非ステロイド性酸性消炎・鎮痛薬の塩基性
アミノ酸誘導体によるプロドラッグ化修飾

恒松英明・石田英次・吉田史郎・山本孫兵衛*

Basic amino acid derivatives as prodrugs of non-steroidal anti-inflammatory carboxylic acids

Two kinds of basic amino acid (L-Arginine(Arg) and *p*-guanidino-L-phenylalanine(GPA)) derivatives of aspirin and ibuprofen were synthesized and the hydrolyses of these compounds by trypsin(Tp) and carboxypeptidase B(CPase B) were investigated to evaluate the availability as prodrugs for aspirin and ibuprofen. The ester bonds of these compounds were hydrolyzed by Tp at from about one-tenth to half the rate of *N*- α -benzoyl-Arg ethyl ester, a specific substrate for Tp, suggesting that the compounds are good substrates for Tp. Salicylic acid was generated in the hydrolysis of aspirin-Arg by CPase B after the hydrolysis of aspirin-Arg to salicyl-Arg, while ibuprofen was released by CPase B from ibuprofen-Arg. On the other hand, aspirin and ibuprofen-GPA were not hydrolyzed by CPase B at all. These results suggest that drug-Arg ethyl esters are useful in the design of the prodrugs for non-steroidal anti-inflammatory carboxylic acids.

Hideaki Tsunematsu, Eiji Ishida
Shiro Yoshida, and Magobei Yamamoto*key words : aspirin, ibuprofen, prodrug,
basic amino acid

非ステロイド性酸性消炎・鎮痛薬には、消化管障害などの有害反応が多い。これらの有害反応を軽減することや、薬物の生物学的利用能を高める目的で、現在までに多くのプロドラッグが合成され研究が進められている。1981年に、アスピリンフェニルアラニンエチルエステルが合成され、カルボキシペプチダーゼA (CPase A)の加水分解に

よるアスピリンの遊離性が検討された。その結果、この化合物は CPase A により加水分解を受けないことから、アスピリンのプロドラッグにはなり得ないことが報告されている¹⁻³⁾。

筆者らは、非ステロイド性酸性消炎・鎮痛薬の塩基性アミノ酸エステル誘導体を種々合成して、これらの誘導体は、塩基性アミノ酸に特異性をもつ加水分解酵素 CPase B や消化酵素トリプシン(Tp)の作用によって親薬物を遊離するプロドラッグになりうると期待した(図1)。塩基性アミノ酸としては、L-アルギニン(Arg)とパラグアニジノ-L-フェニルアラニン(GPA)を用いた。GPAはTp様酵素の特異性の研究のために新規に合成された生体内に存在しないアミノ酸である^{4,5)}。しかし、Arg やリジンよりも GPA に特異的な加水分解酵素が、ヒトやマウスの血液および腹水中に存在することが報告されている⁶⁾。また、GPAはArgの側鎖のメチレン鎖の部分がベンゼン環に置換された構造をしており、CPase Bによる加水分解において、アルキルグアニジンとフェニルグアニジンの側鎖の違いによる加水分解速度の差を比較検討するのに便利である。

そこで本報では、非ステロイド性酸性消炎・鎮痛薬の中からサリチル酸系のアスピリンとプロピオン酸系のイブプロフェンを、2種の塩基性アミノ酸を用いてプロドラッグ化修飾し、TpとCPase Bによる加水分解を調べてプロドラッグとしての有用性を検討した。

方 法

(1) 薬物の塩基性アミノ酸誘導体の合成

アスピリン(As)とL-アルギニンエチルエステル・二塩酸塩(Arg-OEt・2HCl)(またはGPA-

* Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University 福岡大学薬学部薬劑学教室

図1 トリプシン(Tp)およびカルボキシペプチダーゼB (CPase B)存在下でのアスピリン、イブプロフェン-塩基性アミノ酸エチルエステルの加水分解経路

OEt・2HCl)を*N,N'*-ジメチルホルムアミド中でジシクロヘキシルカルボジイミドを用いてカップリングし、As-Arg(GPA)-OEtを合成した。

As-Arg(GPA)-OHは、As-Arg(GPA)-OEtをTpで加水分解することにより、また、サリチル酸(Sal)-Arg(GPA)-OHは、それを水酸化ナトリウムで鹼化して得た。イブプロフェン(Ib)のプロドラッグ化修飾も、Asと同様の方法で行った。合成標品の構造は、質量分析と元素分析で確認した。

