

Gabexate Mesilate

小野薬品工業(株) 開発計画部
松岡昌三

緒論

生体内にはトリプシンやキモトリプシンなどの消化酵素の他に凝固線溶系, キニン系, 補体系等の蛋白分解酵素が恒常性の維持に働いている。また, これらの蛋白分解酵素には, それぞれの蛋白分解酵素阻害剤が存在し, その活性が調節されている。DICは種々の原因によって, 血管内で凝固系が活性化され全身に微小血栓が起こる一方で, 各種凝固系因子及び血小板が消費されて減少し, 難治性の出血傾向を呈する病態である。我々は, 蛋白分解酵素活性が亢進した病態での蛋白分解酵素阻害剤の臨床的有用性を考え, 藤井らと共に約200種余りの化合物を化学合成し Gabexate Mesilate(GM)を開発した(1)。GMは非ペプチド性の蛋白分解酵素阻害剤であり, すでに肺炎(2), DIC(3)への臨床的な有用性が認められている。今回, このGMの概要について説明する。

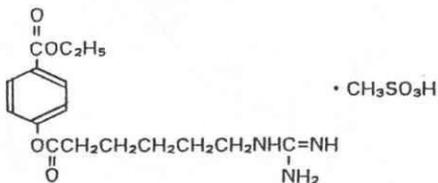
方法

1) 各種蛋白分解酵素に対するGMの阻害作用

in vitroにて低分子合成基質を用い, GM(Fig.1)の蛋白分解酵素阻害作用を測定した。蛋白分解酵素としてはトリプシン, トロンビン, カリクレイン, プラスミン, キモトリプシン, 白血球エラスターゼを用いた。

GMの阻害様式とKi値を検討する目的で Lineweaver - Burk plots を実施した(4)。

Fig. 1



$C_{16}H_{23}N_3O_4 \cdot CH_3SO_3H$: M.W. 417.48

Structural formula of Gabexate mesilate

(Ono Pharmaceutical Co, Ltd.)

2) GMの血中安定性

ヒト血漿中でのGMの安定性を測定した。血漿にGMを添加し37℃にて incubate した。経時的にトリプシン阻害作用を測定して, GMの血漿中での安定性を検討した。

3) GMの酵素阻害作用における可逆性

in vitroにてトリプシン, トロンビンにGMを添加して incubate した。5℃にて24時間透析した後, 再度酵素活性を測定し, GMのトリプシン, トロンビン阻害における可逆性を検討した(4)。

4) GMの抗凝固作用と抗線溶作用

in vitroにてトロンビンによるフィブリノーゲンの clotting に対するGMの抗凝固作用を測定した。また, in vitroにてプラスミンによるフィブリンの分解作用に対するGMの抗線溶作用を測定した(5)。

5) 白血球活性酸素産生に対するGMの影響

in vitroにて白血球からの活性酸素産生に対するGMの影響を検討し, ヒト白血球にGMを添加し, op-sonized zymosan 惹起による活性酸素産生に対するGMの影響を検討した(6)。

6) 組織因子活性に対するGMの影響

in vitroにてLPS惹起による白血球からの組織因子活性に対するGMの影響を検討した組織因子は活性型第X因子活性として測定した(4)。

7) TNF遊離に対するGMの影響

in vitroにてLPS惹起による単球からのTNF遊離に対するGMの影響を検討した。TNFは, モノクローナル抗体を用いてEIA法にて測定した(7)。

結果

1) 各種蛋白分解酵素に対するGMの阻害作用

GMはトリプシン, トロンビン, カリクレイン, プラスミン, キモトリプシン, 白血球エラスターゼを強力に阻害した(Table1)。また, GMのこれらの蛋白分解酵素に対する酵素阻害様式はすべて競争阻害様式であった。

Table 1

Ki values of Gabexate mesilate on various proteases

Enzyme	Source	Substrate	Ki value (μM)
Trypsin	Bovine pancreas	BAPNA	0.066
Thrombin	Human plasma	S-223B	1.5
Plasmin	Human plasma	S-2251	1.9
Kallikrein	Porcine pancreas	S-2266	190
Kallikrein	Human plasma	S-2302	3.6
Chymotrypsin	Bovine pancreas	S-4511	160
Elastase	Human leukocyte	Suc-APApNa*	160

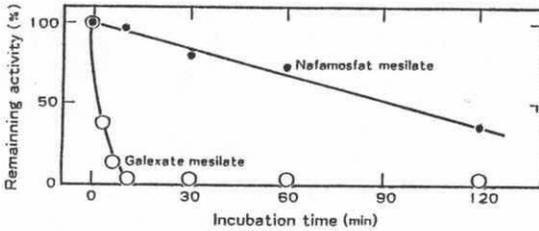
Ki values were obtained in the absence and presence of Gabexate mesilate by Lineweaver-Burk plots. *Sub-Ala-Pro-Ala-pNa.

