カルボキシペプチダーゼによるフルルビプロフェン-アミノ酸
誘導体からのフルルビプロフェンエナンチオマーの遊離性

恒松英明・吉田史郎・堀江健一・山本孫兵衛*

Carboxypeptidase-mediated release of flurbiprofen enantiomers from flurbiprofen-amino acid derivatives

Flurbiprofen (FP)-amino acid (L-arginine (Arg), L-lysine (Lys) and L-phenylalanine (Phe)) ethyl esters were synthesized and the release of FP enantiomers from these compounds in the presence of trypsin (Tp), α -chymotrypsin (ChTp) and carboxypeptidase (CP) A, CPB and CPY were examined. The ester bonds of these compounds were hydrolyzed rapidly by Tp or ChTp, suggesting that they are good substrates for these enzymes. FP (R) was released by CPB and CPY faster than FP (S) from the FP-basic amino acids, while FP-Phe-OH was not hydrolyzed at all by CPA.

These results indicate the stereoselective carboxypeptidase-mediated release of FP enantiomers from the FP-basic amino acids. FP (S)-Arg-OH was separated from FP (R)-Arg-OH by high-performance liquid chromatography. The FP (S) was released by CPB and CPY from FP (S)-Arg-OH. It is therefore thought that FP (S)-Arg-OEt is utilized as an active water-soluble prodrug for FP.

Hideaki Tsunematsu・Shiro Yoshida・
Kenichi Horie・Magobei Yamamoto**key words: flurbiprofen, amino acid,
prodrug, carboxypeptidase*

非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) は、近時、構造-活性相関研究の発展もあって、つぎからつぎへと新規活性化化合物が合成されているが、特に、chemical delivery system の考えかたから対象となる医薬品の分子構造を合成化学的に修飾し、その体内挙動を制御しようとするプロドラッグ化修飾は非常に重要視されている。

NSAID の中でも使用度の高い 2-アシルプロピ

オン酸 (2-APA) 系のフルルビプロフェン (FP) は、プロピオン酸の C2 位に不斉炭素があるので、これによる S 体と R 体が存在し、特に S 体のみが活性体とされている。しかし、光学活性体を多量に生産することが困難であるため、現在、臨床上の NSAID はラセミ体で適用されている。ラセミ体に含まれる不活性異性体は 50% 不純物とみなされる考えかた¹⁾や、また、近年、光学異性体間に無視できない生物学的反応差があることも明らかになっている。

このような状況を考慮して、筆者らは FP の副作用である胃腸障害や消化管出血を抑制すること、および薬物の生物学的利用を向上させるため、FP プロドラッグから活性体である S 体を生体内酵素の作用で、より選択的に、または優先的に遊離されることを目的とし、蛋白質分解酵素の基質特異性を利用したプロドラッグ化修飾を試みた。

そして、サリチル酸やイブプロフェンの L-アルギニン (Arg) 誘導体からカルボキシペプチダーゼ (CP) B により、それぞれの薬物が *in vitro* 系において遊離されうることから^{2,3)}、したがって、ラセミ体である FP の塩基性アミノ酸 (Arg と L-リジン (Lys) と中性芳香族アミノ酸 (L-フェニルアラニン (Phe)) 誘導体からの消化酵素 (トリプシン (Tp), α -キモトリプシン (ChTp)) や加水分解酵素 (CPA, CPB, CPY) による選択的な活性体である S 体の遊離性を期待した (図 1)。

そこで本報では、FP を三種のアミノ酸を用いてプロドラッグ化修飾し、厳格な基質特異性を示す CPA と CPB、それに特異性の広い CPY による FP エナンチオマーの遊離性を調べ、新規プロドラッグとしての有用性を検討した。

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

図1 FP-アミノ酸エチルエステルの酵素による加水分解経路

方法

(1) FP-アミノ酸誘導体の合成

フルルピロフェン-L-アルギニンエチルエステル(FP-Arg-OEt)は、FPとArg-OEt・2HClを、*N,N'*-ジメチルホルムアミド中で、トリエチルアミン(TEA)と1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)存在下、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)を用いてカップリングし合成した。FP-Arg-OHは、FP-Arg-OEtをTpで加水分解して得た。

FP-Lys-OEtについては、まずFPとLys(Z)-OEt・HCl(Z: ,ベンジルオキシカルボニル基)をジクロロメタン中で、TEAとHOBt存在下、DCCを用いてFP-Lys(Z)-OEtを得た。つぎに、本化合物を水酸化ナトリウムで鹼化したあと、Z基をHBr/酢酸で除去してFP-Lys-OHを合成した。本品を無水エタノールとチオニルクロライドを用いてエステル化しFP-Lys-OEtを得た。

(2) FP-Arg-OEt ジアステレオマーの分離

合成したFP-Arg-OEtは、FP(S)-Arg-OEtとFR(R)-Arg-OEtの50%混合物である。二種のジアステレオマー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 ChemcoPak-5C18(250 mm L.×10 mm I.

