

## 新規合成したインドメタシンプロドラッグを用いた ヒトカルボキシエステラーゼの構造活性相関に関する研究

薬学専攻 高荷大輔

### 【目的】

現在、臨床において複数のプロドラッグが開発されている。その目的は様々であり、消化管吸収の改善、溶解性の改善、副作用の軽減、作用の持続化等がある。プロドラッグ化するにあたり親化合物に含まれる官能基の修飾を行うが、そのうちの1つにエステル化がある。このようなエステル型プロドラッグの代謝活性化に重要な役割を果たしているのがカルボキシエステラーゼ (CES) である。

多重遺伝子ファミリーを構成する CES (EC 3.1.1.1) は、セリン水解酵素に分類され、エステル結合、アミド結合およびチオエステル結合を含む多くの化合物の加水分解反応を触媒する酵素であり、薬物代謝酵素の中でも生体内における加水分解反応において最も重要な役割を果たしている[1]。CES はアミノ酸配列の相同性により CES1-CES7 のファミリーに分類されているが、ヒトの生体内では主に CES1 (hCES1) および CES2 (hCES2) が薬物代謝に関与している。CES の組織分布については、hCES1 は主に肝臓や肺に、hCES2 は主に小腸や腎臓に発現している[2]が CES1 と CES2 の基質特異性は互いに大きく異なっている。hCES1 および hCES2 の基質特異性の違いについては、医薬品を用いて既に検討されており、hCES1 によって加水分解されやすい基質にオセルタミビル、テモカプリル、メペリジン、コカイン (メチルエステル部位) 等がある。一方で、hCES2 によって加水分解されやすい基質にコカイン (ベンゾイルエステル部位)、CPT-11、ヘロイン等がある。すなわち、hCES1 は大きなアシル基と小さなアルコキシ基を有する化合物を加水分解しやすく、hCES2 は小さなアシル基と大きなアルコキシ基を有する化合物を加水分解しやすいことが判明している。しかし、これまでの研究では、基質が市販の化合物に限られていることが多く、調べられている構造については限定的であった。そのため、より詳細な基質特異性に関しては調べられていない。

これまで当研究室では、アトルバスタチンやインドメタシンのプロドラッグを合成し、ヒト肝臓ミクロソーム (HLM)、ヒト小腸ミクロソーム (HIM) により効率よく加水分解されるプロドラッグについて報告しているが、その研究過程で親化合物が同一であっても、修飾基が異なると代謝活性化速度が大きく異なることを見出している[3、4]。本研究では、カルボキシ基を持つ医薬品であるインドメタシンを基質に用いて、様々なエステル構造に化学修飾したのち hCES で加水分解を行うことでキラル認識能、立体障害と電子密度の影響、ジエステル型プロドラッグにおける代謝活性化について解明を試みた。

### 【方法】

インドメタシンを基質とし、化学修飾を行いインドメタシンプロドラッグ **2**、**5** を合成した (Fig. 1, 3)。インドメタシンプロドラッグ **3** は当研究室で既に合成したものを使用した。それらを HLM、HIM、hCES1、hCES2、アリアルアセトアミドデアセチラーゼ (AADAC) 存在下で加水分解し、代謝物であるインドメタシンを HPLC で定量した。インドメタシンプロドラッグ **2** はキラル認識能を調べるため不斉中心を持つアルキルエステル、ベンジル型エステルを合成した。インドメタシンプロドラッグ **3** は立体障害と電子密度を比較するためアルキルエステル、アリアルエステルを中心に選択した。インドメタシンプロドラッグ **5** はジエステル型プロドラッグの代謝活性化を確認するため、クロロメチルエステル **4** を経て、アシル基の炭素鎖を調整したエステルを合成した。