(S. MATSUOKA, Japan. J. Pharmacol. 51, 455-463 (1989))

2) GMの血中安定性

GMはヒト血中における分解が速かた、その半減期は1分であった (Fig. 2, 3)。GMの血中での分解はエステラーゼによる酵素的分解反応であることが分解物の同定により示された。また、この分解物はトリプシン阻害作用を示さず不活性型であった。

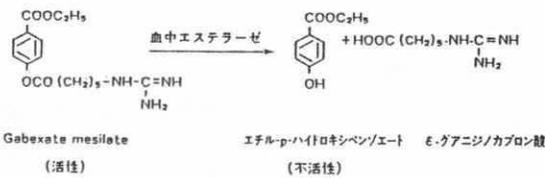
Fig. 2



	T 1/2 (min)
Gabexate mesilate	1
Nafamostat mesilate	90

Stability of Gabexate mesilate in human plasma

Fig. 3



Gabexate mesilate の血中での分解反応

3) GMの酵素阻害作用における可逆性

GMのトリプシン、トロンビンに対する阻害作用は透析により消失し、可逆的な阻害反応であった (Table2)。

Table 2

Effects of dialysis on thrombin inhibition and trypsin inhibition by Gabexate mesilate

a) Thrombin inhibition

	% Inhibition	
	20 μM	100 μM
Before dialysis	77.0	86.2
After dialysis	0.0	0.0

b) Trypsin inhibition

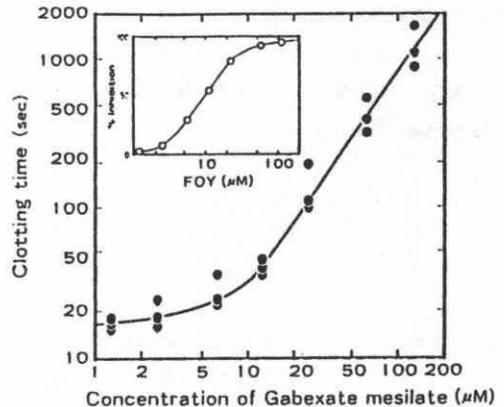
	% Inhibition	
	20 μM	
Before dialysis	87.7	
After dialysis	0.0	

(S. MATSUOKA, Japan. J. Pharmacol. 51, 455-463 (1989))

4) GMの抗凝固作用と抗線溶作用

GMはトロンビンによるフィブリノゲンからフィブリンへの反応を強力に阻害し、その50%阻害濃度 (IC₅₀)は10μMであった (Fig.4)。また、このGMのトロンビン阻害作用にはアンチトロンビンⅢの存在を必要としないことが示された。一方、GMはプラスミンによるフィブリンの分解に対しても用量に依存して阻害し、そのIC₅₀は100μMであった (Fig.5)。GMの凝固線溶系への阻害作用は凝固系により強く作用した。

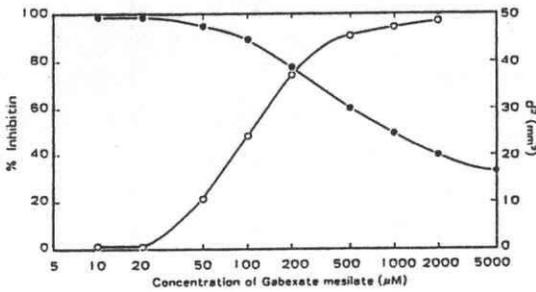
Fig. 4



Inhibitory effect of Gabexate mesilate on clotting activity of human thrombin

(H. OHNO, THROMBOSIS RESEARCH 19; 579-588 (1980))

Fig. 5



Inhibitory effect of Gabexate mesilate on fibrinolytic activity of human plasmin

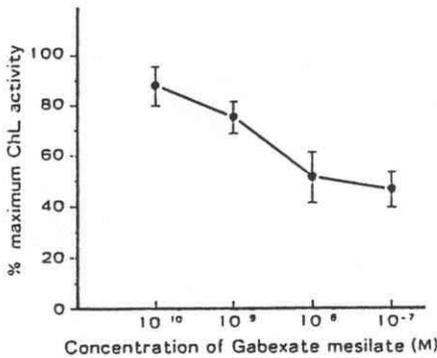
Square of diameter, d; ●—●
% Inhibition: ○—○

(H. OHNO, THROMBOSIS RESEARCH 19: 579-588 (1980))

5) 白血球活性酸素産生に対するGMの影響

GMは、Opsonized zymosan によって活性化した白血球の活性酸素産生を用量に依存して抑制した(Fig.6)。

Fig. 6



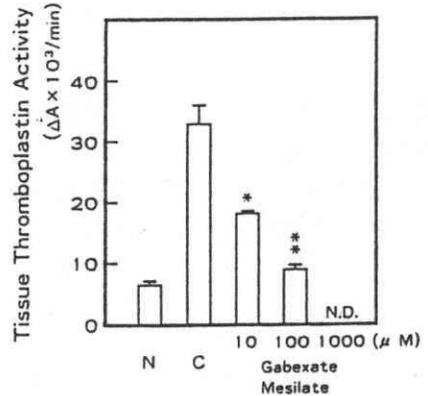
Effect of Gabexate mesilate on the active oxygen of human leukocyte

(末松 誠, 血膏(2)119 1985)

6) 組織因子活性に対するGMの影響

GMは、LPSによって活性化した白血球由来組織因子活性を用量に依存して抑制した(Fig.7)。

Fig. 7



Inhibitory effect of Gabexate mesilate on the release of tissue thromboplastin from endotoxin-stimulated leukocytes.