D.)；移動相、メタノール／アセトニトリル／酢酸ナトリウム(0.1 M)(48:32:20(v/v), pH 8.7)；カラム温度40°Cで分別した。

(3) FP-アミノ酸エステルのTpとChTpによる加水分解

FP-Arg-OEtとFP-Lys-OEtのウシTp^{4,5)}(ベーリンガー・マンハイム—山之内製)による加水分解速度は、25°Cで、トリス-塩酸緩衝液、0.05 M, pH 7.85(0.01 M KCl, 0.05 M CaCl₂を含む)を用いて、また、FP-Phe-OEtのウシα-ChTp⁶⁾(ベーリンガー・マンハイム—山之内製)による加水分解速度は、25°Cで、0.05 M リン酸緩衝液, pH 7.85(0.2 M KCl, 30% メタノールを含む)を用いて、HPLC(カラム, ZORBAX-C8(Shimadzu-Dupon, 250 mm L.×4.6 mm I. D., 移動相とカラム温度は(2)と同じ)で測定した。

(4) FP-アミノ酸のCPによる加水分解

FP-Arg-OHとFP-Lys-OHのブタCPB⁷⁾(Sigma社製, TpとChTpの活性をフェニルメタンサルホンフルオリド(PMSF)で不活化処理済)およびCPY⁸⁾(宝酒造製)による加水分解速度は、37°Cでトリス-塩酸緩衝液, 0.025 M, pH 7.65(0.1 M NaClを含む)を用いてHPLC(カラム, Sumichiral OA-2500(250 mm L.×4.6 mm I.

図2 トリプシンによる FP-Arg-OEt, FP-Lys-OEt, Bz-Arg-OEt の加水分解 (pH 7.85, 25 °C)
○: FP-Arg-OEt. △: FP-Lys-OEt. ×: Bz-Arg-OEt

図3 α-キモトリプシンによる FP-Phe-OEt と Ac-Phe-OEt の加水分解 (pH 7.85, 25 °C)
○: FP-Phe-OEt. ×: Ac-Phe-OEt

D.); 移動相, 0.02 M 酢酸アンモニウム/メタノール)で測定した。

FP-Phe-OH のウシ CPA[®] (Sigma 社製, Tp と ChTp の活性を PMSF で不活化処理済) 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, 30% メタノールを含む) を用いて HPLC (CPB と同じ条件) で測定した。

結果と考察

(1) FP-Arg-OEt と FP-Lys-OEt の Tp による加水分解

FP-Arg-OEt を FP-Lys-OEt の Tp による加水分解速度を, Tp の特異基質である *N*-α-ベンゾイル-L-アルギニンエチルエステル (Bz-Arg-OEt) の場合と比較した。図2に Tp による加水分解から生成してくる FP-アミノ酸, または, Bz-Arg-OH の経時変化を示した。両誘導体は Tp によりほぼ同じ速度で加水分解され, とともに約 12 min までにはすべてのエステルは加水分解された。初速度の比較から, FP-Arg-OEt は Bz-Arg-OEt の約 4 倍, FP-Lys-OEt はその約 6 倍の速度で加水分解された。両誘導体はジエステルの混合物であるが, 図2の加水分解の様子か

ら両者ともにジエステルの間のエステルの加水分解速度には差がないと考えられる。

以上の結果より, 二種の誘導体は Tp のよい基質であるといえる。ゆえに, これらは CPB の基質へと完全に変換されることが明らかになった。

(2) FP-Phe-OEt の ChTp による加水分解

FP-Phe-OEt の ChTp による加水分解速度を, 本酵素の特異基質であるアセチル-L-フェニアラニンエチルエステル (Ac-Phe-OEt) と比較した。図3に ChTp による加水分解から生成してくる FP-Phe-OH と Ac-Phe-OH の経時変化を示した。

FP-Phe-OEt は ChTp により約 50% が速い速度で加水分解されたあと, 残りが遅い速度で加水分解された。これは本化合物が二種のジエステルの混合物なので, ジエステルの間のエステルの加水分解速度に大きな差があることを示唆している。P₂ サイトに位置する FP(S) と FP(R) の立体構造上の違いが, ChTp によるエステルの加水分解速度に大きな影響を与えていると考えられる。

FP-Phe-OEt の二種のジエステルの混合物は Ac-Phe-OEt とほぼ同じ速度か, または, 速い速

図4 カルボキシペプチダーゼBによるFP-Arg-OHとFP-Lys-OHの加水分解(pH 7.65, 37°C)

