

令和 4 年 9 月 1 日現在

機関番号：32525

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16421

研究課題名（和文）親化合物の化学構造に影響されない水溶性プロドラッグ修飾基の開発

研究課題名（英文）Development of a water-soluble modifying group that is metabolically activated regardless of the chemical structure of the parent compound

研究代表者

高橋 正人（Takahashi, Masato）

千葉科学大学・薬学部・助教

研究者番号：40738770

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、エステル型およびアミド型プロドラッグの代謝活性化に重要な役割を果たす加水分解酵素の性質を利用し、水溶性プロドラッグ修飾基を開発した。具体的には、中性域を含む幅広いpHの水溶液に溶解し、親化合物の構造に影響されことなく代謝的に活性化される修飾基を調査した。フェニトインを親化合物として使用し、ジカルボン酸型修飾基を導入することにより、中性水溶液に溶解し、ヒト肝ミクロソームで代謝活性化しやすいプロドラッグを合成しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬にとって水溶性の低下は、経口剤の吸収率に影響を与えるだけでなく、注射剤としての使用にも大きな制限を与える。水溶性を向上させるために、最近では、多くの化合物に適応可能なプロドラッグ化法が盛んに研究されているが、水溶性が改善できたとしても、生体内での代謝活性化に失敗してしまうケースが多く存在する。本研究では、代謝活性化の問題を解決すべく、酵素の基質特異性を考慮して水溶性修飾基を合成した。この水溶性修飾基をフェニトインに導入することで、安定かつ中性溶液中で溶解するプロドラッグを開発した。

研究成果の概要（英文）：In this project, a water-soluble modifying group was designed considering the properties of hydrolases such as carboxylesterase in order to synthesize water-soluble prodrugs. Specifically, a modifying group that dissolves in aqueous solutions with a wide pH and is metabolically activated without being affected by the structure of the parent compound was investigated. By using phenytoin as a parent compound and introducing a dicarboxylate type modifying group, a prodrug that was dissolved in a neutral aqueous solution and easily metabolically activated in human liver microsomes was synthesized.

研究分野：薬物代謝学

キーワード：プロドラッグ 加水分解酵素 生体機能利用 薬学 有機化学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬にとって水溶性の低下は、経口剤の吸収率に影響を与えるだけでなく、注射剤としての使用にも大きな制限を与える。薬の水溶性向上のための簡便な方法として、アミノ基やカルボキシ基等の官能基を塩にする方法がある。この方法は水溶性向上に有効な手段であるが、塩に変換した官能基の pKa 値によって溶解性が異なるため、注射剤として使用するには適切な pH の溶解液を用いなければならない。これらの薬剤を他の薬剤と安易に混ぜると溶液の pH が変化することで着色、混濁や沈殿等の配合変化が起こる。近年、親化合物に水溶性の高い修飾基を導入した水溶性プロドラッグが盛んに研究されており、化合物の水溶性向上に成功した例が多く報告されている。しかしながら、これらの研究により開発された修飾基を他の化合物に導入しても、水溶性は改善されるが、代謝活性化能に失敗してしまうケースが存在する。これは、開発されたプロドラッグ修飾基の代謝活性化能が親化合物の構造に影響されてしまうためであり、現在でも親化合物の構造に影響されない「水溶性プロドラッグ修飾基」はほとんど開発されていない。

このような背景から、中性域を含む広範囲の pH の水溶液に溶解し、多くの化合物に適応可能な新しい水溶性プロドラッグ修飾基の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、中性域を含む広範囲の pH の水溶液に溶解し、親化合物の構造に影響されずに代謝活性化される「水溶性プロドラッグ修飾基」を開発することである。本研究では、フェニトイン(1)とインドメタシン(2)を用いて、プロドラッグ修飾基の最適化を行った。

3. 研究の方法

本研究は主に 1. 化学合成、2. 溶解性試験、3. 代謝活性化試験により構成され、これらを繰り返すことで修飾基構造の最適化を行った。

4. 研究成果

1. 化学合成および 2. 溶解性試験. フェニトイン(1)に炭酸カリウム存在下、37%ホルマリン溶液を反応させることでヒドロキシメチルフェニトインを合成し、このものを対応する酸無水物と反応させることで目的のプロドラッグ体(3a-3j)を得た。これらのプロドラッグ体の構造と pH7.2, 8.3 における溶解度は以下ようになった(表 1)。