(2) トリプシンによる加水分解

ウシTp(ベーリンガー・マンハイム・山之内製)の相対的濃度は、optical factor 0.695⁷⁾と分子量24,000⁸⁾を用いて求めた。活性なTpの濃度は、カニトロフェニル-p'-グアニジノ安息香酸塩⁹⁾で滴定した結果、57%であった。Tpによるエステル基質の加水分解初速度を、25°Cで、トリス-塩酸緩衝液 0.01 M, pH 7.85(0.01 M KCl, 0.05 M CaCl₂を含む)を用いてpH-スタット滴定装置で測定した。反応液中のTp濃度は、As誘導体の場合には 2.31×10^{-7} Mであり、Ib誘導体の場合には 4.78×10^{-8} Mであった。速度定数(Km, kcat)はLineweaver-Burkプロットによって求めた¹⁰⁾。

(3) カルボキシペプチダーゼBによる加水分解

ブタCPase B(Sigma, Tpとキモトリプシンを

ジイソプロピルフルオロリン酸で失活処理済)の濃度は、optical factor 0.467と分子量34,300を用いて求めた¹¹⁾。塩基性アミノ酸誘導体およびその加水分解物を、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、島津LC-6A, C-R3Aシステム、カラム島津Zorbax-C₈, 250 mmL×4.6 mmID, カラム温度40°Cで定量した。

HPLC条件は、As, Sal, およびそれらの誘導体は、移動層メタノール/0.072%リン酸(55:45, v/v), 流速1.45 ml/min, 検出波長234 nmであり、Ibおよびその誘導体では、移動相メタノール/アセトニトリル/酢酸ナトリウム(48/32/20, pH 7.4), 流速0.5 ml/min, 検出波長272 nmによった。As-Arg(GPA)-OHとIb-Arg(GPA)-OHのCPase Bによる加水分解速度は、トリス-塩酸緩衝液 0.025 M, pH 7.65(0.1 M NaClを含む)を用いて37°Cで測定した。

結果と考察

(1) 塩基性アミノ酸誘導体による水溶性化

AsとIbをArgおよびGPAを用いてプロドラッグ化修飾した化合物は、きわめて水に溶けやすい。そのため、塩基性アミノ酸を用いてプロドラッグ化修飾することにより、水に難溶性の薬物が水溶性プロドラッグへと変換された。

(2) 塩基性アミノ酸誘導体のトリプシンによる加水分解

AsとIbの塩基性アミノ酸エステル誘導体のTpによる加水分解においては、それぞれ4 mM, 2.5 mM以下の基質濃度では、Lineweaver-Burkプロットで直線関係が得られることから、この酵素-塩基性アミノ酸エステル誘導体系が普通のMichaelis-Menten型の反応に従うと考えられた。

Tpによるエステル基質の加水分解に対して、3段階の反応機構が提出されている^{12,13)}。本誘導体のエステル加水分解もこの機構に適合するものと仮定して、速度定数を求めた。表1に、Lineweaver-Burkプロットにより求めた速度定数を示した。二次速度定数(kcat/Km)で比較すると、As-Arg-OEtとAs-GPA-OEtはTpの特異基質であるベンゾイル-L-アルギニンエチルエステル(Bz-Arg-OEt)の約1/10の速度で加水分解され

表 1 アスピリンおよびイブプロフェンの塩基性アミノ酸エステル誘導体のトリプシンによる加水分解 (pH 7.85, 25°C)

誘導体	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	(k _{cat} /K _m) × 10 ⁻³ (M ⁻¹ · s ⁻¹)
As-Arg-OEt	0.727±0.27	37.4± 1.2	51.4± 1.4
As-GPA-OEt	2.39±0.07	103± 3	43.3± 2.4
Ib-Arg-OEt	0.217±0.006	51.3± 1.2	237± 9
Ib-GPA-OEt	0.706±0.02	184± 8	260±10
Bz-Arg-OEt*	0.061±0.002	31.4± 0.5	512±16
Bz-GPA-OEt*	0.90±0.05	414±19	461±11

*:文献⁹⁾

た。両誘導体の K_m 値が Bz-Arg-OEt のそれより大きな値を示すことから、前者の T_p への結合性が後者の場合より悪いと考えられる。これは As に存在するアセトキシル基が、T_p の S₂ サイトとの相互作用の際に立体障害になっているためと推察される。

