを、メイタンシノール(2)と縮合させることで、ジスルフィド連結基を有するメイタンシノイド12a-bを形成する。

## 【0077】

N-メチル-L-システインは、Undheimらの報告(UndheimおよびEidem, 23 Acta Chem. Scand. 3129-3133 (1970))に記載の方法に従って製造することができる。

10

## 【0078】

好ましくはジスルフィド基を有するN-メチル-L-システイン誘導体は、N-アセチル-N-メチル-メチルジチオシステイン(9a)およびN-アセチル-N-メチル-メチルジチオホモシステイン(9b)である。

## 【0079】

C)最初に、ジスルフィド基を有するN-メチル-L-アラニンまたはN-メチル-L-システイン誘導体(6a-gおよび9a-b)の溶液を調製することで、メイタンシノール(2)をそのジスルフィド含有誘導体でエステル化する。その溶液を不活性ガス雰囲気下で攪拌し、それを(a)DCCまたはEDC([3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸塩)、好ましくはDCC溶液、(b)ZnCl<sub>2</sub>溶液および(c)メイタンシノール溶液の順で処理する。反応が完結するまで混合物を攪拌する。反応完結後、それを濾過し、濾液を減圧下に溶媒留去して、メイタンシノールのL-およびD-アミノアシルエステル10および12の混合物を得る。

20

## 【0080】

前述のように、このエステル化反応により、アミノ酸誘導体6a-gおよび9a-bのキラル中心で何らかのエピマー化が生じることから、当業者であれば、前記立体異性体に代えて、6a-gおよび9a-bのラセミ体(すなわち、D、L-混合物)を用いることが可能であることは明らかであろう。

## 【0081】

好ましくは、ジスルフィド基を有するN-メチル-L-アラニンまたはN-メチル-L-システイン誘導体は、それぞれN-メチル-N-(メチルジチオ-プロパノイル)-L-アラニン(6b)およびN-アセチル-N-メチル-メチルジチオシステイン(9a)である。好ましくは、ジスルフィド含有誘導体の溶液は、無水塩化メチレン、テトラヒドロフランまたはエーテル、好ましくは無水塩化メチレンを含むものであり、それはメイタンシノール1 g当たり約10~50 mL、好ましくは20 mL/gで用いる。好ましくは不活性ガスはアルゴン、窒素またはヘリウムである。ただし、他のガスも使用可能である。より好ましくは不活性ガスはアルゴンである。

30

## 【0082】

好ましくはDCCまたはEDCは、塩化メチレン溶液、テトラヒドロフラン溶液またはエーテル溶液、好ましくは塩化メチレン溶液とし、その溶媒はDCCまたはEDC 1 g当たり約10~15 mL、好ましくは12 mL/gで用いる。好ましくはDCCまたはEDC溶液は、メイタンシノール1モル当たり約5~7モルの割合で加える。好ましくはZnCl<sub>2</sub>は約1 Mであり、それはエーテル溶液または塩化メチレン溶液、好ましくはエーテル溶液で、メイタンシノール1モル当たり約1.2~1.5モル、好ましくは1.25モルで用いる。好ましくはメイタンシノールは、塩化メチレン溶液、テトラヒドロフラン溶液またはエーテル溶液、より好ましくは塩化メチレン溶液であり、溶媒はメイタンシノール1 g当たり約10~120 mL、好ましくは100 mL/gで用いる。反応混合物は、4~30℃、好ましくは室温で、1~24時間、好ましくは3時間攪拌する。当業者であれば、反応が必要とする攪拌時間の長さは温度によって決まるものであり、温度が低いほど反応時間が長くなることは明らかであろう。

40

## 【0083】

D)L-およびD-アミノアシルメイタンシノールエステル10a-gおよび12a-bの分離は、移動相に有機溶媒を用いる順相で分離を行うシアノ結合シリカHPLCカラムによって行う。酢酸エ

50

チルまたはヘキサン：2-プロパノール：酢酸エチルに溶かしたL-およびD-アミノアシルメイタンシノールエステル混合物をカラムに注入する。移動相を調節して、これら2種類の異性体の保持時間の間隔が10分を上回るようにすることができる。

【0084】

別法として、シリカゲルクロマトグラフィーを用いて分離を行うことができるが、その方法は工業的規模に変換するのが容易ではない。分離は、キラルカラムまたはシリカカラムを用いるHPLCなどの他の手段によって行うこともできるが、それはあまり望ましいものではない。

【0085】

この分離に使用されるシアノ結合HPLCカラムは、シリカ骨格に安定に結合したシアノプロピル基およびシアノ-ジイソプロピル基を有するものである。そのようなカラムは、特に商品名Diazem（商標名）、Zorbax（商標名）、Monochrom（商標名）およびKromasil（商標名）で入手可能である。好ましくは移動相で使用される有機溶媒は、ヘキサン：2-プロパノール：酢酸エチルである。好ましくは分離の収率は約90%を超えるものであり、生成物は少なくとも約95%の純度のものであり、より好ましくは光学的に純粋なものである。上記の条件下では、所望のL-異性体は約36～46分、好ましくは42分の保持時間を有し、D-異性体は約50～60分、好ましくは56分で溶出する。好ましくはこのエステル化は、約25で行う。

【0086】

工程3：チオール含有メイタンシノイド11a-gおよび13a-bの合成

チオール含有メイタンシノイド11a-gおよび13a-bを得るには、工程2から得られたL-アミノアシルメイタンシノールエステルを、溶媒およびアルコールを含む溶液に溶かす。その混合物を不活性ガス雰囲気下で攪拌し、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）を含むジチオトレイトールまたはジチオエリスリトールの緩衝液溶液で処理する。反応の進行はHPLCによってモニタリングすることができ、通常は3時間以内に完結する。ただしそれは1～24時間の範囲で変動し得る。反応完結した反応液を、EDTAを含む緩衝液で処理し、抽出する。有機層を合わせ、洗浄および脱水を行う。溶媒を留去することで粗チオール含有メイタンシノイド11a-gおよび13a-bの残留物が得られ、それを分取シアノ結合シリカHPLCカラムを用いて精製することができる。生成物を含む分画を溶媒留去して、純粋なチオール含有メイタンシノイドを白色固体として得ることができる。

【0087】

好ましくは、工程2で得られたL-アミノアシルメイタンシノールエステルを溶かす溶媒は、酢酸エチル、塩化メチレンまたはエーテル、より好ましくは酢酸エチルであり、溶媒はメイタンシノイド1g当たり約60～80mL、好ましくは72mL/gで使用する。好ましくは、工程2から得られたL-アミノアシルメイタンシノールエステルを溶かすアルコールはメタノールまたはエタノール、より好ましくはメタノールであり、アルコールはメイタンシノイド1g当たり約90～120mL、好ましくは108mL/gで使用する。好ましくは、L-アミノアシルメイタンシノールエステルとジチオトレイトールとの間の反応は、酢酸エチル：メタノール：緩衝水溶液の混合物であって、緩衝塩、ジチオトレイトールおよびメイタンシノイド類（還元型および未還元型）を溶液の状態に維持できる混合物中で行う。より好ましくはL-アミノアシルメイタンシノールエステルとジチオトレイトールとの間の反応は、酢酸エチル：メタノール：緩衝水溶液の1：5：1混合物中で行う。

【0088】

好ましくは工程3で用いるL-アミノアシルメイタンシノールエステルの濃度は約4g/L未満として、L-アミノアシルメイタンシノールエステルが溶解状態に維持されるようにする。

【0089】

好ましくはこの還元反応は、酸素を含まない雰囲気下で行う。好ましくは不活性ガスはアルゴン、窒素またはヘリウムである。ただし他のガスも使用可能である。より好ましくは不活性ガスはアルゴンである。

【0090】

好ましくはこの還元反応は、4～30℃、より好ましくは室温で行う。当業者であれば、この反応がそれより低い温度で実施可能であるが、反応完結に要する時間が長くなるということとは明らかであろう。

【0091】

好ましくは、L-アミノアシルメイタンシノールエステルを含む溶液を、ジチオトレイトール、ジチオエリスリトールまたはトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)などのホスフィン試薬、より好ましくはジチオトレイトールで処理し、還元剤はメイタンシノイド1モル当たり約2～3モル、好ましくは2.5モル/モルでリン酸カリウム緩衝液、リン酸ナトリウム緩衝液もしくはトリエタノールアミン緩衝液、好ましくはリン酸カリウム緩衝液中で使用し、その緩衝液の濃度は約20～100 mM、好ましくは50 mMとし、緩衝DTTの量はメイタンシノイド1 g当たり60～80 mL、好ましくは72 mL/gとし、約1～10 mM、好ましくは2 mMのエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を含有させる。

