〔薬 学 雑 誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
107 (9) 732-737 (1987)

水溶性キモトリプシン阻害剤の合成研究

横尾信夫,*,^a 服部英三,^a 平田光輝,^a 渡辺好一郎,^a
佐藤文泰,^a 永倉正彦,^a 藤井節郎^b
興和株式会社東京研究所,^a 財団法人大阪基礎医学研究奨励会^b

Studies on Synthesis of Water-Soluble Chymotrypsin Inhibitors

NOBUO YOKOO,*,^a EIZOU HATTORI,^a MITSUTERU HIRATA,^a
KOICHIRO WATANABE,^a FUMIYASU SATO,^a MASAHICO NAGAKURA,^a
and SETSURO FUJII^b

Tokyo Research Laboratories, Kowa Co. Ltd.,^a 17-43, 2 chome, Noguchi-cho
Higashimurayama-shi, Tokyo, 189, Japan and The Osaka Foundation for
Promotion of Fundamental medical Research,^b 11-1, 1 chome,
Karasaki, Ohtsu-shi, Shiga, 520-01, Japan

(Received April 1, 1987)

Synthesis of water-soluble chymotrypsin specific inhibitors was attempted to study the roles of chymotrypsin-like enzymes *in vivo*. Previously we reported that the esters of carboxylic acid containing a condensed ring showed stronger activity than those containing a single ring system. Then we synthesized 4-substituted phenyl esters of carboxylic acid containing a condensed ring, such as tetralin, naphthalene, indole *etc.*, and their inhibitory activities were compared. Among these compounds, esters of tetralin-1-carboxylic acid (FK-448) and 1-naphthylacetic acid showed the strongest activity, and their IC_{50} values were 8×10^{-7} , 5×10^{-7} M, respectively. Tetralin-2-carboxylate and 2-naphthylacetate inhibited weaker than 1-analogues. Esters of basic quinoline carboxylic acid and bulky carboxylic acids containing a three-ring system inhibited poorly. Chymotrypsin produced equimolecular 4-substituted phenol rapidly and thereafter the amount of 4-substituted phenol increased slowly, when incubated with FK-448 at 37°C.

Keywords—chymotrypsin inhibitor; condensed ring system; tetralincarboxylic acid; naphthylacetic acid; water-soluble phenyl ester; piperazine derivative; FK-448

緒 言

キモトリプシンはトリプシンと並び消化酵素として重要な蛋白分解酵素の1つである。プラスミン、トロンビン等トリプシン様酵素は血中等に多数存在しその作用について明らかにされているものが多い。近年生体内のキモトリプシン様酵素についても研究が進められており、Sanadaらは骨格筋細胞中にミオシン、トロポニン等筋収縮性蛋白に特異性の高いキモトリプシン様酵素を見出し、¹⁾ 筋ジストロフィーとの関連性が検討されている。またマスト細胞中にはキモトリプシン様酵素 chymase が存在しマスト細胞の脱顆粒に重要な役割を果しているものと考えられている。²⁾ このような酵素の生体内での役割の解明にはその特異的阻害剤を用いる方法が有力であると考えられるが、キモトリプシン様酵素に対する低分子の、強い特異的阻害剤は L-2-phenyl-1-tosylamido-ethyl chloromethyl ketone (TPCK) 等のクロルメチルケトン³⁾ 及びキモスタチン⁴⁾ の他には知られていない。またそれらはいずれも水に難溶性である。

キモトリプシンは主として蛋白中のフェニルアラニン、トリプトファン、チロシン等の疎水性アミノ酸残基のC末端側の結合を加水分解する。またこれらアミノ酸のアミド、エステルをも加水分解するが、一般にエステルは対応するアミドより酵素のアシル化反応が速い、⁵⁾ 同じセリンプロテアーゼに属するトリプシン阻害剤の合成