N; Normal group, C; Control group.

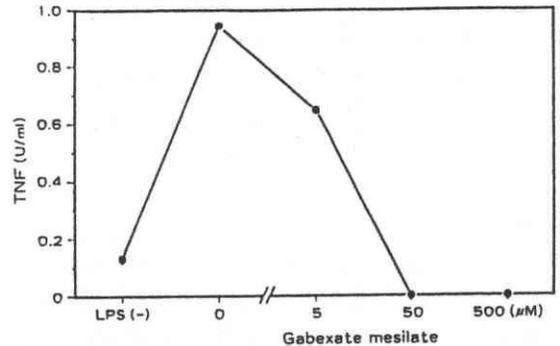
N.D.: not detectable. *: p<0.05, **: p<0.01

(S. MATSUOKA, Japan. J. Pharmacol. 51, 455-463 (1989))

7) TNF遊離に対するGMの影響

GMは、単球のTNF遊離を用量に依存して抑制した(Fig.8)。

Fig. 8



Effect of Gabexate mesilate on TNF release from mononuclear cells

(和田英夫, 三原大学医学部 第二内科)

考 察

GMは分子量417.48という低分子合成化合物であり(Fig.1),各種セリンプロテアーゼに対して強力な阻害作用を示した(Table1),その阻害作用は競争阻害様式であり,可逆的であった。これらのことは,GMがセリンプロテアーゼの基質結合部位に強い親和性を持ち,その結合が可逆的な結合であることを示唆している。GMはヒト血漿中でエステラーゼにより分解され,その半減期は約1分と短く,従ってGMの投与には持続的投与が必要と考えられた。

急性膵炎において,トリプシン酵素活性の亢進が病態と関与していることが考えられ,トリプシン阻害作用をもつGMは動物実験的に有効性を示し,臨床的にも石井

らにより有用性が示されたこと(2)から,1976年に肺炎治療剤として開発された。また,GMがトリプシン以外にもトロンビン,活性型第X因子を阻害し,その作用が線溶系に比し,凝固系に強力であることより(Fig.4,5),汎発性血管内血液凝固症(DIC)への応用の可能性が示唆された(4)。臨床的にも,1979年に神前を中心としてヘパリンとの比較臨床試験が実施された。その結果,ヘパリン投与群に比しより高い有用性が認められた(3)。DICに用いられているヘパリンはアンチトロンビンⅢと急速に結合し強力な抗凝固作用を示すが,DIC時にアンチトロンビンⅢの低下が認められる場合,十分な効果を認めにくい。GMはアンチトロンビンⅢ非依存的にトロンビン,活性型第X因子を阻害するのでアンチトロンビンⅢの低下したDICの患者にも有用と考えられる。GMはヒト血漿中でエステラーゼにより,速やかに分解され持続投与が必要であるが,その使用に際し調節性に富んでいる。

GMはトリプシン,トロンビン以外にもエラスターゼなどのセリンプロテアーゼを阻害することが確認され,引き続き基礎的研究がなされている。その結果,GMは白血球の活性酸素産性,組織因子活性,TNF遊離に対しても抑制するということが見いだされ報告されていた(4,6,7)。エラスターゼや活性酸素は組織障害因子の一つとして考えられており,又組織因子は外因系の凝固因子を活性化させることより,DICに対するGMの作用点の一つと思われる。また,TNFはDICや多臓器不全において,血中濃度が上昇しており,増悪因子の一つとして考えられている。GMはin vitroでLPS惹起によるTNF抗原の遊離を抑制し(Fig.8),またGMはDIC患者に対しても,血中TNF抗原値を有意に低下させることが報告されている(7)。活性酸素産性や細胞分泌機構に蛋白分解酵素の関与も考えられており,GMは細胞機能に関与した新しい蛋白分解酵素に対しても抑制的に作用する可能性が考えられる。今後も引き続き新しいプロテアーゼの研究を行い,生理作用について研究していきたいと考えている。そして,GMの新しい臨床応用の可能性を考えていく所存ある。

最後に,このような発表の機会を与えて下さいました研究会の皆様方に深く感謝いたします。

参考文献

- (1) S.Fujii,Biochem.Biophys.Acta.268, 221,1972.
- (2) 石井兼央, 現代医療 6, 1234, 1974.
- (3) 神前五郎, 医学のあゆみ 124,144,1983.
- (4) S.Matsuoka,Japan.J.Pharmacol.51,455,1989.
- (5) H.Ohno,thrombosis.Research 19;579,1980.
- (6) 末松 誠, 血管, 9, (2), 119,1986.
- (7) 和田英夫, 日本血栓止血学会(抄録)1990.