【0092】

好ましくは、反応完結した反応液を、0.2 Mのリン酸カリウム緩衝液、リン酸ナトリウム緩衝液もしくはトリエタノールアミン緩衝液、好ましくはリン酸カリウム緩衝液で処理し、緩衝液はメイタンシノイド1 g当たり約120～160 mL、好ましくは144 mL/gで用い、約1～10 mM、好ましくは2 mMのEDTAを含有させる。好ましくは抽出は、酢酸エチル、塩化メチレンまたはエーテル、より好ましくは酢酸エチルで行い、溶媒はメイタンシノイド1 g当たり200～500 mL、好ましくは300 mL/gの量で使用し、抽出を3回繰り返す。好ましくは、合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム溶液、水または飽和塩化アンモニウム溶液、より好ましくは飽和塩化ナトリウム溶液で、メイタンシノイド1 g当たり40-100 mL、好ましくは50 mL/gの量にて洗浄し、次に硫酸ナトリウムまたは硫酸マグネシウム、好ましくは硫酸ナトリウムで脱水する。

【0093】

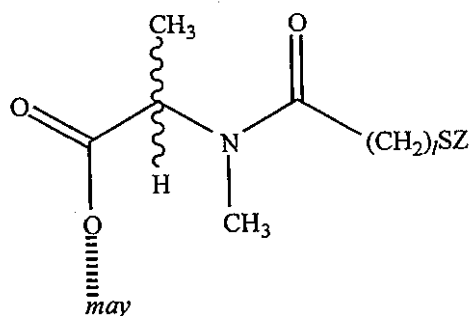
好ましくは、分離に用いられるシアノ結合HPLCカラムは、シリカ骨格に安定に結合したシアノプロピル基およびシアノ-ジイソプロピル基を有するものである。そのようなカラムは、数例挙げると、商品名Diazem(商標名)、Zorbax(商標名)、Monochrom(商標名)およびKromasil(商標名)で入手可能である。より好ましくは、Diazem分取CNカラム(250 mm×50 mm、粒径10ミクロン)を用いる。好ましくは移動相で使用される有機溶媒は、ヘキサン：2-プロパノール：酢酸エチルである。より好ましくは、移動相で用いられる有機溶媒は、ヘキサン：2-プロパノール：酢酸エチルの78.0：5.5：16.5(体積比)混合物である。好ましくは流量は150 mL/分である。好ましくは、分離収率は75%より高く、生成物は少なくとも約90%の純度を有し、より好ましくは少なくとも約95%の純度を有する。好ましくは所望のチオール含有メイタンシノイド11a-dおよび13a-bは、保持時間16分を有し、約14～18分の範囲内である。

【0094】

本発明によるN-メチル-L-アラニン含有メイタンシノイド誘導体の具体例は、下記式(I)-(IV)によって表されるものである。

【0095】

【化1】



(I)

10

20

30

40

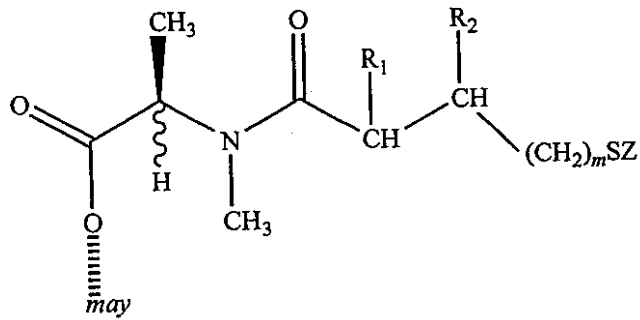
50



[ 式中、Z はHまたはSRを表し； R はメチル、直鎖アルキル、分岐アルキル、環状アルキル、単純もしくは置換アリールまたは複素環基を表し； l は1～10の整数を表し； mayはメイタンシノイドを表す ] ；

【 0 0 9 6 】

【 化 2 】

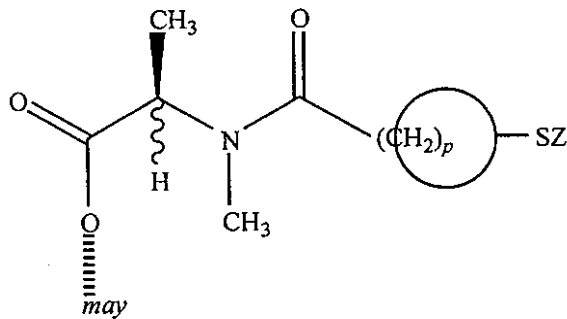


10

[ 式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は同一でも異なっても良く、H、CH<sub>3</sub>またはCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>を表し； Z はHまたはSRを表し； R はメチル、直鎖状アルキル、分岐状アルキル、環状アルキル、単純もしくは置換アリールまたは複素環を表し； m は0、1、2または3を表し； mayはメイタンシノイドを表す ] ；

【 0 0 9 7 】

【 化 3 】

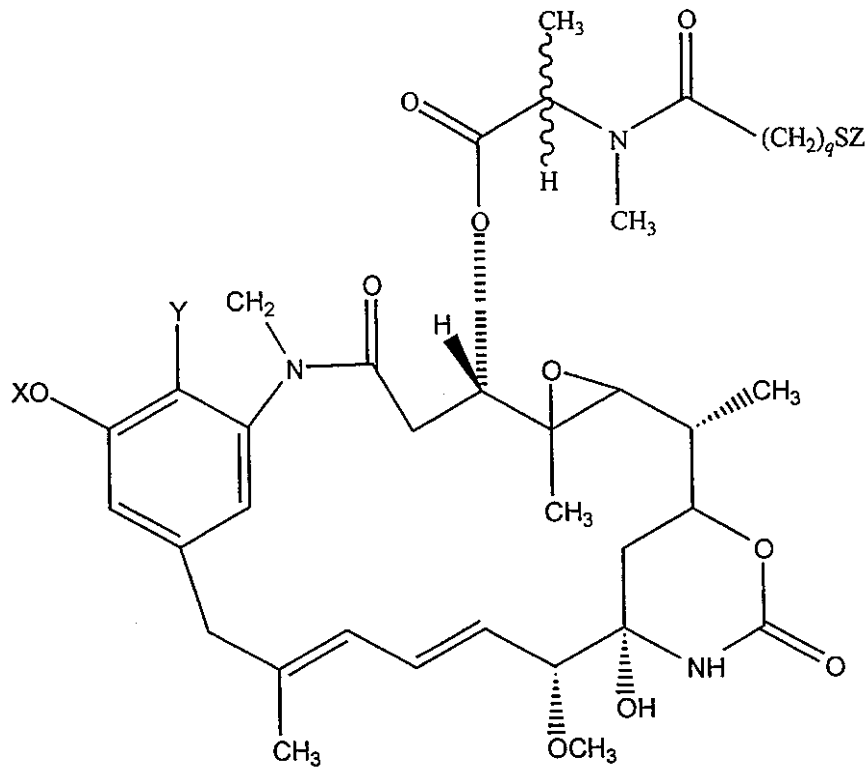


30

[ 式中、Z はHまたはSRを表し； R はメチル、直鎖状アルキル、分岐状アルキル、環状アルキル、単純もしくは置換アリールまたは複素環を表し； p は3～8の整数を表し； mayはメイタンシノイドを表す ] ；

【 0 0 9 8 】

【 化 4 】



10

20

## (IV)

[ 式中、Z はHまたはSRを表し；R はメチル、直鎖状アルキル、分岐状アルキル、環状アルキル、単純もしくは置換アリールまたは複素環を表し；q は1～10の整数を表し；Y はC、IまたはHを表し；X はHまたはCH<sub>3</sub>を表す ]。