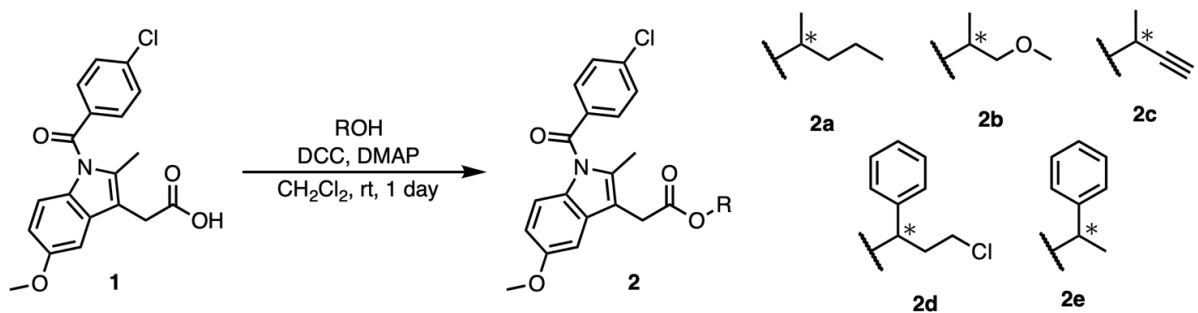


Fig. 1. Synthesis of chiral indomethacin prodrugs **2a-2e**.

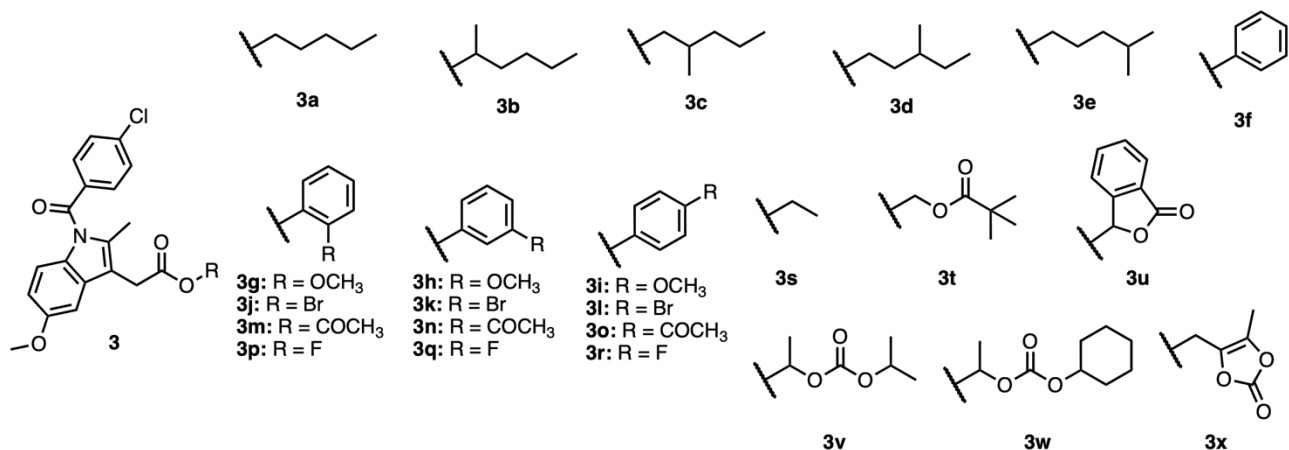


Fig. 2. Chemical structure of indomethacin prodrugs **3a-3x**.

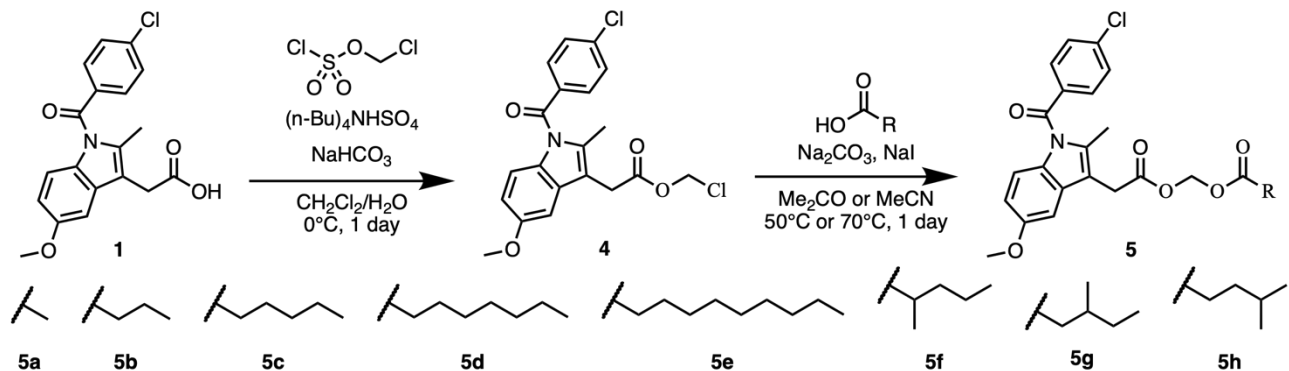


Fig. 3. Synthesis of indomethacin diester prodrugs **5a-5h**.