Ib-Arg-OEt と Ib-GPA-OEt は、Bz-Arg-OEt の約 1/2 の速度で加水分解された。Ib-Arg-OEt と Bz-Arg-OEt の k_{cat} 値にはほとんど差はみられないが、前者の K_m 値は後者のその約 4 倍であった。一方、Ib-GPA-OEt と Bz-GPA-OEt の間では、K_m 値と k_{cat} 値に大きな差はみられなかった。したがって、Ib-Arg-OEt の加水分解においては、Ib のベンゼン環に存在するアルキル基の影響により本誘導体の T_p への結合性が悪くなることが示唆された。

CPase B による塩基性アミノ酸誘導体の加水分解においては、遊離されるアミノ酸のカルボキシル末端は非結合形でなければならない。上述の 4 種のエステル誘導体は、T_p により特異基質の 1/10~1/2 の速度で加水分解を受けたので、T_p のよい基質であるといえる。したがって、これらは CPase B の基質へと完全に変換されることが明らかになった。

(3) 塩基性アミノ酸誘導体のカルボキシペプチダーゼ B による加水分解

① As-Arg-OH

As-Arg-OH (4.0 mM) と CPase B (3.13×10⁻⁵ M) を 37°C でトリス-塩酸緩衝液 pH 7.65 中でインキュベーションし、HPLC を用いて加水分解の様子を調べた。As-Arg-OH 系の保持時間は、As

図 2 As-Arg-OH のカルボキシペプチダーゼ B による加水分解の高速液体クロマトグラフィー (pH 7.65, 37°C)

A: 0 時間, B: 4 時間

a: サリチル酸, b: As-Arg-OH,

c: Sal-Arg-OH

(3 min), Sal (4.1 min), As-Arg-OH (5.4 min), Sal-Arg-OH (5.7 min), および As-Arg-OEt (8.9 min) であった。CPase B 添加後、Sal と、As-Arg-OH のアセトキシル基が加水分解を受けた Sal-Arg-OH が生成しはじめた。酵素添加 4 時間後の加水分解の結果を図 2 に示した。As-Arg-OH が存在しているにもかかわらず、Sal のみが増加し As は生成しなかった。そこで As と As-Arg-OH のアセトキシル基の安定性を検討した。その結果、両者はトリス-塩酸緩衝液中ではほぼ同程度の安定性を示したが、CPase B 溶液中では、As-Arg-OH のアセトキシル基が As のそれより約 5 倍の速度で加水分解された。また、Sal-Arg-OH の CPase B による加水分解速度は、As-Arg-OH の場合の約 20 倍であった (表 2)。その結果、As-Arg-OH が CPase B により、または非酵素的に Sal-Arg-OH に加水分解された後に、Sal が遊離

表 2 As-Arg-OH, Sal-Arg-OH および Ib-Arg-OH のカルボキシペプチダーゼ B による加水分解 (pH 7.65, 37°C)

誘導体	サリチル酸または イブプロフェン遊離速度 ($\text{mM} \cdot \text{h}^{-1}$)
As-Arg-OH	0.0923 ± 0.014
Sal-Arg-OH	1.92 ± 0.15
Ib-Arg-OH	0.305 ± 0.034

図 3

されていると考えられる。

図 3 に, As-Arg-OEt の Tp と CPase B による加水分解経路を示した。As-Arg-OEt は Tp によるエステルの加水分解で As-Arg-OH になり, また, アセトキシ基の非酵素的な加水分解によって Sal-Arg-OEt へと変化する。つぎに, As-Arg-OH は CPase B と非酵素的な加水分解によって Sal-Arg-OH となるが, この化合物は, Sal-Arg-OEt の Tp による加水分解からも生成する。そして, Sal-Arg-OH から CPase B により Sal が遊離されることが考えられる。その結果, As-Arg-OEt のアセトキシ基は, As が遊離される以前に CPase B により加水分解されるので, As-Arg-OEt は Sal のプロドラッグになるが, As のそれにはなりえないことが示唆された。

② Ib-Arg-OH

Ib-Arg-OH の CPase B による加水分解も, As-Arg-OH の場合と同様の方法で調べた。Ib と Ib-Arg-OH の保持時間は, 6.4 min と 7.6 min であった。CPase B 添加後, Ib が遊離され, その加水分解速度は As-Arg-OH の場合の約 3 倍であるが, Sal-Arg-OH のそれの約 1/6 であった(表 2)。図 4 に酵素添加 5 時間後の加水分解の結果を示した。24 時間インキュベーション後で, Ib-Arg-OH の約 50% が加水分解され, さらに, CPase B を添加すると残りが遅い速度で約 80% まで加水