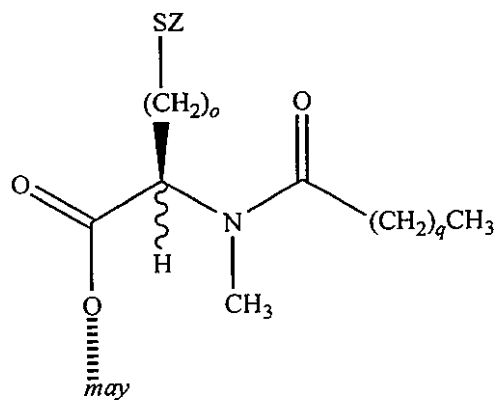
【 0 0 9 9 】

本発明で有用なN-メチル-L-システイン含有メイタンシノイド誘導体の具体例は、下記式(V)および(VI)によって表される。

【 0 1 0 0 】

30

【 化 5 】



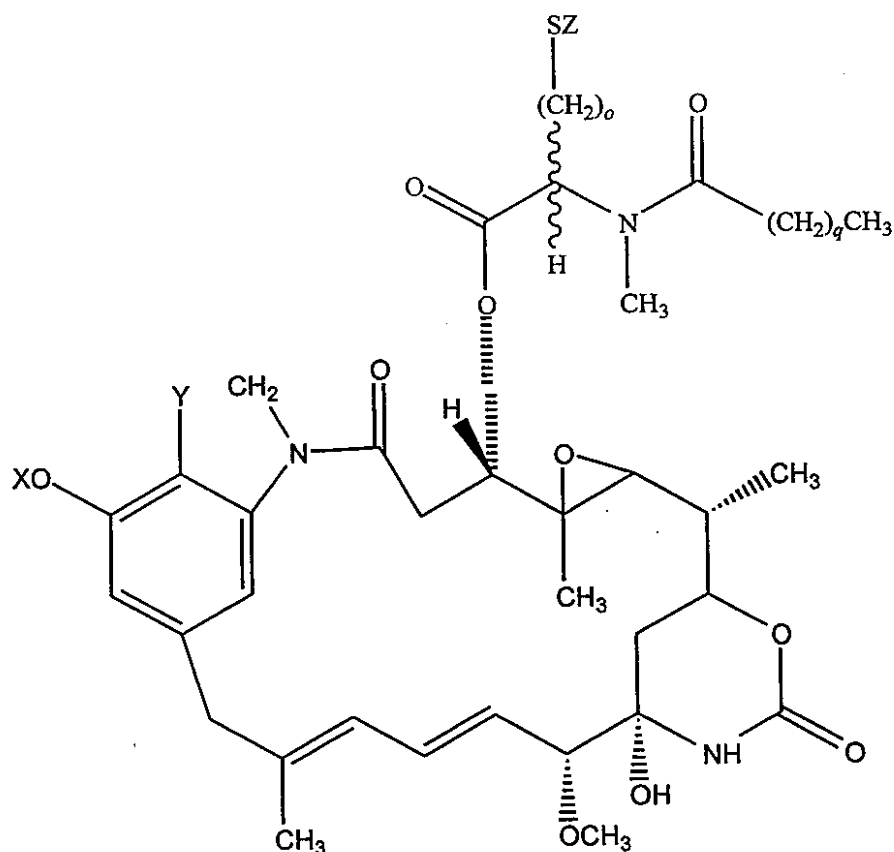
40

## (V)

[ 式中、Z はHまたはSRを表し；R はメチル、直鎖状アルキル、分岐状アルキル、環状アルキル、単純もしくは置換アリールまたは複素環を表し；o は1または2を表し；q は0または1～10の整数を表し；mayはメイタンシノイドを表す ] ；

【 0 1 0 1 】

【 化 6 】



## (VI)

[ 式中、Z はHまたはSRを表し；R はメチル、直鎖状アルキル、分岐状アルキル、環状アルキル、単純もしくは置換アリールまたは複素環を表し；o は1または2を表し；q は0または1～10の整数を表し；Y はClまたはHを表し；X はHまたはCH<sub>3</sub>を表す ]。

## 【 0 1 0 2 】

直鎖状アルキルの例には、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチルおよびヘキシルなどがある。

## 【 0 1 0 3 】

分岐状アルキルの例には、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、イソペンチルおよび1-エチル-プロピルなどがある。

## 【 0 1 0 4 】

シクロアルキルの例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチルおよびシクロヘキシルなどがある。

## 【 0 1 0 5 】

単純アリールの例としては、フェニルおよびナフチルなどがある。

## 【 0 1 0 6 】

置換アリールの例としては、アルキル基、Cl、Br、Fなどのハロゲン、ニトロ基、アミノ基、スルホン酸基、カルボン酸基、水酸基およびアルコキシ基によって置換された上記のもののようなアリールなどがある。

## 【 0 1 0 7 】

複素環の例としては、ヘテロ原子がO、NおよびSから選択される化合物であり、ピロリル、ピリジル、フリルおよびチオフェンなどがある。

## 【 0 1 0 8 】

## 定義

本明細書で使用する場合、「室温」および「周囲温度」という用語は、環境温度または未

10

20

30

40

50

制御の温度を意味する。「光学純度」という用語は、純度が98%を超えることを意味している。本明細書において例えば温度、時間、濃度などで範囲が具体的に示されている場合、その範囲は、その範囲内の全ての具体値、ならびにその広い範囲に含まれる小範囲を含む。値を具体値に「約」を付して、あるいは値の範囲で記載する場合、理解しておくべき点として、その値の統計的に有意性のない変動も含まれる。

【0109】

#### 実施例

以下、実施例にて本発明を説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。別段の断りがない限り、パーセント表示、比率、部表示などはいずれも重量基準である。

【0110】

#### 実施例1 - チオール含有メイタンシノイド誘導体の合成

融点は、電熱融点計で測定した。プロトン磁気共鳴 ( $^1\text{H}$  NMR) スペクトルは、60 MHzのVarian (登録商標) EM360分光計または300 MHzのBruker (登録商標) AM300装置で得た。化学シフトは、内部テトラメチルシラン (TMS) 標準に対する値で報告している。UVスペクトルは、Perkin Elmer (登録商標) 4A分光光度計で記録した。旋光度は、Perkin Elmer (登録商標) 241型旋光計を用いて測定した。HPLC分析および精製には、波長もしくはダイオードアレイUV検出器およびWaters (登録商標) Radialpak C-18カラムまたはDiazem (登録商標) シアノカラムもしくはChromasil (登録商標) シアノカラムを搭載したRainin (登録商標) HP、Hewlett Packard (登録商標) またはHitachi (登録商標) の装置を用いた。元素分析は、Atlantic Microlabs, Atlanta, Gaが行った。

【0111】

2-メルカプト酢酸 (3a)、3-メルカプトプロパン酸 (3b) および4-メルカプトブタン酸 (3c) は市販されている。

【0112】

5-メルカプトペンタン酸 (3d)。5-メルカプトペンタン酸 (3d) は、文献の方法 (Khimら, 37 J. Org. Chem. 2714-2720 (1972)) の変法によって製造した。5-プロモペンタン酸 (1.80 g, 0.01 mol) の無水エタノール (25 mL) 攪拌溶液に、チオ尿素 (0.761 g, 0.01 mol) を加え、反応混合物を6時間還流させた。次いで50% NaOH水溶液 (20 mL) を加え、混合物をさらに2時間還流させた。次に混合物を水 (100 mL) で希釈し、酸性とし (HCl水溶液)、酢酸エチルで抽出した (50 mLで4回)。合わせた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で蒸発させた。残留物について、塩化メチレン / 酢酸エチルで溶出するシリカゲルでのクロマトグラフィーを行って、無色液体0.885 g (66%) を得た。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.3 (1H, t), 1.6 (4H, m), 2.4 (4H, m), 11.5 (1H, s)。

【0113】

3-メルカプトブタン酸 (3e)。市販の  $\alpha$ -ブチロラクトン (3.0 g, 35.0 mmol) のテトラヒドロフラン (20 mL) 溶液を、ジイソプロピルエチルアミン (10.0 g, 77.5 mmol) に加えた。反応混合物をアルゴン雰囲気下で攪拌し、チオ酢酸 (3.0 g, 39.0 mmol) で処理した。反応混合物を室温で6時間攪拌した。次いで溶媒を蒸発させ、生成物について、3%酢酸を含むエチル：ヘキサン (体積比3:1) を用いて溶出するシリカゲルでのカラムクロマトグラフィー精製を行った。3eのチオアセテート誘導体を無色油状物として得た (2.0 g、収率35%)。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.5 (3H, d), 2.3 (3H, s), 2.8 (2H, d), 4.0 (1H, m) および11.3 (1H, s)。このチオアセテートを、塩基加水分解によってチオール3eに変換した。チオアセテート (1.5 g, 9.3 mmol) のメタノール (6 mL) 溶液を、3.3 M水酸化ナトリウム水溶液 (10 mL) で処理した。反応物をアルゴン雰囲気下で攪拌した。反応の進行をTLCによってモニタリングし、3時間以内に完了したものと判断した。1 M塩酸 (40 mL) を加えることで反応混合物を酸性とし、酢酸エチル (70 mL) で抽出した。有機抽出物を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で蒸発して3-メルカプトブタン酸 (3e) を得た。それをそれ以上精製せずに、4eの合成に用いた。