#### 【結果・考察】

インドメタシンプロドラッグ**2a-2e**において、hCES1では1-メトキシプロパン-2-イルエステル**2b**とプロト-3-イン-2-イルエステル**2c**の加水分解速度は大きく、3-クロロ-1-フェニルプロパン-1-イルエステル**2d**と1-フェニルエタン-1-イルエステル**2e**はR体とS体の間で加水分解速度に20倍以上の差があった (Fig. 4A)。また、加水分解速度が最も高かった (R)-プロト-3-イン-2-イルエステル (R)-**2c**を用いてhCES1の他にhCES2, AADACで加水分解したところ、hCES1での加水分解速度はhCES2およびAADACと比較して30倍以上であった (Fig. 4B)。これはhCES1がインドメタシンプロドラッグ**2a-2e**の主要な加水分解酵素であり、hCES1は3-クロロ-1-フェニルプロパン-1-イルエステル**2d**と1-フェニルエタン-1-イルエステル**2e**などのベンジルエステル構造をもつ不斉中心を認識する能力が高いと考えられる。CESによる代謝活性化を受けるプロドラッグ創薬において、特に不斉中心にフェニル基を持つ化合物ではエナンチオマー間で加水分解速度に注意する必要がある。

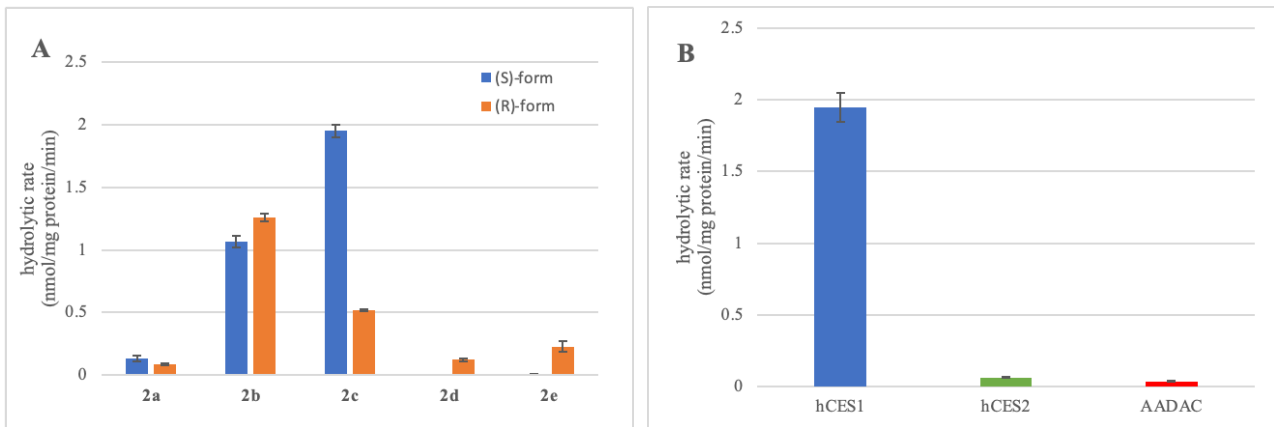


Fig. 4. Hydrolytic rates of indomethacin prodrugs **2a-2e** in hCES1 (A) and hydrolytic rates of indomethacin prodrug (*R*)-**2c** in hCES1, hCES2 and AADAC (B). Values are means  $\pm$  S.D. (n = 3).