を試みた Muramatsu らは基質類似のカルボン酸の aryl ester は対応する alkyl ester より強い阻害活性を示すことを報告した.⁶⁾ このような背景から筆者らは水に可溶性のキモトリプシン特異的阻害剤を得ることを目的として基質類似の疎水性カルボン酸フェニルエステルの合成を試み、縮合環を有するカルボン酸エステルは単環性カルボン酸エステルより強い阻害活性を示すことを見出した.⁷⁾ 今回テトラリン、ナフタレンカルボン酸を中心に可溶性フェニルエステルを合成し阻害作用を検討したので報告する。

結果 及 び 考 察

縮合環としてテトラリン、ナフタレン、インドール、ベンゾフラン骨格を有するカルボン酸を 4-置換フェニルエステルに導き、環とエステル部分を結ぶ炭素鎖のキモトリプシン阻害活性に及ぼす影響について検討した (Table I).

テトラリン誘導体においては環直結型の化合物 Ia (FK-448) が最も強い活性を示しその IC₅₀ 値は 8×10^{-7} M であった. 1-ナフタレン, 3-インドール, 3-ベンゾフラン誘導体の場合は酢酸型の化合物 IIb, IVb, Vb が最も強い活性を示し IC₅₀ 値はそれぞれ 5×10^{-7} , 6×10^{-6} , 9×10^{-6} M であった. テトラリン-1-カルボン酸の脂環側をアルキル鎖とみなせば Ia はフェニル酢酸型化合物と考えることもでき, その他の例と一致することになる. なお 2-ナフタレン誘導体では強い活性を示す化合物は得られなかった.

上記の結果をもとに類縁カルボン酸について同じ 4-置換フェニルエステルに導き活性を比較した (Table II).

テトラリン類縁体の脂環のサイズについては 6 員環 (Ia) が最も強い活性を示し 5 員環 (VII), 7 員環 (VI) の順に活性は低下した. なお 5 員環, 6 員環とも 2-カルボン酸エステルでは 1-カルボン酸エステルに比較し活性は低下した. 塩基性を有するキノリンカルボン酸エステル (XVI—XVIII) 及び 3 環性の化合物 XIX, XX はいずれも強い活性を示さなかった. キモトリプシンはポケットと呼ばれる疎水性結合部位をもっており,⁸⁾ それにより基質を捕捉するものと考えられるが, これらの化合物の活性はそのポケットの大きさ等の性質を考える上で意味のあるものと考えられ, 今後検討を続けたい.

インデン-3-酢酸エステルに関し, 5-OCH₃ 誘導体 (XI) はその置換基をもたない (X) に比較し活性の上昇がみられた. そこでテトラリンカルボン酸エステル Ia について環上の置換基の, 阻害活性に及ぼす影響を検討したが, 得られた化合物はいずれも Ia と同程度の活性を示すにとどまった (Table III).

次に, 得られた化合物のうち Ia についてキモトリプシンとの反応を検討した. 阻害剤 Ia (10^{-3} M) に対し 1/10 量のキモトリプシンを加え 37°C に加温した場合の Ia の減少と, 水解により生じるフェノール体の生成量を HPLC を用い測定した (Fig. 1). 反応液中から Ia は速やかに約 10^{-4} M のキモトリプシンに相当する分が消失しその後ゆるやかに減少した. 同時にこれと一致した量のフェノール体の生成が認められた. これらの結果より Ia は酵素に対し速いアシル化と遅い脱アシル化により阻害をかける基質類似型の阻害剤であると考えられた.

以上述べた化合物のうち塩として得たものはいずれも水に対し 1—10% 以上の溶解度を示した.

TABLE I. Chymotrypsin Inhibitory Activity of Phenyl Esters of Carboxylic Acids Type

Com-Pound	R	A	IC ₅₀ (M)
Ia		—	8×10^{-7}
Ib		CH ₂	1×10^{-5}
Ic		CH ₂ CH ₂	3×10^{-4}
IIa		—	5×10^{-5}
IIb		CH ₂	5×10^{-7}
IIc		CH ₂ CH ₂	5×10^{-4}
IId		CH=CH	5×10^{-4}
IIIa		—	8×10^{-5}
IIIb		CH ₂	4×10^{-5}
IIId		CH=CH	$> 10^{-8}$
IVa		—	$> 10^{-8}$
IVb		CH ₂	6×10^{-6}
IVc		CH ₂ CH ₂	2×10^{-4}
IVd		CH=CH	8×10^{-6}
IVe		CH ₂ CH ₂ CH ₂	$> 10^{-8}$
Va		—	8×10^{-4}
Vb		CH ₂	9×10^{-6}
Vd		CH=CH	7×10^{-5}