【0114】

メチルジチオ - 酢酸 (4a)。氷浴で冷却したメルカプト酢酸 (3a) (3.0 g, 0.0326 mmol) の

水溶液（水100 mL）の撹拌したものに、メタンチオスルホン酸メチル（4.52 g、0.036 mol）の無水エタノール（40 mL）溶液を加えた。反応混合物を昇温させて室温とし、終夜撹拌した。次いで反応混合物を飽和NaCl水溶液（300 mL）で希釈し、ジエチルエーテルで抽出した（100 mLで3回）。合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム（100 mL）で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥し、濾過した。濾液を減圧下で蒸発し、残留物を減圧蒸留して、4aを無色油状物として得た（2.90 g、収率64%）。沸点<sub>1mm</sub> = 100。 $^1\text{H}$  NMR: 2.4 (3H, s), 3.5 (3H, s)および10.2 (1H, s)。

## 【0115】

3-メチルジチオ-プロパン酸(4b)。氷浴で冷却した3-メルカプトプロパン酸(3b)（5.00 g、0.047 mol）の水溶液（水150 mL）の撹拌したものに、メタンチオスルホン酸メチル（6.54 g、0.052 mol）の無水エタノール（75 mL）溶液を加えた。反応混合物を室温で終夜撹拌した。次いで混合物を飽和NaCl水溶液（400 mL）で希釈し、エーテルで抽出した（150 mLで3回）。合わせたエーテル抽出物を飽和NaClで洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥し、濃縮した。残留物を蒸留して、無色液体を得た（6.47 g、収率90%）。沸点<sub>1.0</sub> 105。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) 2.3 (3H, s), 2.8 (4H, m), 11.2 (1H, s)。

## 【0116】

4-メチルジチオ-ブタン酸(4c)。ビス-(3-カルボキシプロピル)-ジスルフィド（1.00 g、4.20 mmol）のメタノール（20 mL）撹拌溶液に、ジチオトレイトール（0.647 g、4.20 mmol）の $\text{H}_2\text{O}$ （20 mL）溶液を加えた。次に、10 M NaOH溶液（0.842 mL、8.42 mmol）を加え、混合物を室温で終夜撹拌して、還元を完結させた。メタンチオスルホン酸メチル（1.17 g、9.24 mmol）を加え、反応混合物をさらに3時間撹拌した。次いで混合物を飽和NaCl水溶液（150 mL）で希釈し、酸性とし（HCl水溶液）、エチルエーテルで抽出した（100 mLで3回）。合わせた有機層を飽和NaClで洗浄し、乾燥し（ $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ）、濃縮し、濃縮物について、塩化メチレン/酢酸エチルを用いて溶出するシリカゲルでのクロマトグラフィーを行って、透明液体0.867 g（56%）を得た。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) 2.1 (2H, m), 2.4 (3H, s), 2.4 (2H, m), 2.7 (2H, m), 11.1 (1H, s)。

## 【0117】

5-メチルジチオ-ペンタン酸(4d)。5-メルカプトペンタン酸(3d)（0.500 g、3.73 mmol）の水溶液（水20 mL）の撹拌したものに、メタンチオスルホン酸メチル（0.517 g、4.10 mmol）の無水エタノール（5 mL）溶液を加え、混合物を室温で3時間撹拌した。次いで混合物を飽和NaCl水溶液（100 mL）で希釈し、エチルエーテルで抽出した（100 mLで3回）。合わせた有機層を飽和NaClで洗浄し、乾燥し（ $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ）、減圧下で蒸発し、濃縮物について、塩化メチレン/酢酸エチルを用いて溶出するシリカでのクロマトグラフィーを行って、白色結晶0.602 g（90%）を得た。融点42~44。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.7 (4H, m), 2.4 (3H, s), 2.4 (2H, m), 2.7 (2H, m), 11.1 (1H, s)。

## 【0118】

3-メチルジチオ-ブタン酸(4e)。3e（1.1 g、9.3 mmol）の酢酸エチル（10 mL）溶液を、ジイソプロピルエチルアミン（3.4 g、27 mmol）およびメタンチオスルホン酸メチル（1.5 g、12.0 mmol）の無水エタノール（8 mL）溶液の順で処理した。反応混合物をアルゴン下にて室温で3時間撹拌した。溶媒を蒸発させ、残留物を3 M塩酸（15 mL）で処理し、酢酸エチル（40 mL）で抽出した。有機層を分離し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、蒸発させた。残留物について、3%酢酸を含む酢酸エチル：ヘキサン（体積比3:1）を用いて溶出するシリカゲルでのカラムクロマトグラフィー精製を行った。生成物4eを無色油状物として得た（0.61 g、収率40%）。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.4 (3H, d), 2.3 (3H, s), 2.8 (2H, d), 3.9 (1H, m)および11.5 (1H, s)。

## 【0119】

3-フェニルジチオ-プロパン酸(5a)。ジフェニルジスルフィド（3.0 g、13.8 mmol）のエーテル（10 mL）およびメタノール（20 mL）混合溶液の撹拌したものに、窒素雰囲気下にて室温で3-メルカプトプロパン酸(3b)（0.49 g、4.6 mmol）のエーテル（5 mL）溶液を加え、次に10 M NaOH溶液（0.46 mL、4.6 mmol）を加えた。反応混合物を室温で20時間撹拌

し、減圧下に溶媒を除去した。生成物について、酢酸エチル／ヘキサンを用いて溶出するシリカゲルでのカラムクロマトグラフィー精製を行った。生成物を白色固体として得た (0.56 g、56.6%)。融点57~59。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, TMS) 2.6-3.0 (4H, m), 7.1-7.6 (5H, m), 10.6 (1H, s)。

【0120】

3-(4-ニトロフェニルジチオ)-プロパン酸(5b)。THF (200 mL) およびメタノール(50 mL)の混合物に溶解したビス-(4-ニトロフェニル)-ジスルフィド(3.00 g、9.73 mmol)の攪拌溶液に、3-メルカプトプロパン酸(3b)(0.688 g、6.49 mmol)を加えた。次いで10 N NaOH溶液1滴を混合物に加え、反応物を1時間攪拌した。次に、反応混合物を飽和NaCl(100 mL)で希釈し、酢酸エチルで抽出した(75 mLで3回)。合わせた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で蒸発させ、生成物について、塩化メチレン／酢酸エチルを用いて溶出するシリカゲルでのクロマトグラフィーを行って、明黄色固体0.885 g (53%)を得た。融点98~100。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 2.8 (2H, m), 3.1 (2H, m), 7.8 (2H, d), 8.2 (2H, d)。

【0121】

N-メチル-N-メチルジチオアセトイル-L-アラニン(6a)。1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(2.99 g、15.6 mmol)およびトリエチルアミン(1.58 g、15.6 mmol)の無水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(40 mL)攪拌溶液に、0 でメチルジチオ-酢酸(Singhら, 104 Anal. Biochem. 51-58 (1980)(4a)(1.66 g、12.0 mmol)の脱水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(20 mL)溶液を加えた。4-ジメチルアミノピリジン(0.073 g、0.60 mmol)の無水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(2 mL)溶液を加え、混合物を0 で45分間攪拌した。次いでN-メチル-L-アラニン(0.619 g、6.00 mmol)とトリエチルアミン(0.607 g、6.00 mmol)との無水DMF(30 mL)中の混合物を加え、混合物を0 で2時間攪拌した。反応混合物を水(100 mL)で希釈し、さらに30分間攪拌し、次いで酸性とし(HCl水溶液)、酢酸エチルで抽出した(75 mLで4回)。合わせた有機層を水で数回洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し、減圧下にて蒸発させた。残留物について、塩化メチレン酢酸エチルを用いて溶出するシリカゲルでのクロマトグラフィーを行って、淡黄色油状物0.25 g (19%)を得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1.4 (3H, d), 2.4 (3H, s), 2.9, 3.0 (計3H, 2s), 3.6 (2H, s), 4.7, 5.2 (計1H, 2q), 9.8 (1H, s)。

【0122】

N-メチル-N-(3-メチルジチオ-プロパノイル)-L-アラニン(6b)。3-メチルジチオ-プロパン酸(4b)(1.00 g、6.57 mmol)の無水THF(20 mL)攪拌溶液に、アルゴン下にて-10 でクロロギ酸イソブチル(0.897 g、6.57 mmol)およびトリエチルアミン(0.665 g、6.57 mmol)を加え、反応混合物を15分間攪拌した。N-メチル-L-アラニン(0.677 g、6.57 mmol)とトリエチルアミン(1.33 g、13.14 mmol)との水(10 mL)中の混合物を加え、反応混合物を室温で終夜攪拌した。次いで混合物を水(50 mL)で希釈し、酸性とし(HCl水溶液)、酢酸エチルで抽出した(50 mLで4回)。合わせた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下で蒸発させ、残留物について、塩化メチレン／酢酸エチルを用いて溶出するシリカゲルでのクロマトグラフィーを行って、白色結晶0.556 g (34%)を得た。融点98~100。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1.3 (3H, d), 2.2 (3H, s), 2.7 (4H, m), 4.5 (1H, q), 10.7 (1H, s)。C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>S<sub>2</sub>についての元素分析計算値：C, 40.49; H, 6.37; N, 5.90; 分子量237.33。実測値：C, 40.42; H, 6.41; N, 5.93。

