

Karboksylyliesteriaasit aihiolääkkeiden hydrolyyttisessä aktivaatiossa

→ Anni Nahkala*

Farmaseutti
Tammedica Apteekki, Tampere
anni.nahkala@gmail.com

→ Kristiina Huttunen

Dosentti, FT
Itä-Suomen yliopisto
kristiina.huttunen@uef.fi

*Kirjeenvaihto

TIIVISTELMÄ

Aihiolääketeknologia on yhä useammin käytetty menetelmä parantaa sekä kehitysvaiheessa että markkinoilla olevien lääkeaineiden biofarmaseuttisia ja farmakokineettisiä ominaisuuksia. Noin puolet markkinoilla olevista ahiolääkkeistä aktivoituu elimistössä hydrolyyttisten entsyymien vaikutuksesta. Näistä ahiolääkkeistä suurimman osan aktivoivat esteraasit, kuten karboksylyliesteriaasit.

Tällä hetkellä tärkeimmät ihmisestä löydetty ahiolääkkeiden aktivoimiseen osallistuvat karboksylyliesteriaasiryhmät ovat CES1 ja CES2. Molemmat näistä ihmisen karboksylyliesteriaaseista, hCE1 ja hCE2, esiintyvät useiden vierasaineille altistuvien elinten epiteelikudoksissa. Elimistössä hCE1 esiintyy kuitenkin runsaasti erityisesti maksassa, kun taas hCE2 esiintyy pääasiassa ohutsuolessa. CES1-entsyymien tyypillinen substraatti on esteri, joka on muodostunut suuresta asyyliryhmästä ja pienestä alkoholiryhmästä. CES2 taas katalysoi erityisesti pienestä asyyliryhmästä ja suuresta alkoholiryhmästä muodostuneiden esterien hydrolyysiä. CES-entsyymit katalysoivat hydrolyysiä emäskatalysoidulla, asylaation ja deasylaation sisältävällä mekanismilla.

Karboksylyliesteriaasit aktivoivat monia jo markkinoilla olevia ahiolääkkeitä, ja niitä on myös tutkittu mahdollisuutena muidenkin lääkeaineiden ominaisuuksien parantamiseksi. Näihin lääkkeisiin lukeutuvat muun muassa tietyt antiviraalit, ACE-estäjät ja statiinit. CES-entsyymit soveltuvatkin erilaisten esterirakenteisten ahiolääkkeiden metaboliseen aktivaatioon, ja niitä voidaan hyödyntää kohde-entsyymeiksi monien eri reitien kautta annosteltaville ahiolääkkeille.

Karboksylyliesteriaaseilla on huomattu suuriakin eroja aktiivisuudessa ja jakautumisessa yksilöiden, sukupuolten ja lajien välillä, mikä näkyy vaihteluna fysiologisessa vasteessa ja vaikeuttaa ahiolääkkeiden kehitystä eläinkokeiden mahdollisesti huonon soveltuvuuden takia. Niillä on myös havaittu CYP450-entsyymien tavoin interaktioita sekä lääkeaineiden että ruoka-aineiden, kuten greipin kanssa. Lisäksi ensikierron metabolian välttävän hCE2:n substraattina toimivan ahiolääkkeen aktivoituminen ohutsuolessa imeytymisen jälkeen on epäselvää, mikä johtuu lääkeaineen rajoittuneesta pääsystä takaisin ohutsuolessa entsyymien pääasialliselle sijaintipaikalle. Karboksylyliesteriaaseista vaaditaan vielä runsaasti tutkimusta niiden täyden potentiaalin sekä rajoitteiden selvittämiseksi.

Avainsanat: Ahiolääkkeet, karboksylyliesteriaasi, hydrolyysi, aineenvaihdunta, substraattispesifisyys

JOHDANTO

Aihiolääkkeet ovat aktiivisista lääkeainemolekyyleistä kehitettyjä, yleensä inaktiivisia, bioreversibeilejä johdoksia, joista lääkeaine vapautuu keuhossa kemiallisen tai entsyymattisen reaktion avulla (Ettmayer ym. 2004). Aihiolääketeknologiaa käytetään apuna ratkaisemaan aktiiviseen lääkeaineeseen liittyviä biofarmaseuttisia ja farmakokineettisiä ongelmia, jotka rajoittavat lääkeaineen käytettävyyttä. Lääkeaineen huono liukoisuus on yksi suurimmista ongelmista, joita lääkekehityksessä kohdetaan (Jornada ym. 2015). Muita ongelmia ovat esimerkiksi huono rasvaliukoisuus ja imeytyminen, lyhyt puoliintumisaika elimistössä, toksisuus ja paikallinen ärsytys (Stella ym. 2007). Aihiolääketeknologialla voidaan lääkeaineen vaikutus myös kohdentaa halutulle vaikutuspaikalle ja parantaa lääkkeen siirtymistä veri-aivoesteen läpi.