○: FP(R)-Arg-OH. ●: FP(S)-Arg-OH. △: FP(R)-Lys-OH

図5 カルボキシペプチダーゼYによるFP-Arg-OHとFP-Lys-OHの加水分解(pH 7.65, 37°C)

○: FP(R)-Arg-OH. ●: FP(S)-Arg-OH. △: FR(R)-Lys-OH. ▲: FP(S)-Lys-OH

度で加水分解されたので、ChTpのよい基質であるといえる。したがって、本化合物はCPAの基質へと完全に変換された。

(3) FP-Arg-OHとFP-Lys-OHのCPBによる加水分解

二種の誘導体(2 mM)とCPB(3.13×10^{-5} M)を37°Cでインキュベーションし、遊離してくるFPエナンチオマーをHPLCを用いて定量した。図4にCPBにより遊離されたFPエナンチオマーの経時変化を示した。FP-Arg-OHからはCPBによりFP(R)がFP(S)より約22倍の速度で遊離された。また、FP-Lys-OHからはFP(R)のみが遊離され、その速度はFP-Arg-OHのFP(R)の場合の約1/7であった。FP-Lys-OHからFP(S)はまったく遊離されないことから、本化合物のCPBによる加水分解は立体選択的であることが示唆された。

(4) FP-Arg-OHとFP-Lys-OHのCPYによる加水分解

CPBの場合と同様に二種の誘導体をCPY(3.13×10^{-5} M)とインキュベーションし、FPエナンチオマーの遊離性を調べた(図5)。

FP-Arg-OHからはCPYによりFP(R)がFP(S)の約4倍の速度で、一方、FP-Lys-OHからは

表1 FP-Arg-OEtジアステレオマーとBz-Arg-OEtのトリプシンによる加水分解(pH 7.85, 25°C)

誘導体	$K_m \times 10^5$ (M)	k_{cat} (s ⁻¹)	$(k_{cat}/K_m) \times 10^{-4}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)
FP(S)-Arg-OEt	8.44	220	261
FP(R)-Arg-OEt	11.1	155	139
Bz-Arg-OEt	6.39	34.8	54.4

前者が後者の約3倍の速度で遊離された。FP(R)の遊離はFP-Arg-OHがFP-Lys-OHより少し速かったが、FP(S)の遊離に関しては両者に差異はみられなかった。CPYによる加水分解よりもCPBによるそのほうが二種のエナンチオマー間で大きい速度の差がみられた。ゆえに、厳格な基質特異性を示すCPBによる加水分解において、より立体選択的な遊離性が窺われる。

(5) FP-Phe-OHのCPAによる加水分解

FP-Phe-OH(0.2 mM)のCPA(3.13×10^{-5} M)による加水分解において、FPエナンチオマーは遊離されなかった。したがって、FP-Phe-OHの二種のジアステレオマーはともにCPAによって加水分解されないことが示唆された。

表 2 FP-Arg-OH ジアステレオマーのカルボキシペプチダーゼBとYによる加水分解
(pH 7.65, 37 °C)

誘導体	CPB			CPY		
	$K_m \times 10^4$ (M)	$k_{cat} \times 10^3$ (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ /min ⁻¹)	$K_m/10^4$ (M)	$k_{cat}/10^3$ (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ min ⁻¹)
FP(S)-Arg-OH	6.81	8.55	12.5	7.12	94.1	132
FP(R)-Arg-OH	5.24	119	227	6.51	274	421

(6) FP-Arg-OEt ジアステレオマーの Tp による加水分解

FP の活性体である FP(S) の Arg 誘導体を得るために、FP-Arg-OEt の二種のジアステレオマーを HPLC で分取して、両者の Tp による加水分解速度定数を比較検討した。

両異性体の Tp による加水分解では、2 mM 以下の基質濃度で Lineweaver-Burk プロット¹⁰⁾で直線関係が得られることから、Tp-FP-Arg-OEt ジアステレオマー系が普通の Michaelis-Menten 型の反応様式に従うことが考えられた。Tp によるエステル基質の加水分解に対して、三段階の反応機構が提出されている^{11,12)}。この誘導体のエステル加水分解は、この機構に適合するものと仮定してその速度定数を求めた。

表 1 に Lineweaver-Burk プロットより求めた速度定数を示した。二次速度定数(k_{cat}/K_m)で比較すると、FP(S)-Arg-OEt および FP(R)-Arg-OEt は特異基質である Bz-Arg-OEt のそれぞれ約 5 倍、および 3 倍の速度で加水分解された。両誘導体の k_{cat} 値が Bz-Arg-OEt のそれより大きな値を示すことから、前者の Tp の触媒部位への配向性が後者の場合よりよいと考えられる。

また、FP(S)-Arg-OEt は FP(R)-Arg-OEt の約 2 倍の速度で加水分解された。しかし、両者の K_m 値、 k_{cat} 値には大きな差がみられないことから、FP(S)と FP(R)の立体構造の差異は Tp による両ジアステレオマーのエステル加水分解に影響しないと考えられる。