【0123】

N-メチル-N-(4-メチルジチオ-ブタノイル)-L-アラニン(6c)。4-メチルジチオ-ブタン酸(4c)(0.200 g、1.20 mmol)の無水THF(10 mL)攪拌溶液に、アルゴン下にて-20 でクロロギ酸(chloroformeta)イソブチル(0.164 g、1.20 mmol)およびトリエチルアミン(0.121 g、1.20 mmol)を加え、混合物を20分間攪拌した。次いでN-メチル-L-アラニン(0.124 g、1.20 mmol)とトリエチルアミン(0.243 g、2.40 mmol)との水(5 mL)中の混合物を加え、反応混合物を室温で5時間攪拌した。反応混合物を6bにおいて前述した方法に従って処理して、標題化合物を白色結晶として得た(0.135 g、44%)。融点92~93。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1.4 (3H, d), 2.0 (2H, m), 2.3 (3H, s), 2.7 (4H, m), 2.9 (3H,

s), 5.1 (1H, q), 10.5 (1H, s)。

【 0 1 2 4 】

N-メチル-N-(5-メチルジチオ-ペンタノイル)-L-アラニン(6d)。5-メチルジチオ-ペンタン酸(4d) (0.202 g、1.12 mmol) の無水THF (15 mL) 攪拌溶液に、アルゴン下にて-40 でクロロギ酸イソブチル (0.153 g、1.12 mmol) およびトリエチルアミン (0.113 g、1.12 mmol) を加え、反応混合物を-10 で20分間攪拌した。N-メチル-L-アラニン (0.116 g、1.12 mmol) とトリエチルアミン (0.227 g、2.24 mmol) との水溶液 (水5 mL) を加え、混合物を0 で5時間攪拌した。反応混合物を6bにおいて前述した方法に従って処理して、標題化合物を白色結晶として得た (0.196 g、66%)。融点84。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1.4 (3H, d), 1.8 (4H, m), 2.4 (3H, s), 2.7 (4H, m), 3.0 (3H, s), 5.2 (1H, q), 10.7 (1H, s)。

10

【 0 1 2 5 】

N-メチル-N-(3-フェニルジチオ-プロパノイル)-L-アラニン(6e)。3-フェニルジチオ-プロパン酸(5a) (1.8 g、8.4 mmol) の無水THF溶液を、窒素雰囲気下にて力強く攪拌し、冷却して-15 とした。クロロギ酸イソブチル (1.2 mL、9.25 mmol) およびトリエチルアミン (1.29 mL、9.25 mmol) を加え、反応混合物をその温度で10分間攪拌した。N-メチル-L-アラニン (0.87 g、8.4 mmol) とトリエチルアミン (1.29 mL、9.25 mmol) との水溶液 (水10 mL) を加え、反応混合物を-15 で15分間攪拌し、昇温させて室温とし、さらに2.5時間攪拌した。1 M HCl (10 mL) を加え、反応混合物を酢酸エチルで抽出した (50 mLで4回)。合わせた有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、減圧下で蒸発させた。粗混合物について、2%酢酸を含む酢酸エチル/ヘキサンを用いて溶出するシリカゲルでのカラムクロマトグラフィー精製を行って、6eを白色固体として得た (1.5 g、60%)。融点96~97。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>/TMS) 1.4 (2H, d), 2.7-3.0 (7H, m), 5.2 (1H, q), 7.2-7.6 (5H, m)。

20

【 0 1 2 6 】

N-メチル-N-[3-(4-ニトロフェニルジチオ)-プロパノイル]-L-アラニン(6f)。3-(4-ニトロフェニルジチオ)-プロパン酸(5b) (0.100 g、0.386 mmol) の無水THF (10 mL) 攪拌溶液に、アルゴン下にて-40 でクロロギ酸イソブチル (0.053 g、0.386 mmol) およびトリエチルアミン (0.039 g、0.38 mmol) を加え、反応物を0 で1時間攪拌した。次いでN-メチル-L-アラニン (0.040 g、0.386 mmol) とトリエチルアミン (0.039 g、0.386 mmol) との水溶液 (5 mL) を加え、混合物を0 で5時間攪拌した。混合物を水 (50 mL) で希釈し、酸性とし (HCl水溶液)、エチルエーテルで抽出した (25 mLで3回)。合わせた有機層を乾燥し (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過し、減圧下にて溶媒を蒸発させた。残留物について、塩化メチレン/酢酸エチルを用いて溶出するシリカゲルでのクロマトグラフィーを行って、黄色結晶0.048 g (36%) を得た。融点74~77。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1.4 (3H, d), 2.6-3.4 (4H, m), 2.9 (3H, s), 5.1 (1H, q), 7.6-8.3 (4H, 2d)。

30

【 0 1 2 7 】

N-メチル-N-(3-メチルジチオ-ブタノイル)-L-アラニン(6g)。4e (3.52 g、21.2 mmol) のテトラヒドロフラン (20 mL) 溶液を冷却して-20 とし、アルゴン雰囲気下にて攪拌した。次に、クロロギ酸イソブチル (3.48 mL、21.2 mmol) およびトリエチルアミン (3.7 mL、25.4 mmol) を加えた。反応混合物を-20 で15分間攪拌した。N-メチル-L-アラニン (2.74 g、26.6 mmol) の水溶液 (水5 mL) およびトリエチルアミン (7.4 mL、50.8 mmol) を加え、反応物を昇温させて室温とし、2時間攪拌した。反応混合物を水 (100 mL) で希釈し、1 M HClを加えることでpH 2の酸性とした。生成物を酢酸エチルで抽出した (50 mLで5回)。合わせた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、蒸発させた。残留物について、酢酸エチル:ヘキサン (体積比1:1) を用いて溶出するシリカゲルでのカラムクロマトグラフィー精製を行って、純粋な6gを白色固体として得た (0.69 g、収率12%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.3 (3H, d), 1.5 (3H, d), 2.41 (3H, s), 2.8 (2H, m), 3.0 (3H, s), 3.5 (1H, m) および5.3 (1H, m)。

40

【 0 1 2 8 】

50

メチルジチオ-N-メチルシステイン(8a)。N-メチルシステイン(7a) (Undhein, K., & Eidem, A., 23 Acta Chem. Scandinavica 3129-3133 (1970)) (1.5 g、11.1 mmol) のH<sub>2</sub>O (20 mL) 溶液を、アルゴン雰囲気下にて室温で攪拌し、メタンチオールスルホン酸メチル (3.0 mL、29.2 mmol) のエタノール (10 mL) 溶液で処理した。反応混合物をこの温度で2時間攪拌し、次いでH<sub>2</sub>O (100 mL) で希釈し、エーテルで洗浄した (40 mLで4回)。水層をpH 2の酸性とし、Amberlite IRA 93 (-OH型) カラムに通した。カラムを水で洗浄し、溶出物を回収し、減圧下にて蒸発させて乾固させることで、白色固体を得た (1.2 g、60%)。融点194~195。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, TMS外部標準): 2.2 (3H, s), 2.5 (3H, s), 3.2 (2H, d), 3.7 (1H, q)。

【0129】

10

メチルジチオ-N-メチルホモシステイン(8b)。当業者であれば、メチルジチオ-N-メチルシステイン(8a)の製造方法に基づいて、メチルジチオ-N-メチルホモシステイン(8b)の製造方法を理解できるものと考えられる。

【0130】

N-メチルホモシステイン(7b)は、N-メチルシステインについて既報の方法 (Undhein, K., & Eidem, A., 23 Acta Chem. Scandinavica 3129-3133 (1970)) によって製造することができる。

【0131】

N-アセチル-N-メチル-メチルジチオシステイン(9a)。N<sub>2</sub>雰囲気下にて-20 で、氷酢酸 (0.25 mL、4.4 mmol) の無水THF (4 mL) 溶液に、攪拌しながらクロロギ酸イソブチル (0.57 mL、4.4 mmol) およびトリエチルアミン (0.61 mL、4.4 mmol) を加えた。反応混合物をその温度で20分間攪拌し、次いでメチルジチオ-N-メチルシステイン(8a) (0.4 g、2.2 mmol) とトリエチルアミン (0.45 mL、3.3 mmol) とのH<sub>2</sub>O溶液で処理し、終夜攪拌した。次に混合物を水 (25 mL) で希釈し、HClでpH 2の酸性とし、酢酸エチルで抽出した (50 mLで4回)。合わせた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下にて蒸発させ、生成物を淡黄色固体として得た (0.2 g、55%)。融点137~138。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.1 (3H, s), 2.3 (3H, s), 3.0 (3H, s), 3.2 (2H, d) および4.8 (1H, q)。