TABLE II. Chymotrypsin Inhibitory Activity of Phenyl Esters of Carboxylic Acids Type

$$\text{RCOO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CON}(\text{CH}_2)_2\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$$

Compound	R	IC ₅₀ (M)
Ia		8×10^{-7}
VI		2×10^{-5}
VII		6×10^{-6}
VIII		1×10^{-5}
IX		6×10^{-5}
X		8×10^{-6}
XI		1×10^{-6}
XII		3×10^{-6}
XIII		3×10^{-6}
XIV		9×10^{-7}
XV		3×10^{-6}
XVI		3×10^{-4}
XVII		5×10^{-4}
XVIII		6×10^{-4}
XIX		6×10^{-4}
XX		$> 10^{-3}$

TABLE III. Chymotrypsin Inhibitory Activity of Phenyl Esters of Carboxylic Acids Type

$$\text{RCOO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CON}(\text{CH}_2)_2\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$$

Compound	R	IC ₅₀ (M)
Ia	—	8×10^{-7}
XXI	4-CH ₃	8×10^{-7}
XXII	6-CH ₃	6×10^{-7}
XXIII	6-Cl	8×10^{-7}
XXIV	7-NO ₂	1×10^{-6}

Fig. 1. Reaction of Chymotrypsin and Compound Ia (FK-448)

Chymotrypsin (1×10^{-4} M) and Ia (1×10^{-3} M) were incubated at 37°C, and 0.1 ml of reaction mixture was removed at the indicated time. Concentrations of Ia and 4-substituted phenol were determined by HPLC. ●—●, increase of 4-substituted phenol; ○—○, decrease of Ia.

実験の部

1) 4-(4-Hydroxybenzoyl)-1-isopropylpiperazine (XXVI) の合成 Piperazine 25.9 g (0.3 mol), NaI 1.5 g (0.01 mol), K₂CO₃ 6.91 g (0.05 mol) に MeOH 50 ml を加え更に 2-bromopropane 12.3 g (0.1 mol) を加え、攪拌しつつ 60°C に 4 時間加温した。冷後 CHCl₃ 150 ml を加え不溶物を除去後飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ により乾燥し、1-isopropylpiperazine の CHCl₃ 溶液を得た。次いで triethylamine 14 ml (0.1 mol) を加え氷冷し、あらかじめ 4-ethoxycarbonyloxybenzoic acid 21.0 g (0.1 mol) と SOCl₂ 21 ml の反応により得た酸クロライドを滴下し室温に 3 時間攪拌した。CHCl₃ を溜去し AcOEt を加え不溶物を除去後稀塩酸により抽出した。NaHCO₃ アルカリ性として AcOEt 抽出、飽和食塩水洗浄、