Viime vuosina kirjallisuudessa on aihiolääkkeiden osalta keskitytty erityisesti biofarmaseuttisten ominaisuuksien parantamiseen sekä tiettyjen entsyymien hyödyntämiseen aihiolääkkeen aktivoimisessa (Clas ym. 2014). Entsyymien ominaisuudet, kuten substraattispesifisyys, sijainti ja toiminta, tulee olla tiedossa, jotta voidaan arvioida sen soveltuvuutta kohde-entsyymiksi.

CYP450- eli sytokromi P450 -entsyymit ovat tähän mennessä olleet parhaiten tunnettuja lääkeainemetaboliaan osallistuvia entsyymejä. Kuitenkin aihiolääkkeet, jotka ovat riippuvaisia CYP450-välitteisestä metaboliasta, voivat asettaa merkittäviä haasteita turvallisen lääkehoidon toteuttamiselle (Clas ym. 2014). Nämä haasteet johtuvat yksilöiden välisistä eroista CYP450-pitoisuuksissa, geneettisestä polymorfismista, interaktioista sekä mahdollisista systeemistä haittavaikutuksista. Monet aihiolääkkeet hyödyntävätkin CYP450-entsyymien sijaan kehoon jakautuneita hydrolyyttisiä entsyymejä biokonversiossaan. On arvioitu, että noin puolet markkinoilla olevista aihiolääkkeistä aktivoituu keuhossa entsyymattisella hydrolyysillä (Ettmayer ym. 2004).

Karboksyliesteriaseilla on tärkeä rooli sekä kehon omien molekyylien että vierasaineiden metaboliassa (Wang ym. 2018). Viimeisten kahdenkymmenen vuoden aikana karboksyliesteriaseiden eli CES-entsyymien roolia metabolisissa sairauksissa ja vierasaineiden metaboliassa onkin tutkittu runsaasti. Tiedon lisäntyä myös kiinnostus karboksyliesteriaseiden mahdollisuuksista esterirakenteisten lääkkeiden aktiivisuuden parantamisessa on kasvanut. Suurin osa tällä hetkellä markkinoilla olevista aihiolääkkeistä meta-

boloiutuukin juuri esteraasien vaikutuksesta aktiiviseksi lääkeaineeksi (Ettmayer ym. 2004).

AIHIOLÄÄKKEIDEN RAKENNE JA SOVELLUTUKSET

Aihiolääkkeet koostuvat tavallisesti aktiivisesta lääkeaineesta ja siihen yleensä kovalenttisella sidoksella liitetystä aihio-osasta, josta lääkeaine vapautuu keuhossa entsyymattisen tai kemiallisen reaktion avulla (Stella ym. 2007). Aihio-osat sitoutuvat aktiiviseen lääkeaineeseen useiden erilaisten kemikaalisten ryhmien avulla, joista yleisimpiä ovat esterit, amidit, karmamaatit, karbonaatit ja eetterit (Jornada ym. 2015). Lääkeaineeseen liitettävällä aihio-osalla voidaan vaikuttaa syntyvän aihiolääkkeen ominaisuuksiin (Stella ym. 2007). Tällaisia ominaisuuksia ovat esimerkiksi ionisoituminen ja vesiliukoisuus, rasvaliukoisuus sekä sitoutuminen reseptoreihin ja toimiminen tietyn entsyymien substraattina. Näitä ominaisuuksia muokkaamalla voidaan parantaa lääkeaineen imeytymistä, kohdentaa lääkeaineen vaikutusta tiettyyn kudokseen ja pidentää lääkeaineen vaikutusaikaa.

Lääkeaineen imeytyminen biologisen kalvon läpi on välttämätöntä sen saamiseksi vaikutuspaikalleen. Imeytymistä voivat heikentää huono rasvaliukoisuus ja siten myös huono permeaatio sekä niukka vesiliukoisuus. Esimerkiksi karboksylihapon sisältävän lääkeaineen rasvaliukoisuutta voidaan tavallisesti lisätä formuloimalla siitä esterit (Stella ym. 2007). Tämä esterisidos piilottaa fysiologisessa pH:ssa ionisoituvan karboksyyliryhmän, jolloin lääkeaineen rasvaliukoisuus kasvaa ja näin myös permeaatio paranee. Esteri hydrolysoituu elimistön esteraasien vaikutuksesta päästyään systeemiseen verenkiertoon. Imeytymistä voidaan tehostaa myös hyödyntämällä elimistön aktiivisia kuljetusproteiineja, kuten suoliston peptidinkuljettajaproteiineja, erityisesti lääkkeillä, joilla passiivinen diffuusio on mitätöntä johtuen molekyylin polaarisuudesta tai varauksesta. Tällöin alkuperäiseen lääkeaineeseen liitetään aihio-osa, joka muistuttaa molekyyliirakenteeltaan kuljetusproteiinin luonnollista substraattia.