20

【0132】

N-アセチル-N-メチル-メチルジチオホモシステイン(9b)。当業者であれば、N-アセチル-N-メチル-メチルジチオシステイン(9a)の製造方法に基づいて、N-アセチル-N-メチル-メチルジチオホモシステイン(8b)の製造方法を理解できるであろう。

30

【0133】

#### 工程1: アンサマイトシンP-3(1c)のメイタンシノールへの還元

還元的加水分解によって、アンサマイトシンP-3(1c)をメイタンシノール(2)に変換した。アンサマイトシンP-3(1c) (3.2 g、5.0 mmol) を無水THF (80 mL) に溶解し、得られた溶液をアルゴン雰囲気下に置き、ドライアイス-アセトン浴で冷却して-40 とした。

【0134】

別のフラスコに、水素化アルミニウムリチウム溶液 (75 mmol、1.0 MのTHF溶液75 mL) を入れた。溶液をアルゴン雰囲気下に置き、冷却して-40 とした。無水メタノール (9.1 mL、225 mmol) のTHF (40 mL) 溶液を、滴下漏斗を用いて滴下添加した。温度を-30 ~ -40 に維持し、添加完了後、反応混合物をさらに10分間攪拌した。得られた水素化トリメトキシアルミニウムリチウム (LiAlH(OMe)<sub>3</sub>H) 溶液を、カニューレを用いて、アンサマイトシンP-3(1c)の冷却溶液に10分間かけて移し入れた。アルゴン下にて反応温度を-30 ~ -35 に維持し、1時間攪拌した。

40

【0135】

飽和塩化ナトリウム (100 mL) を加えることで反応停止し、酢酸エチルで抽出した (400 mLで4回)。合わせた酢酸エチル抽出物を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過した。溶媒を減圧下にて蒸発させ、粗メイタンシノール(2)を得た。

【0136】

得られた粗生成物を酢酸エチルに溶解し、塩化メチレン中に充填したシリカゲルカラムに

50



負荷した。塩化メチレン：酢酸エチル：メタノール混合物（体積比77:23:0）から開始し、メタノール濃度を0%から10%まで徐々に上昇させる段階的勾配によってカラムの溶出を行った。所望の生成物を含む分画を集め、減圧下にて蒸発させ、純粋なメイタンシノールを白色固体として得た（収率71%）。

【0137】

得られたメイタンシノールは、以下のようにしてHPLCによってさらに精製した。Kromasil（登録商標）シアノ分取HPLCカラム（250 mm×50 mm、粒径10ミクロン）を、流量150 mL/分のヘキサン：2-プロパノール：塩化メチレン：酢酸エチル（体積比72:3:18:7）の混合物で平衡状態とした。メイタンシノールの溶液をカラム上に注入した。この条件下で、メイタンシノールの保持時間は22分であり、純度は>98%であった。

10

【0138】

工程2：N-メチル-N-メチルジチオアセトイル-L-アラニン(6a)によるメイタンシノール(2)のエステル化

N-メチル-N-メチルジチオアセトイル-L-アラニン(6a)（4.2 mg、0.017 mmol）の塩化メチレン（0.1 mL）溶液をアルゴン雰囲気下にて攪拌し、それをメイタンシノール（2 mg、0.0035 mmol）の塩化メチレン（0.2 mL）溶液、DCC（4.4 mg）の塩化メチレン（0.2 mL）溶液および1 M塩化亜鉛（0.0035 mmol）のエーテル溶液の順で処理した。反応物を75分間攪拌した。次いで反応混合物を濾過し、溶媒を蒸発させた。残留物を、6%メタノール/クロロホルムを用いたシリカゲルでの分取TLCによって精製して、所望のL-メイタンシノイドエステル10aを得た。

20

【0139】

化合物10aは、流量4.7 mL/分のヘキサン：2-プロパノール：酢酸エチル（体積比17:2:6）混合物で平衡状態としたDiazem（登録商標）シアノHPLCカラム（250 mm×10 mm、粒径10ミクロン）を用いて、より効果的に精製することができる。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) L-アミノアシル異性体(10a): 0.90 (3H, s), 1.3 (6H, d, d) 1.46-1.52 (1H, m), 1.60 (3H, s), 2.30 (1H, d), 2.50 (3H, s), 2.7 (1H, dd), 2.90 (1H, m) 3.15 (3H, s), 3.28 (3H, s), 3.3 (1H, d), 3.35 (3H, s), 3.50 (1H, m), 3.65 (2H, d), 3.77 (1H, d), 4.02 (3H, s), 4.30 (1H, t), 4.82 (1H, dd), 5.15 (1H, q, J=7 Hz), 5.90 (1H, dd), 6.25 (1H, s), 6.47 (1H, dd), 6.60 (1H, d), 6.75 (1H, d), 6.85 (1H, d)。

30

【0140】

N-メチル-N-(3-メチルジチオ-プロパノイル)-L-アラニン(6b)によるメイタンシノール(2)のエステル化

N-メチル-N-(3-メチルジチオ-プロパノイル)-L-アラニン(6b)（5.0 g、21.5 mmol）の無水塩化メチレン（80 mL）溶液をアルゴン雰囲気下にて攪拌し、それをDCC（4.58 g、22.2 mmol）の塩化メチレン（54 mL）溶液、1 M ZnCl<sub>2</sub>のエーテル（4.4 mmol）溶液およびメイタンシノール(2)（2.0 g、3.5 mmol）の塩化メチレン（80 mL）溶液の順で処理した。反応混合物を室温で4時間攪拌し、次いで濾過した。

【0141】

Diazem（登録商標）シアノ分取HPLCカラム（250 mm×50 mm、粒径10ミクロン）を、流量150 mL/分のヘキサン：2-プロパノール：酢酸エチル（体積比17:2:6）混合物で平衡状態とした。メイタンシノールのL-およびD-アミノアシルエステル10の混合物の溶液（酢酸エチル25 mL中1 g）をカラムに注入した。この条件下では、所望のL-異性体(10b)の保持時間は42分であり、D-異性体は56分で溶出する。この方法によって光学的に純粋な生成物が得られ、回収率は>90%である。

40

【0142】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) L-アミノアシル異性体(10b): 0.84 (3H, s), 1.11-1.23 (1H, m), 1.31 (3H, d, J=6 Hz), 1.35 (3H, d, J=7 Hz), 1.46-1.52 (1H, m), 1.68 (3H, s), 1.97 (1H, d, J=9 Hz), 2.24 (1H, dd, J=12 Hzおよび15 Hz), 2.30 (3H, s), 2.65 (1H, dd, J=12 Hzおよび15 Hz), 2.73-2.86 (2H, m), 2.90 (3H, s), 2.92-3.03 (2H, m), 3.08 (1H, d, J=9 Hz), 3.14 (1H, d, J=12 Hz), 3.28 (3H, s), 3.39 (3H, s), 3.54 (1H, d, J=9

50

Hz), 3.72 (1H, d, J=13 Hz), 4.02 (3H, s), 4.31 (1H, t, J=11 Hz), 4.82 (1H, dd, J=3 Hzおよび12 Hz), 5.45 (1H, q, J=7 Hz), 5.69 (1H, dd, J=9 Hzおよび15 Hz), 6.25 (1H, s), 6.47 (1H, dd, J=11 Hzおよび15 Hz), 6.67 (1H, d, J=1.5 Hz), 6.77 (1H, d, J=11 Hz), 6.85 (1H, d, J=1.5 Hz)。

【0143】

N-メチル-N-(メチルジチオブタノイル)-L-アラニン(6c)によるメイタンシノール(2)のエステル化

N-メチル-N-(メチルジチオブタノイル)-L-アラニン(6c) (8.9 mg、35.5  $\mu$ mol) の無水塩化メチレン (0.15 mL) 溶液をアルゴン雰囲気下にて攪拌し、それをDCC (8.8 mg、42.6  $\mu$ mol) の塩化メチレン溶液、1 M  $\text{ZnCl}_2$  (7.1  $\mu$ mol) のエーテル溶液およびメイタンシノール(2) (4.0 mg、7.1  $\mu$ mol) の塩化メチレン溶液の順で処理した。反応混合物を室温で3時間攪拌し、次に濾過し、減圧下にて濾液の蒸発を行って、メイタンシノールのL-およびD-アミノアシルエステル混合物を得た。この物質は、10bにおいて前述した流量150 mL/分のヘキサン：2-プロパノール：酢酸エチル (体積比17:2:6) 混合物で平衡状態としたDiazem(登録商標) シアノ分取HPLCカラム (250 mm  $\times$  50 mm、粒径10ミクロン) を用いてさらに精製することができる。