TABLE IV. Yields and Physical Properties of Compounds

Com- pounds	Formula	Recrystallizing solvent	Yield (%)	mp (°C)	Elemental analysis (%)		
					Calcd (Found)		
					C	H	N
Ia	$C_{25}H_{30}N_2O_3 \cdot CH_3SO_3H$	EtOH-AcOEt-Et ₂ O	90	179—181	62.13 (62.11)	6.82 (6.82)	5.57 (5.67)
Ib	$C_{26}H_{32}N_2O_3 \cdot HCl$	EtOH	49	218—219	68.33 (68.03)	7.28 (7.28)	6.13 (6.06)
Ic	$C_{27}H_{34}N_2O_3 \cdot HCl$	EtOH-Et ₂ O	65	206—208	68.85 (68.90)	7.49 (7.45)	5.95 (6.03)
IIa	$C_{25}H_{26}N_2O_3$	EtOH-Et ₂ O-hexane	56	117—119	74.60 (74.45)	6.51 (6.49)	6.96 (6.95)
IIb	$C_{26}H_{28}N_2O_3 \cdot CH_3SO_3H$	EtOH-Et ₂ O	81	197—202	63.26 (62.91)	6.29 (6.34)	5.46 (5.12)
IIc	$C_{27}H_{30}N_2O_3 \cdot HCl \cdot 1/2H_2O$	EtOH-Et ₂ O	41	188—191	68.13 (68.24)	6.78 (6.76)	5.88 (5.68)
IId	$C_{27}H_{28}N_2O_3$	CHCl ₃ -Et ₂ O	79	123—124	75.68 (75.54)	6.59 (6.65)	6.54 (6.48)
IIIa	$C_{25}H_{26}N_2O_3$	AcOEt-Et ₂ O	72	142—143	74.60 (74.60)	6.51 (6.55)	6.96 (7.01)
IIIb	$C_{26}H_{28}N_2O_3$	AcOEt-Et ₂ O-hexane	60	115—117	74.98 (74.95)	6.78 (6.78)	6.73 (6.63)
IIId	$C_{27}H_{28}N_2O_3$	CHCl ₃ -Et ₂ O	76	141—142	75.68 (75.78)	6.59 (6.61)	6.54 (6.53)
IVa	$C_{23}H_{25}N_3O_3$	EtOH	6	224—227	70.57 (70.37)	6.44 (6.47)	10.73 (10.73)
IVb	$C_{24}H_{27}N_3O_3$	AcOEt	48	145—147	71.09 (71.09)	6.71 (6.73)	10.36 (10.39)
IVc	$C_{25}H_{29}N_3O_3$	AcOEt-pet. ether	61	129—130	71.58 (71.71)	6.97 (7.02)	10.02 (10.06)
IVd	$C_{25}H_{27}N_3O_3$	EtOH	11	229—230	71.92 (72.06)	6.52 (6.51)	10.06 (10.17)
IVe	$C_{26}H_{31}N_3O_3$	AcOEt-hexane	76	101—104	72.03 (72.02)	7.21 (7.19)	9.69 (9.81)
Va	$C_{23}H_{24}N_2O_4$	AcOEt	46	118—120	70.39 (70.36)	6.16 (6.06)	7.14 (7.16)
Vb	$C_{24}H_{26}N_2O_4$	AcOEt	27	117—118	70.92 (70.63)	6.45 (6.36)	6.89 (6.87)
Vd	$C_{25}H_{26}N_2O_4$	AcOEt-pet. ether	68	159—160	71.75 (71.62)	6.26 (6.28)	6.69 (6.66)
VI	$C_{26}H_{32}N_2O_3 \cdot HCl$	EtOH-Et ₂ O	62	213—214	68.33 (68.04)	7.28 (7.17)	6.13 (5.96)
VII	$C_{24}H_{28}N_2O_3 \cdot HCl$	EtOH-Et ₂ O	55	222—226 (dec.)	67.20 (67.22)	6.81 (6.81)	6.53 (6.71)
VIII	$C_{24}H_{28}N_2O_3 \cdot HCl$	H ₂ O	62	236—237 (dec.)	67.20 (67.22)	6.81 (6.80)	6.53 (6.63)
IX	$C_{25}H_{30}N_2O_3 \cdot CH_3SO_3H \cdot 1/2H_2O$	EtOH-Et ₂ O	59	165—167	61.04 (61.24)	6.89 (6.87)	5.48 (5.68)
X	$C_{25}H_{28}N_2O_3 \cdot CH_3SO_3H$	EtOH	32	211—212	62.38 (62.06)	6.44 (6.37)	5.60 (5.59)
XI	$C_{26}H_{30}N_2O_4 \cdot HCl \cdot 1/2H_2O$	EtOH-AcOEt-Et ₂ O	40	208—210	65.06 (65.53)	6.72 (6.56)	5.84 (5.84)

TABLE IV. (Continued)