Kohdentamalla lääkeaine haluttuun kudokseen voidaan vähentää haittavaikutuksia muualla elimistössä, ehkäistä ennen aikaista metaboliaa tai parantaa kliinistä käytettävyyttä (Stella ym. 2007). Aihiolääkkeitä voidaan kohdentaa esimerkiksi keskushermostoon, syöpäkudokseen ja maksaan.

KARBOKSYLIESTERAASIT

Karboksyliesteriaseit ovat esteraasien alaryhmä, ja ne katalysoivat pääasiassa esterisidosten hydrolyysi-

siä, mutta voivat katalysoida myös amidien ja tioestereiden hydrolyysiä (Fukami ja Yokoi 2012). Hydrolyysissä substraattina toimivaan molekyyliin liitetään vesimolekyyli, mikä saa aikaan substraatin hajoamisen kahdeksi tuotteeksi (Testa ja Mayer 2003a). Nämä tuotteet ovat yleensä polaarimpia eli myös vesiliukoisempia verrattuna alkuperäiseen yhdisteeseen (Laizure ym. 2013). Esterin hydrolyysissä hajoamistuotteita ovat karboksylihappo ja alkoholi. Karboksyliesteriaseiden merkitys aihiolääkkeiden metaboliassa aktivoimisessa on tällä hetkellä ihmisen entsyymeistä suurin.

Karboksyliesteriaseit kuuluvat seriinihydrolaasien alaryhmään, eli ne sisältävät seriini-aminohapon aktiivisessa kohdassaan (Fukami ja Yokoi 2012). Karboksyliesteriaseit jaetaan yhteensä viiteen luokkaan, CES1-CES5 (Hosokawa 2008). Jako tehdään substraattispesifisyyden, kudoksiin jakautumisen, immunologisten ominaisuuksien sekä geenisäätelyn mukaan (Imai ym. 2006). Ihmiskehosta on kuitenkin tällä hetkellä löydetty vain 3 karboksyliesteriaseiden luokkaa (Wang ym. 2018). Suurin osa tutkituista karboksyliesteriaseista kuuluu luokkiin CES1 ja CES2 (Hosokawa 2008). Useimmat karboksyliesteriaseit ovat glykoproteiineja, joiden hiilihydraattiketju vaaditaan entsyymien aktiivisuuteen. Karboksyli-

terasiit osallistuvat monien laajassa käytössä olevien lääkeaineiden, kuten antiviraalien, verihiutaleiden estäjien, ACE-estäjien (angiotensiiniä konvertoivan entsyymien estäjät) ja statiinien metaboliseen aktivaatioon (Laizure ym. 2013). Niillä on myös tärkeitä fysiologisia tehtäviä lipidien homeostaasissa (Wang ym. 2018). CES1- ja CES2-entsyymien keskeisiä ominaisuuksia on koottu **Taulukkoon 1**.

Karboksyliesteriasei 1

Rakenne ja toiminta

Karboksyliesteriasei 1 koostuu kolmesta toiminnallisesta alueesta; keskeisestä katalyyttisestä alueesta, $\alpha\beta$ -alueesta sekä viereisestä säätelyalueesta, joka sisältää ligandia sitovan osan (Wang ym. 2018). Katalyyttiselle alueelle sijoittuu kolmen aminohapon muodostama katalyyttinen yksikkö, joka muodostuu seriinistä, glutamiinihaposta ja histidiinistä. Tämä katalyyttinen yksikkö sijaitsee CES1:n aktiivisen onkalon pohjalla, keskellä molekyyliä (Hosokawa 2008). Aktiivinen onkalo koostuu suuresta, joustavasta taskusta ja pienemmästä jäykästä taskusta. CES1 voi esiintyä monomeerinä, trimeerinä ja heksameerinä (Wang ym. 2018).