【0144】

N-メチル-N-(フェニルジチオ-プロパノイル)-L-アラニン(6e)によるメイタンシノール(2)のエステル化

N-メチル-N-(フェニルジチオ-プロパノイル)-L-アラニン(6e) (31.5 mg、105  $\mu$ mol) の塩化メチレン (0.4 mL) 溶液をアルゴン下にて攪拌し、それをDCC (26 mg、126  $\mu$ mol) の塩化メチレン溶液、1 M  $\text{ZnCl}_2$  (17.7  $\mu$ mol) のエーテル溶液およびメイタンシノール(2) (10 mg、17.7  $\mu$ mol) の塩化メチレン (0.2 mL) 溶液の順で処理した。反応混合物を室温で3時間攪拌した。沈殿物を濾去し、濾液を減圧下にて濃縮した。

【0145】

この混合物は、(10b)において前述した流量150 mL/分のヘキサン：2-プロパノール：酢酸エチル (体積比17:2:6) 混合物で平衡状態としたDiazem(登録商標) シアノ分取HPLCカラム (250 mm  $\times$  50 mm、粒径10ミクロン) を用いてさらに精製することができる。

【0146】

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) L-アミノアシル異性体(10e): 0.82 (3H, s), 1.11-1.25 (1H, m), 1.33 (3H, d, J=3 Hz), 1.61 (3H, s), 1.63 (3H, d, J=14 Hz), 2.19 (1H, dd, J=13 Hzおよび15 Hz), 2.61 (1H, dd, J=12 Hzおよび15 Hz), 2.78 (3H, s), 2.68-3.03 (2H, m), 3.07 (1H, d, J=9 Hz), 3.20 (3H, s), 3.38 (3H, s), 3.53 (1H, d, J=9 Hz), 3.63 (1H, d, J=13 Hz), 3.68 (3H, s), 4.01 (3H, s), 4.30 (1H, t, J=11 Hz), 4.79 (1H, dd, J=3 Hzおよび8 Hz), 5.43 (1H, q, J=7 Hz), 5.68 (1H, dd, J=9 Hzおよび15 Hz), 6.23 (1H, s), 6.45 (1H, dd, J=12 Hzおよび15 Hz), 6.60 (1H, d, J=1.5 Hz), 6.75 (1H, d, J=12 Hz), 6.77 (1H, d, J=1.5 Hz), 7.22-7.40 (5H, m)。

【0147】

N-メチル-N-(3-メチルジチオ-ブタノイル)-L-アラニン(6g)によるメイタンシノール(2)のエステル化

N-メチル-N-(3-メチルジチオ-ブタノイル)-L-アラニン(6g) (23.2 mg、0.088 mmol) の塩化メチレン (0.2 mL) 溶液をアルゴン雰囲気下にて攪拌し、それをメイタンシノール (5 mg、0.0088 mmol) の塩化メチレン (0.2 mL) 溶液、DCC (20.6 mg) の塩化メチレン (0.2 mL) 溶液および1 M塩化亜鉛 (0.0088 mmol) のエーテル溶液の順で処理した。反応物を室温で終夜攪拌した。次いで反応混合物を濾過し、溶媒を蒸発させた。残留物について、6%メタノール/クロロホルムを用いるシリカゲルでの分取TLCによる精製を行って、所望のL-メイタンシノイドエステル10gを得た。この生成物10gは、(10b)において前述した流量4.70 mL/分のヘキサン：2-プロパノール：酢酸エチル (体積比17:2:6) 混合物で平衡状態としたDiazem(登録商標) シアノ分取HPLCカラム (250 mm  $\times$  10 mm、粒径10ミクロン) を用いて、より効果的に精製することができる。

## 【0148】

N-アセチル-N-メチルメチルジチオシステイン(9a)によるメイタンシノール(2)のエステル化

N-アセチル-N-メチル-メチルジチオシステイン(9a) (15.6 mg、0.07 mmol) の無水塩化メチレン (0.45 mL) 溶液をアルゴン雰囲気下にて室温で攪拌し、それを1 M  $\text{ZnCl}_2$  のエチルエーテル (0.028 mmol) 溶液、DCC (17.3 mg、0.084 mmol) の塩化メチレン (0.2 mL) 溶液およびメイタンシノール(2) (4.0 mg、0.007 mmol) の塩化メチレン (0.1 mL) 溶液の順で処理した。反応混合物を3時間攪拌し、次いで濾過し、濾液を減圧下にて蒸発させた。

## 【0149】

この残留物は、(10b)において前述した流量150 mL/分のヘキサン：2-プロパノール：酢酸エチル (体積比17:2:6) 混合物で平衡状態としたDiazemシアノ分取HPLCカラム (250 mm × 50 mm、粒径10ミクロン) を用いてさらに精製することができる。

## 【0150】

工程3：ジスルフィド含有メイタンシノイドの還元

メイタンシノールのジスルフィド含有L-アミノアシルエステル10b (1.95 g、2.5 mmol) の酢酸エチル (140 mL) およびメタノール (210 mL) 混合溶液をアルゴン雰囲気下にて室温で攪拌し、2 mMエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含むジチオトレイトール (0.95 g、6.2 mmol) の0.05 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) (140 mL) 溶液で処理した。反応の進行をHPLCでモニタリングしたところ、反応は3時間以内に完結した。

## 【0151】

反応が完結した反応混合物を、2 mM EDTAを含む0.2 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) (250 mL) で処理し、次に酢酸エチルで抽出した (600 mLで3回)。有機層を合わせ、ブライン (100 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を蒸発させることで、粗チオール含有メイタンシノイド11bの残留物を得た。

## 【0152】

得られた粗チオール含有メイタンシノイド11bを、ヘキサン：2-プロパノール：酢酸エチル (体積比78.0:5.5:16.5) 混合物で平衡状態とし、流量150 mL/分で流す分取Diazem(登録商標)シアノHPLCカラム (250 mm × 50 mm、粒径10ミクロン) を用いるHPLCによって精製した。チオール含有メイタンシノイド11bは、16分を中心とするピークとして溶出した。生成物を含む分画の蒸発を行って、純粋なチオール含有メイタンシノイド11bを白色固体として得た (純度99%で収率76%)。

## 【0153】

Ellmanアッセイを用いて、生成物1モル当たりスルフヒドリル基が1モル存在することが確認された。この生成物について、NMR分光法によってさらなる特性決定を行った。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.84 (3H, s), 1.33 (3H, d,  $J=5$  Hz), 1.35 (3H, d,  $J=5$  Hz), 1.60 (3H, s), 1.68 (3H, s), 2.22 (1H, dd,  $J=3$  Hzおよび14 Hz), 2.60-2.82 (2H, m), 2.88 (3H, s), 3.08-3.20 (2H, m), 3.25 (3H, s), 3.39 (3H, s), 3.55 (1H, d,  $J=9$  Hz), 3.71 (1H, d,  $J=12$  Hz), 4.02 (3H, s), 4.32 (1H, t,  $J=10$  Hz), 4.81 (1H, dd,  $J=3$  Hzおよび12 Hz), 5.45 (1H, q,  $J=7$  Hz), 5.67 (1H, dd  $J=9$  Hzおよび15 Hz), 6.25 (1H, s), 6.47 (1H, dd,  $J=11$  Hzおよび15 Hz), 6.70 (1H, d,  $J=1.5$  Hz), 6.75 (1H, d,  $J=11$  Hz), 6.86 (1H, d,  $J=1.5$  Hz)。

## 【0154】

以上、本発明についての詳細な説明および具体的な実施形態を参照しながらの説明を行ったが、当業者には、本発明の趣旨および範囲を逸脱しない限り、本発明において各種の変更および改変を行うことが可能であることは明らかであろう。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、アンサマイトシン類1a-eの還元によるメイタンシノール(2)の生成を示す図である。

【図2】 図2 aは、-メルカプト-カルボン酸3a-eの個々のメチル-ジチオ誘導体4a-e

10

20

30

40

50

への転化を示す図である。

図 2 b は、 $\gamma$ -メルカプト-カルボン酸 3b の個々のアリール-ジチオ誘導体 5a-b への転化を示す図である。

図 2 c は、メチル-ジチオ誘導体 4a-e およびアリール-ジチオ誘導体 5a-b のジスルフィド基を有する N-メチル-L-アラニン誘導体 6a-g への転化を示す図である。