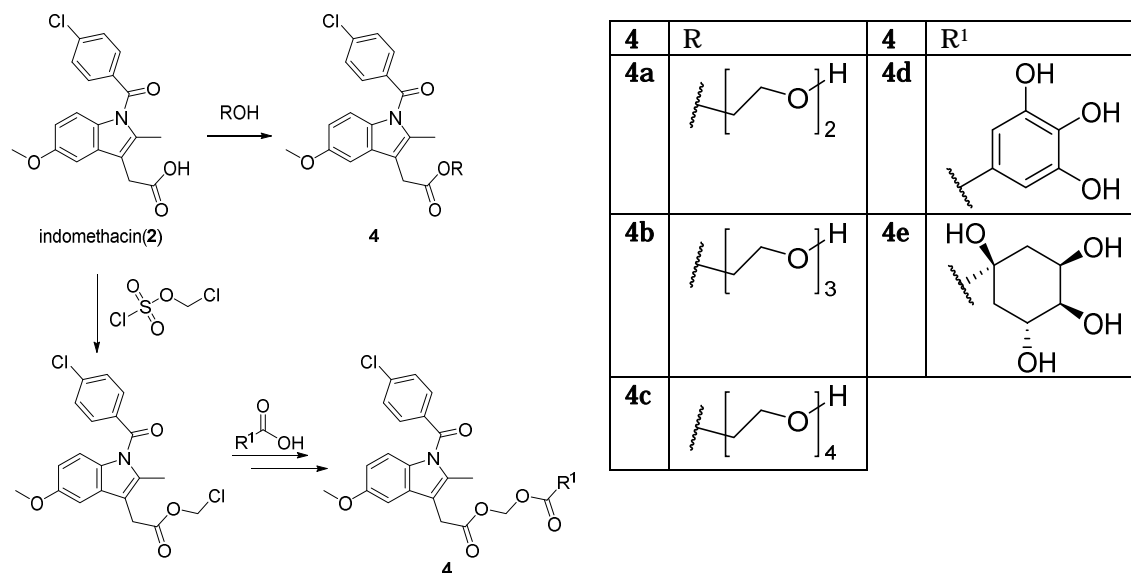
表 1. 合成したフェニトインプロドラッグ(3a-3j)の化学構造と溶解度

3	R	溶解度(mg/mL)		3	R	溶解度(mg/mL)	
		pH7.2	pH8.3			pH7.2	pH8.3
3a		7.55	6.82	3f		3.32	1.77
3b		6.67	6.88	3g		1.53	2.04
3c		4.13	4.52	3h		7.54	>10.0
3d		0.15	0.16	3i		2.71	>10.0
3e		0.31	5.54	3j		0.40	4.94

pH7.2 の緩衝液中では **3a**、**3b**、**3h** の溶解度が高かったが、これらは強塩基性溶液中にて非酵素的にフェニトインへの分解が確認された。一方、**3c** や **3i** などの立体的にかさ高いものは、pH7.2 の緩衝液中の溶解性は高くないものの、比較的高い pH においても安定であることが確認された。

インドメタシン(**2**)においては、中性溶液中で高い溶解性をもつポリエチレングリコールや多価アルコールに着目し、以下のようなプロドラッグ(**4a-4e**)を合成した(図 2)。まず、インドメタシン(**2**)に縮合剤および対応するアルコールを反応させることでエチレングリコールエステル(**4a-4c**)を合成した。次に、キナ酸および没食子酸より得られた保護体に対し、インドメタシン(**2**)にクロルスルホン酸クロロメチルから得られたクロロメチルエステルを反応させることで保護エステル体を得て、脱保護することで目的のプロドラッグ(**4d**, **4e**)を得た。なお、これらの溶解性については今後検討する予定である。