インドメタシンプロドラッグ**3a-3x**において、hCES1ではアルキルモノエステル(**3a-3e**, **3s**)よりもアリエールエステル(**3f-3r**)の方が加水分解速度は大きかった(Fig. 5A)。これはアリエールエステルの加水分解物であるフェノキシドイオンの求核性が、アルキルモノエステルの加水分解物であるアルコキシドイオンの求核性よりも低いため、CESの加水分解機構において逆反応が起こりにくいためであると考えられる。hCES2では $\sigma$ -置換アリエールエステル(**3g**, **3j**, **3m**, **3p**)は他の位置異性体の加水分解速度よりも低かった(Fig. 5B)。hCES2では $o$ 位の置換基の立体障害による影響を受けやすいと考えられる。

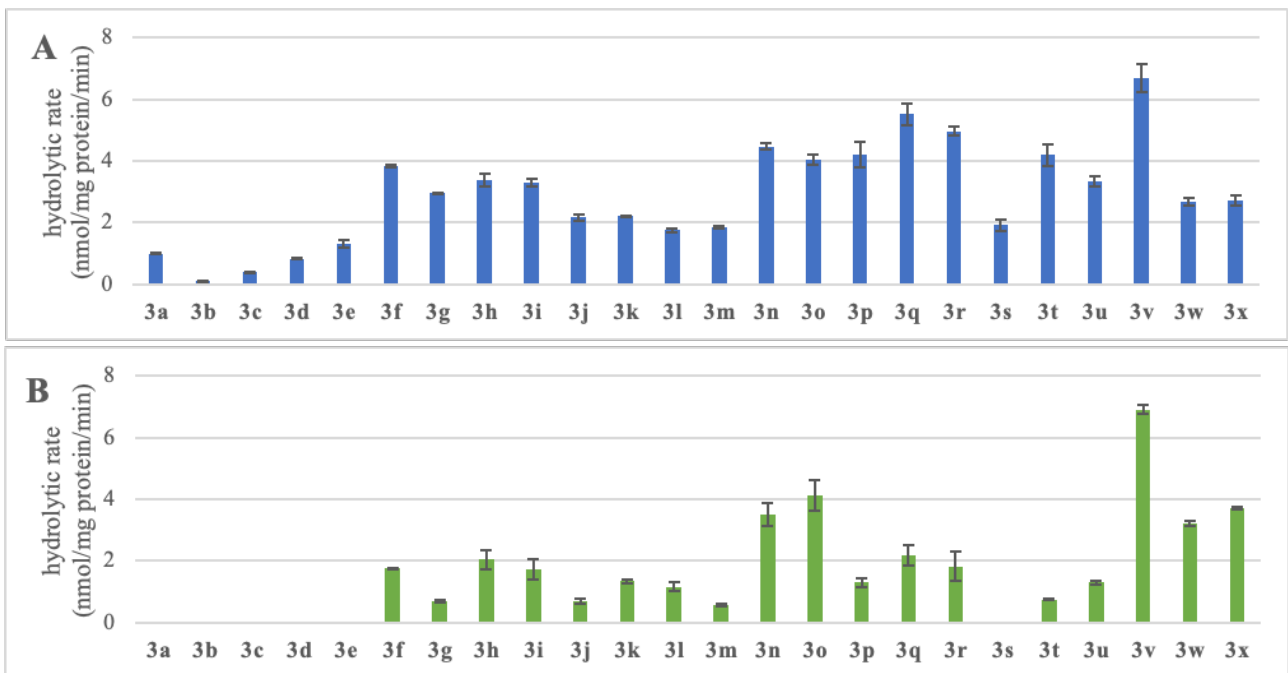


Fig. 5. Hydrolytic rates of indomethacin prodrugs **3a-3x** in hCES1 (A) and hCES2 (B). Values are means  $\pm$  S.D. (n = 3).

インドメタシンプロドラッグ**5a-5h**において、hCES1ではブチリルオキシメチルエステル**5b**の加水分解速度が最も大きく、炭素鎖が長くなるにつれ大きく低下した(Fig. 6A)。hCES2でもhCES1と同様の加水分解速度パターンを示し、ブチリルオキシメチルエステル**5b**の加水分解速度が最も高かった(Fig. 6B)。これまでは、hCES1で加水分解速度が大きい基質はhCES2では加水分解速度が低くなることが報告されていたが、今回の結果は今までのものとは異なっていた。これは第1にhCES1は大きくフレキシブルな活性部位ポケットを有しており、立体障害が大きいインドメタシン側のエステルも加水分解することができたためであると考えられる。第2に本研究で合成したジエステル構造を有するプロドラッグはCES2によって認識しやすい構造である、アル