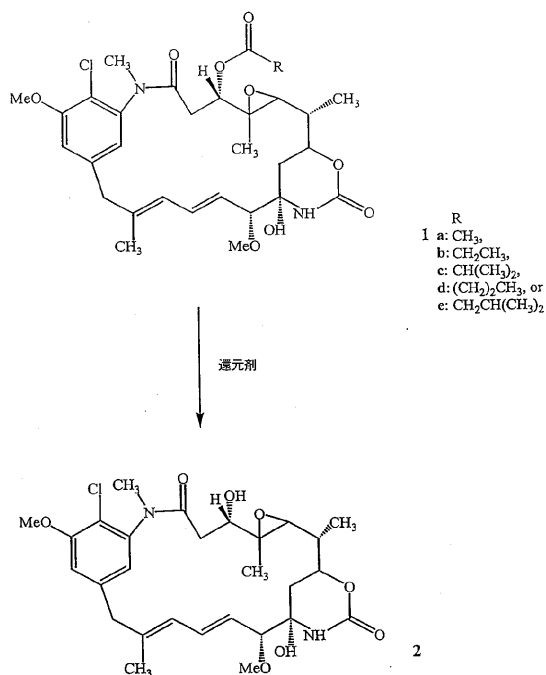
【図 3】 図 3 a は、N-メチルシステインおよび N-メチルホモシステイン (7a-b) の個々のジスルフィド誘導体 8a-b への転化を示す図である。

図 3 b は、ジスルフィド誘導体 8a-b のアシル化によるジスルフィド基を有する N-メチル-L-システイン誘導体 9a-b の形成を示す図である。

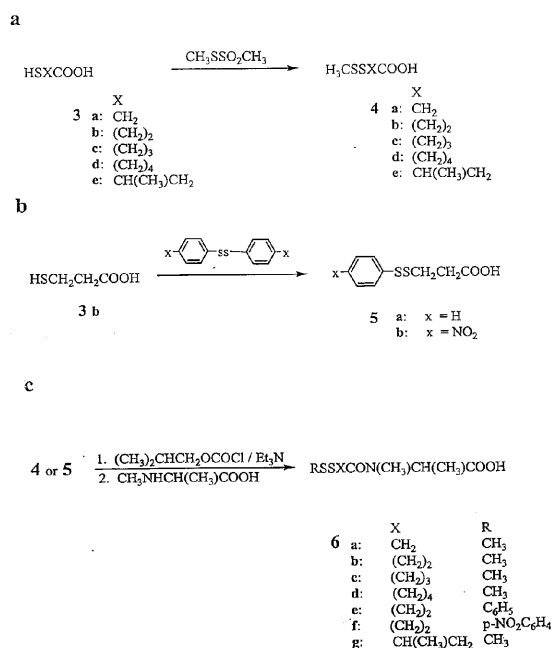
【図 4】 図 4 は、ジスルフィド基を有する N-メチル-L-アラニン誘導体 6a-g でメイトンシノール (2) をエステル化してジスルフィド含有メイトンシノイド立体異性体 10 を得て、それから L-異性体をクロマトグラフィーによって分離してジスルフィド含有メイトンシノイド L-異性体 10a-g を得て、次にそれを還元してチオール含有メイトンシノイド 11a-g を得る工程を示す図である。

【図 5】 図 5 は、ジスルフィド基を有する N-メチル-L-システイン誘導体 9a-b でメイトンシノール (2) をエステル化してジスルフィド含有メイトンシノイド立体異性体 12 を得て、それから L-異性体をクロマトグラフィーによって分離してジスルフィド含有メイトンシノイド L-異性体 12a-b を得て、次にそれを還元してチオール含有メイトンシノイド 13a-b を得る工程を示す図である。

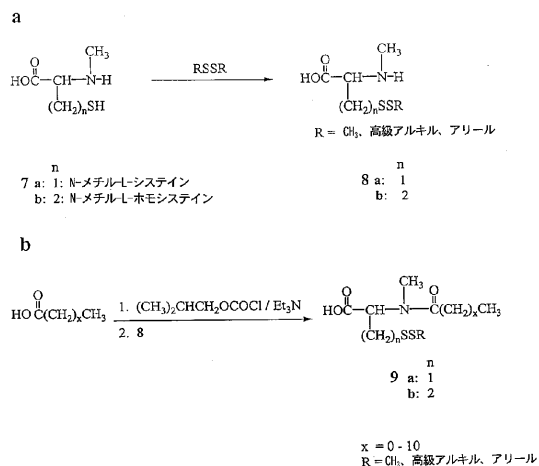
【図 1】



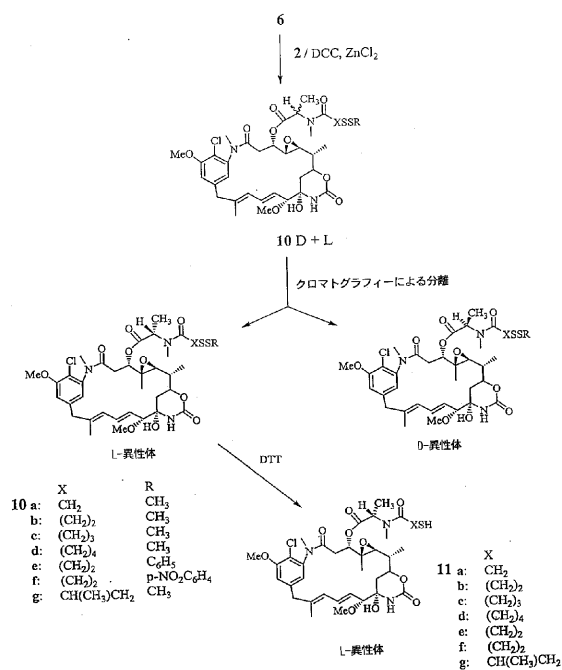
【図 2】



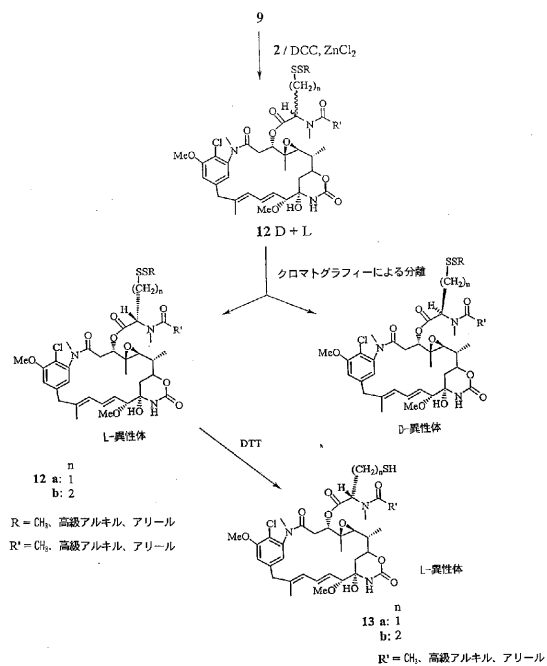
【図 3】



【図 4】



【図 5】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
**A 6 1 P 37/06 (2006.01)** A 6 1 P 37/06  
**A 6 1 P 43/00 (2006.01)** A 6 1 P 43/00 1 0 5

(72)発明者 チャーリー, ラヴィ, ヴァンキーブラム, ジャガンナサ  
 アメリカ合衆国 0 2 4 6 1 マサチューセッツ州, ニュートン, ウィンチェスター ストリート  
 1 7 4

(72)発明者 ウィディソン, ウェイン, チャールズ  
 アメリカ合衆国 0 2 1 4 3 マサチューセッツ州, ソマーヴィレ, エーピーティ. # 1, セダー  
 ストリート 7 2

審査官 谷尾 忍

(56)参考文献 特開平03 - 1 6 1 4 9 0 ( J P , A )  
 米国特許第0 4 3 6 0 4 6 2 ( U S , A )  
 特開昭55 - 0 6 6 5 8 6 ( J P , A )  
 特開2 0 0 8 - 0 7 4 8 6 3 ( J P , A )  
 特表2 0 0 3 - 5 2 8 0 3 4 ( J P , A )  
 KUPCHAN, S. Morris et al., Structural requirements for antileukemic activity among the  
 naturally occurring and semisynthetic maytansinoids, Journal of Medicinal Chemistry,  
 1 9 7 8 年, vol.21, no.1, p.31-7  
 REICH E. et al., Normal- and bonded-phase liquid chromatography with photodiode array  
 detection of maytansinoids, JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, 1 9 9 7 年 2 月 2 8 日, vol.7  
 63, no.1-2, p.213-219

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C07D 498/18  
 A61K 31/537  
 CAplus(STN)  
 CASREACT(STN)  
 REGISTRY(STN)