Com- pounds	Formula	Recrystallizing solvent	Yield (%)	mp (°C)	Elemental analysis (%)		
					Calcd	(Found)	
					C	H	N
XII	$C_{26}H_{32}N_2O_3 \cdot HCl$	EtOH-Et ₂ O	65	214—216	68.33 (68.30)	7.28 7.24	6.13 6.28
XIII	$C_{26}H_{30}N_2O_3 \cdot HCl$	EtOH-Et ₂ O	54	224—226	68.63 (68.49)	6.87 6.81	6.16 6.31
XIV	$C_{24}H_{26}N_2O_3S \cdot CH_3SO_3H$	EtOH-AcOEt-Et ₂ O	46	175—177	57.90 (57.63)	5.83 5.93	5.40 5.12
XV	$C_{24}H_{26}N_2O_3S \cdot CH_3SO_3H$	EtOH-Et ₂ O	76	205—207	57.90 (57.65)	5.83 5.84	5.40 5.19
XVI	$C_{24}H_{25}N_3O_3$	AcOEt-Et ₂ O-pet. ether	53	124—127	71.44 (71.19)	6.25 6.22	10.41 10.39
XVII	$C_{24}H_{25}N_3O_3$	AcOEt-Et ₂ O	52	135—137	71.44 (71.71)	6.25 6.29	10.41 10.28
XVIII	$C_{24}H_{25}N_3O_3$	AcOEt-Et ₂ O-pet. ether	59	120—122	71.44 (71.54)	6.25 6.29	10.41 10.37
XIX	$C_{28}H_{28}N_2O_3 \cdot HCl \cdot 1/2H_2O$	EtOH-Et ₂ O	37	196—201	69.20 (69.31)	6.22 6.10	5.76 5.82
XX	$C_{29}H_{28}N_2O_3 \cdot 1/2H_2O$	AcOEt-Et ₂ O-pet. ether	14	181—183	75.47 (75.69)	6.33 6.22	6.07 5.81
XXI	$C_{26}H_{32}N_2O_3 \cdot CH_3SO_3H$	EtOH-Et ₂ O	74	178—180	62.77 (62.66)	7.02 6.99	5.42 5.46
XXII	$C_{26}H_{32}N_2O_3 \cdot CH_3SO_3H$	EtOH	62	218—219	62.77 (62.75)	7.02 6.96	5.42 5.13
XXIII	$C_{25}H_{29}ClN_2O_3 \cdot CH_3SO_3H$	MeOH-Et ₂ O	43	190—196	58.15 (57.94)	6.19 6.18	5.22 5.00
XXIV	$C_{25}H_{29}N_3O_5 \cdot \begin{array}{c} COOH \\ \\ COOH \end{array}$	EtOH-Et ₂ O	9	135—138	58.90 (58.67)	5.86 5.68	7.63 7.68

MgSO₄ 乾燥を行い XXV を得るがこのものは取り出さず次の反応に用いた. すなわち上記 XXV の AcOEt 溶液に pyrrolidine 5.0 ml (0.06 mol) を加え室温に一夜放置すると XXVI の結晶が析出した. mp 141—145°C (未補正, 以下同様), Anal. Calcd C₁₄H₂₀N₂O₂: C, 67.72; H, 8.12; N, 11.28. Found: C, 67.90; H, 8.18; N, 11.19.

2) 1-Isopropyl-4-[4-(1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthoyloxy)benzoyl]piperazine Methane Sulfonate (Ia) の合成 Tetrahydronaphthoic acid 19.4 g (0.11 mol) に SOCl₂ 19.4 ml を加え 2 時間加熱還流し酸クロライドを得た. 1) により得たフェノール体 (XXVI) 24.8 g (0.1 mol) 及び triethylamine 11.1 g (0.11 mol) を CHCl₃ 200 ml に溶解し, 氷冷攪拌下酸クロライドを加え室温に一夜攪拌を続けた. CHCl₃ を溜去し AcOEt を加え不溶物を溜去後稀塩酸抽出を行った. NaOH アルカリ性とし AcOEt 抽出, 水洗後 MgSO₄ 乾燥を行い Ia の free base を得た. AcOEt を溜去し EtOH に溶解し 8.65 g (0.09 mol) の CH₃SO₃H を加え, 更に AcOEt, Et₂O を加え methane sulfonate を得た. 収率, mp, 及び元素分析の結果は Table IV に示す.