図 4 Ib-Arg-OH のカルボキシペプチダーゼ B による加水分解の高速液体クロマトグラフィー (pH 7.65, 37°C)

A : 0 時間, B : 5 時間

a : イブプロフェン, b : Ib-Arg-OH

分解された。Ib がラセミ体なので, その塩基性アミノ酸誘導体は, Ib(L)-Arg(L)-OH と Ib(D)-Arg(L)-OH の混合物である。そのため, Ib(L)-Arg(L)-OH が加水分解されたあとに, Ib(D)-Arg(L)-OH が遅い速度で加水分解されたものであろう。

以上の結果, Ib-Arg-OH から Ib が遊離されるので, この化合物は Ib のプロドラッグとして有用であると考えられる。

③ As-GPA-OH と Ib-GPA-OH

As-GPA-OH の CPase B による加水分解においては, As も Sal も生成せず, 最終生成物は Sal-GPA-OH であった。また, Ib-GPA-OH もまったく加水分解されなかった。したがって, CPase B

図5 カルボキシペプチダーゼBとプロドラッグの相互作用

による加水分解を活用したプロドラッグ化修飾においては、アミノ酸側鎖にフェニルグアニジンよりもアルキルグアニジンを持つ塩基性アミノ酸のほうがよいことが示唆された。

おわりに

酵素による基質の加水分解において、二次的相互作用、すなわちサブサイト間の相互作用が重要である。本研究では、 P_2 サイト(薬物)と S_2 サイト(CPase B)の相互作用を検討した(図5)。As-Arg-OH と Sal-Arg-OH の CPase B による加水分解速度が大きく異なることから、アセチル基の有無が加水分解速度に大きな影響を与えている。このように、 P_2 サイトのわずかな構造の違いが、加水分解速度に影響している。

筆者らは、 P_2 サイトに他のプロピオン酸系消炎・鎮痛薬を用いた結果、薬物の化学構造の違いにより、それらのプロドラッグの酵素による加水分解速度が大きく異なることを見出している。したがって、筆者らのこのようなプロドラッグ化修飾は、酵素によるプロドラッグからの親薬物の放出制御に応用できるものと期待される。

文献

- 1) Banerjee, P. K. et al.: Physicochemical property modification strategies based on enzyme substrate specificities I, II, III. *J. Pharm. Sci.* **70**: 1299-1309, 1981.
- 2) Kawahara, M. et al.: Is aspirin phenylalanine ethyl ester a prodrug for aspirin? *J. Pharm. Sci.* **72**: 1093-1096, 1983.
- 3) Muhi-Eldeen, Z. et al.: Kinetics and mechanism of the enzymatic hydrolysis of aspirin phenylalanine ethyl ester. *Int. J. Pharm.* **26**: 15-23, 1985.
- 4) Tsunematsu, H. et al.: Interactions of derivatives of guanidinophenylglycine and guanidinophenylalanine with trypsin and related enzymes. *J. Biochem.* **88**: 1773-1783, 1980.
- 5) Tsunematsu, H. et al.: Kinetics of hydrolysis of amide and anilide substrates of p-guanidino-L-phenylalanine by bovine and porcine trypsins. *J. Biochem.* **97**: 617-623, 1985.
- 6) Tsunematsu, H. et al.: A new serine protease which preferentially recognizes p-guanidino-L-phenylalanyl residue in ascitic plasma from Ehrlich ascites tumor bearing mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**: 1233-1238, 1985.
- 7) Green, N. M. et al.: The effects of divalent cations on trypsin. *J. Biol. Chem.* **204**: 379-390, 1953.
- 8) Kay, C. M. et al.: The molecular weight of trypsinogen. *J. Biol. Chem.* **236**: 118-121, 1961.
- 9) Chase, T. Jr. et al.: p-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate HCl: A new active site titrant for trypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**: 508-514, 1967.
- 10) Lineweaver, H. et al.: The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**: 658-666, 1934.
- 11) Wolff, E. C. et al.: The kinetics of carboxypeptidase B activity. I. Kinetic parameters. *J. Biol. Chem.* **237**: 3094-3099, 1962.
- 12) Gutfreunt, H. et al.: The mechanism of the chymotrypsin with p-nitrophenyl acetate. *Biochem. J.* **63**: 656-661, 1956.
- 13) Gutfreunt, H. et al.: The mechanism of chymotrypsin-catalyzed reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **42**: 719-728, 1956.