(7) FP-Arg-OH ジアステレオマーの CPB と CPY による加水分解

両誘導体の CPB と CPY による加水分解においては、1 mM 以下の基質濃度で Michaelis-

Menten 型の反応に従うと考えられた。表 2 に Lineweaver-Burk プロットより求めた速度定数を示した。二次速度定数(k_{cat}/K_m)で比較すると、FP(R)-Arg-OH は CPB により FP(S)-Arg-OH の約 18 倍の速度で加水分解された。両異性体の K_m 値にはほとんど差がみられないが、前者の k_{cat} 値は後者のその約 14 倍であった。

一方、CPY における加水分解においては、FP(R)-Arg-OH は FP(S)-Arg-OH の約 3 倍の速度で加水分解された。本酵素の場合も両者の K_m 値にはほとんど差がなく、前者の k_{cat} 値は後者のその約 3 倍であった。したがって、両異性体の二種の酵素への結合性に差異はないが、FP(R)-Arg-OH の酵素の触媒部位への配向性が FP(S)-Arg-OH よりもよいことが示唆された。また、Arg に対する特異性の高い CPB における加水分解のほうが、CPY の場合より FP(S)と FP(R)の立体構造の差異が大きく反映されている。FP(S)-Arg-OEt は、Tp と CPB(CPY)の作用により加水分解されて FP(S)を生成するので、FP 活性体の水溶性プロドラッグとして有用である。

おわりに

ラセミ体で臨床適用されている薬物分子をプロドラッグ化修飾し、生体内酵素の作用によりその活性体が選択的に、あるいは優先的に遊離されるプロドラッグの研究開発は非常に重要である。本研究では、FP をモデル化合物に選び、FP の塩基性(Arg, Lys)あるいは中性芳香族アミノ酸(Phe)誘導体の酵素による FP エナンチオマーの *in vitro* 遊離性を検討した。

その結果、FP の塩基性アミノ酸誘導体からの FP エナンチオマーの遊離性に大きな差異がみら

れ、*R*体は*S*体よりも優先的に遊離された。この事実より、FP-塩基性アミノ酸誘導体から立体選択的にFPが遊離されることが示唆された。FPは*S*体が活性体なので、初期目的に反する結果を得たが、薬物-塩基性アミノ酸誘導体は、エナンチオマー間で生理活性度を異とする立体異性薬物のプロドラッグ化に大いに期待できる。

また、2-APA系薬物を塩基性アミノ酸の誘導体とすることにより二種のジアステレオマーが容易に分別されることから、他の2-APA系薬物の光学活性プロドラッグの研究に大いに利用できる。

文 献

- 1) Ariens, E. J. : Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *Eur. J. Clin. Pharm.* 26 : 663-668, 1984.
- 2) 恒松英明, 石田英次, 吉田史郎, 山本孫兵衛 : 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. *DDS* 5 : 45-49, 1990.
- 3) Tsunematsu, H., Ishida, E., Yoshida, S., Yamamoto, M. : Synthesis and enzymatic hydrolysis of aspirin-basic amino acid ethyl esters. *Int. J. Pharm.* 68 : 77-86, 1991.
- 4) Green, N. M., Neurath H. : The effects of divalent cations on trypsin. *J. Biol. Chem.* 204 : 379-390, 1953.
- 5) Kay, C. M., Smillie, L. B., Hildermann, F. A. : The molecular weight of trypsinogen. *J. Biol. Chem.* 236 : 118-121, 1961.
- 6) Schonbaum, G. R., Zerner, B., Bender, M. L. : The spectrometric determination of the operational normality of a α -chymotrypsin solution. *J. Biol. Chem.* 236 : 2930-2935, 1961.
- 7) Wolff, E. C., Schimer, E. W., Folk, J. E. : The kinetics of carboxypeptidase B activity. I. Kinetic parameters. *J. Biol. Chem.* 237 : 3094-3099, 1962.
- 8) Aibara, S., Hayashi, R., Hata, T. : Physical and chemical properties of yeast proteinase C. *Agr. Biol. Chem.* 35 : 658-666, 1971.
- 9) Bradshaw, R. A., Erickson, L. H., Walsh, K. A., Neurath, H. : The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 63 : 1389-1394, 1969.
- 10) Lineweaver, H., Burk, D. : The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56 : 658-666, 1934.
- 11) Gutfreunt, H., Sturtevant, J. M. : The mechanism of the chymotrypsin with *p*-nitrophenyl acetate. *Biochem. J.* 63 : 656-661, 1956.
- 12) Gutfreunt, H., Sturtevant, J. M. : The mechanism of chymotrypsin-catalyzed reactions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 42 : 719-728, 1956.