表 2. 合成したインドメタシンプロドラッグ(**4a-4e**)の化学構造



3. 代謝活性化試験. フェニトインプロドラッグ(**3a-3j**)をヒト肝マイクロソーム (HLM)、ヒト小腸マイクロソーム (HIM) 溶液中での代謝活性化速度を測定した(図 1)。全てのプロドラッグはヒト肝臓マイクロソーム溶液中で効率良く加水分解され、特に、枝分かれ構造をもつ **3h** や炭素鎖が長い **3j** の代謝活性化速度が大きかった。これは、ヒト肝臓においてエステル化合物の代謝に重要な役割を果たすカルボキシルエステラーゼ 1(hCES1)が、アシル基の大きなエステルを加水分解しやすいという性質に基づく結果であると考えられた。hCES1 において高い活性が報告されているテモカプリル(**5**)や hCES2 において高い活性が報告されているメチルプレドニゾンヘミスクシネート(**6**)と比較してもプロドラッグ(**3a-3j**)は高い代謝活性化能を有していた。

以上の結果より、ジメチルグルタル酸エステル **3i** が最も安定かつ酵素存在下において代謝活性化されやすく、中性溶液中で溶解性が高い結果が得られた。この **3i** の代謝活性化酵素を特定すべく、ヒト肝臓中の加水分解代謝に主に関与している hCES1、hCES2、アリールアミドデアセチラーゼ(AADAC)溶液中で試験を行った。驚くべきことに、hCES2、AADAC では全く代謝活性化されず(ND: not detected)、hCES1 により選択的に代謝活性化されることがわかった。

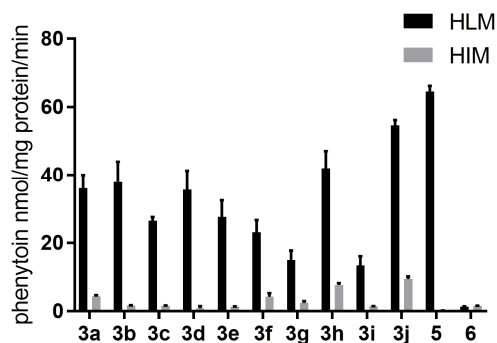


図 1. HLM および HIM 中の加水分解速度

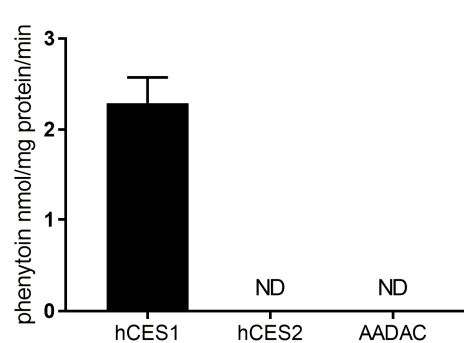


図 2. プロドラッグ **3i** の代謝活性化酵素の特定

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi Masato, Hirota Ibuki, Nakano Tomoyuki, Kotani Tomoyuki, Takani Daisuke, Shiratori Kana, Choi Yura, Haba Masami, Hosokawa Masakiyo	4. 巻 38
2. 論文標題 Effects of steric hindrance and electron density of ester prodrugs on controlling the metabolic activation by human carboxylesterase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100391 ~ 100391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2021.100391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takahashi Masato, Lee Yeon Joo, Kanayama Teruhiko, Kondo Yusuke, Nishio Kazuki, Mukai Kota, Haba Masami, Hosokawa Masakiyo	4. 巻 152
2. 論文標題 Design, synthesis and biological evaluation of water-soluble phenytoin prodrugs considering the substrate recognition ability of human carboxylesterase 1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 105455 ~ 105455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejps.2020.105455	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mizoi Kenta, Takahashi Masato, Sakai Sachiko, Ogihara Takuo, Haba Masami, Hosokawa Masakiyo	4. 巻 50
2. 論文標題 Structure-activity relationship of atorvastatin derivatives for metabolic activation by hydrolases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Xenobiotica	6. 最初と最後の頁 261 ~ 269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00498254.2019.1625083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takahashi Masato, Takani Daisuke, Haba Masami, Hosokawa Masakiyo	4. 巻 32
2. 論文標題 Investigation of the chiral recognition ability of human carboxylesterase 1 using indomethacin esters	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chirality	6. 最初と最後の頁 73 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chir.23141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Takahashi Masato, Masakiyo Hosokawa	4. 発行年 2020年
2. 出版社 CRC press	5. 総ページ数 15
3. 書名 Recent Advancement in Prodrugs (chapter 11)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------