コキシ基が大きくアシル基が小さい構造を持つためCES2でも高い加水分解速度を示したと考えられる。

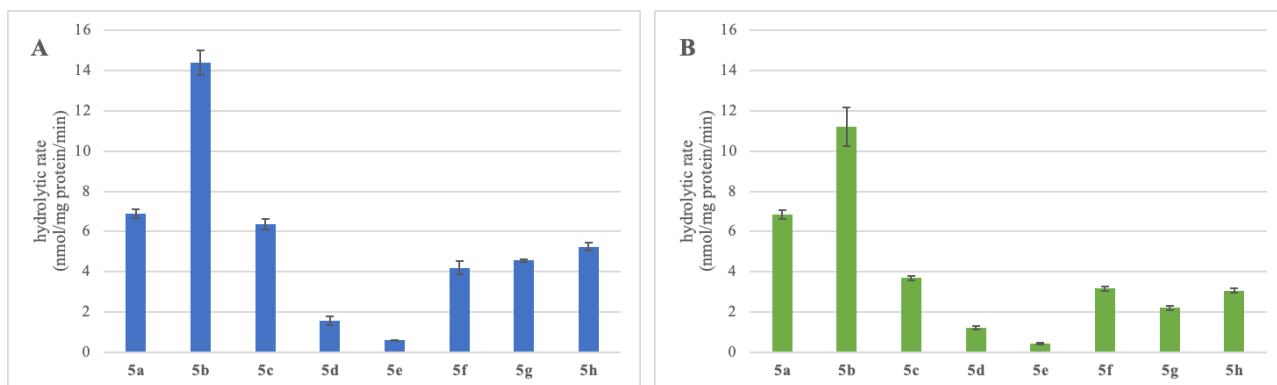


Fig. 6. Hydrolytic rates of indomethacin prodrugs **5a-5h** in hCES1 (A) and hCES2 (B). Values are means  $\pm$  S.D. (n = 3).

### 【結論】

本研究では、合成したインドメタシンプロドラッグを用いて hCES がどのような構造を認識し加水分解を行っているのかを明らかにした。第 1 に、キラル認識能では、hCES1 でベンジル型エステルのエナンチオマー間で加水分解速度に大きな差があることが確認された[5]。第 2 に、アルコキシ基の立体障害や電子密度を変化させることで、CES による加水分解速度を変化させる要因を解明した[6]。アルキルエステルとアリールエステルではプロドラッグ創薬においてそれぞれ注意する点が異なり、アルキルエステルでは分岐鎖においてメチル基の存在する位置で加水分解速度が変化し、アリールエステルでは置換される官能基により立体障害と電子密度が変化し加水分解速度に影響を与える。第 3 に、本研究で合成したジエステル構造を含むプロドラッグの場合、大きなアシル基を持つ基質であったとしても hCES2 活性が大きく上昇し、hCES1 活性に近づくことを明らかにした[7]。また、ジエステル構造では hCES1 に選択性が高い基質であっても hCES2 とも反応するプロドラッグにすることが可能であることを見出した。この構造は、これまでとは異なる状況や組織で利用するといった応用が期待できる。

以上の研究から、今後の CES による代謝活性化をターゲットにしたプロドラッグ創薬が発展し、臨床応用されることが期待される。

### 【参考文献】

- [1] Hosokawa M., *Molecules*, **2008**, 13, 412-431.
- [2] Fukami T. & Yokoi T. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **2012**, 27, 466-477.
- [3] Mizoi K., Takahashi M., Sakai S., Ogihara T., Haba M., Hosokawa M., *Xenobiotica*, **2020**, 50, 261-269.
- [4] Takahashi M., Ogawa T., Kashiwagi H., Fukushima F., Yoshitsugu M., Haba M., Hosokawa M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2018**, 28, 997-1000.
- [5] Takahashi M., Takani D., Haba M., Hosokawa M., *Chirality*, **2019**, 32, 73-80.
- [6] Takahashi M., Hirota I., Nakano T., Kotani T., Takani D., Shiratori K., Choi Y., Haba M., Hosokawa M., *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **2021**, 38, 100391.
- [7] Takani D., Takahashi M., Hosokawa M., *Xenobiotica*, 投稿中.