3) 4-[4-(Indole-3-acetoxy)benzoyl]-1-isopropylpiperazine (IVb) の合成 Indole-3-acetic acid 17.5 g (0.1 mol), フェノール体 (XXVI) 24.8 g (0.1 mol) 及び 4-pyrrolidinopyridine 1.5 g (0.01 mol) を dimethylformamide 200 ml に溶解し, 氷冷下 dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 20.8 g (0.1 mol) を加え室温に一夜攪拌した. 不溶物を溜去後 Et₂O を加え析出する結晶 (IVb) を溜取した. 収率, mp, 及び元素分析の結果は Table IV に示す.

上記以外の化合物のうち IV, V, XVI—XVIII は 3) に示した DCC 法により, また, その他の化合物はすべて 2) に示した酸クロライド法により得た.

Chart 1

4) キモトリプシン阻害活性の測定⁹⁾ 検体の DMSO 溶液 0.1 ml に pH 8.0, 0.1 M のトリス HCl バッファ ー 0.1 ml 及び同バッファに溶解した 10 μ g/ml のキモトリプシン (Boehringer Mannheim 社製) 溶液 0.1 ml を加え 37°C に加温した. 10 分後 25 mm の acetyl-L-tyrosine ethyl ester 溶液 0.2 ml を加え 37°C に 30 分反応させた. 2 M ヒドロキシルアミン・HCl 水溶液と 3.5 M NaOH の等量混液 0.75 ml を加え 37°C 15 分反応後冷却し 18% trichloroacetic acid, 4 N HCl 及び 10% FeCl₃ 溶液各 0.5 ml を加え分光光度計を用い 530 nm における吸光度から阻害率を求め計算により用いた酵素の 50% を阻害するに要する検体の濃度 IC₅₀ を求めた.

5) キモトリプシンと Ia の反応 キモトリプシン 10⁻⁴ M に化合物 Ia 10⁻³ M を加え 37°C に 30 分加温した. 反応中経時的に 0.1 ml ずつサンプリングし CH₃CN を含む pH 3.5 酢酸バッファを加え反応を停止させ HPLC を用い Ia 及びフェノール体 XXVI を定量した. (装置: JASCO TRI ROTAR-V, UVIDEK-100-V, Hitachi 833 型 Data processor, カラム: μ -Bondapak C₁₈ (Waters 社製), 溶媒: CH₃CN: pH 3.5 acetate: Et₃N = 850 : 200 : 1, 流速: 1.5 ml/min, 温度: 23°C, 測定波長: 265 nm).

引用文献

- 1) Y. Sanada, N. Yasogawa, N. Katunuma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 108 (1978).
- 2) B. Schick, K. F. Austen, L. B. Schwartz, *J. Immunol.*, **132**, 2571 (1984).
- 3) G. Schoellmann, E. Shaw, *Biochemistry*, **2**, 252 (1963).
- 4) H. Umezawa, T. Aoyagi, H. Morishima, S. Kunimoto, M. Matsuzaki, M. Hamada, T. Takeuchi, *J. Antibiot.*, **23**, 425 (1970).
- 5) M. L. Bender, G. E. Clement, F. J. Kézdy, B. Zerner, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 358 (1963).
- 6) M. Muramatsu, S. Fujii, *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 221 (1972).
- 7) 横尾信夫 佐藤文泰, 桐原順子, 横山 融, 池ヶ谷耕司, 永倉正彦, 藤井節郎, 臨床化学, **14**, 8 (1985).
- 8) K. Kurachi, J. C. Powers, P. E. Wilcox, *Biochemistry*, **12**, 771 (1973).
- 9) M. Muramatsu, S. Fujii, *J. Biochem.*, **64**, 807 (1968).