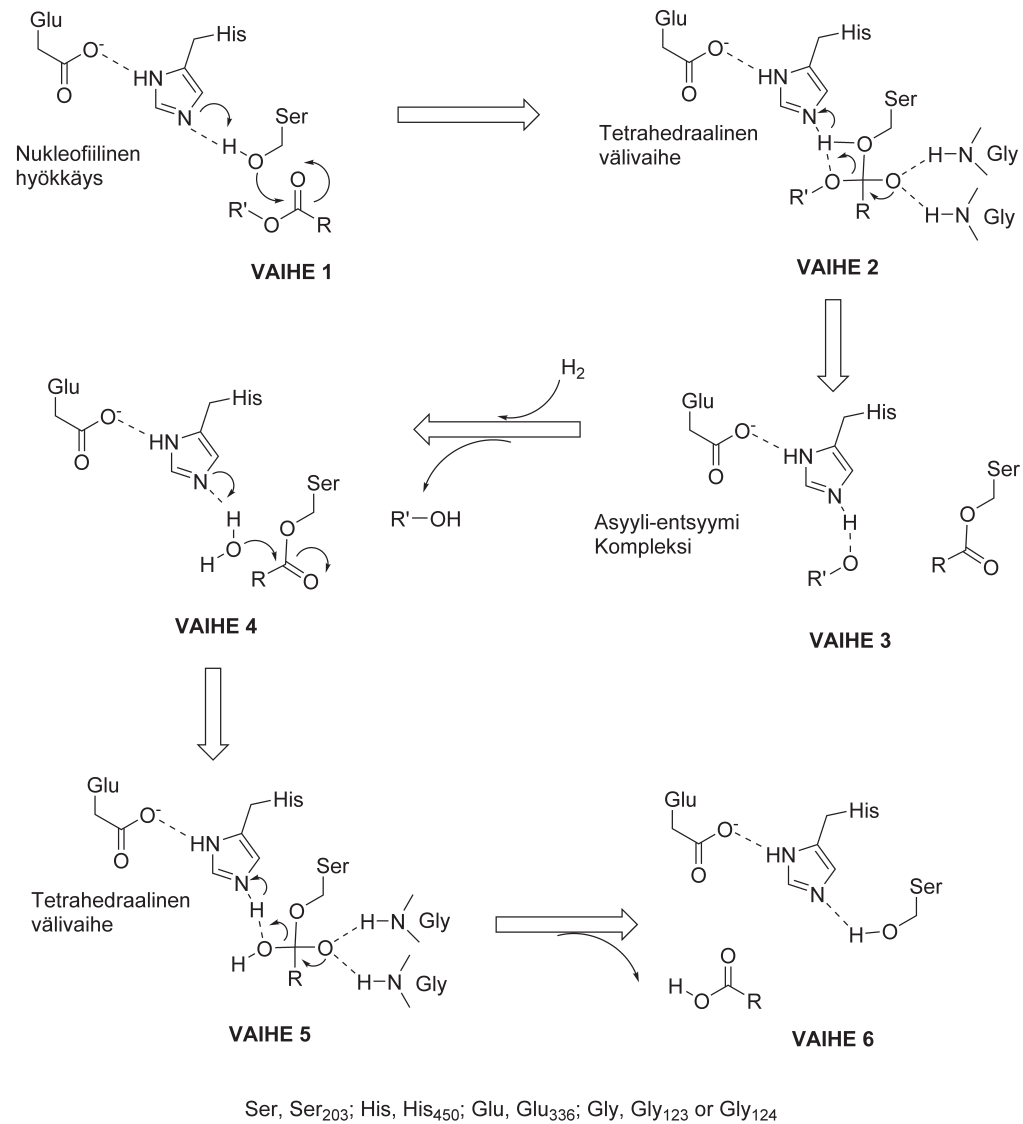
Karboksyliesteriaseit hydrolysoivat substraattinsa emäskatalysoidulla mekanismilla kaksivaiheisen

Taulukko 1. CES1- ja CES2-entsyymien ominaisuuksia (Wang ym. 2018)

Ominaisuus	CES1	CES2
Muoto	Monomeeri, trimeeri tai heksameeri	Monomeeri
Katalyyttinen yksikkö	Ser ²²¹ , Glu ³⁵⁴ , His ⁴⁶⁸	Ser ²²⁸ , Glu ³⁴⁵ , His ⁴⁵⁷
Tyypillinen substraatti	Suuri asyyliryhmä, pieni alkoholiryhmä	Pieni asyyliryhmä, suuri alkoholiryhmä
Sijainti	Pääasiassa maksassa	Pääasiassa ohutsuolessa
Aihiolääkesubstraattit	Enalapriili, dabigatraani, lovastatiini, oseltamiviiri, klopidoogreeli	Aspiriini, kandesartaani, valasikloviiri, prasugreeli, CPT-11 eli irinotekaani
Inhibiittorit	Simvastatiini, telmisartaani, Greippimehu	Simvastatiini, fenofibraatti, karvediloli, fystostigmiini, diitiatseemi, loperamidi

reaktion avulla, joka sisältää asyilaation sekä deasyilaation (**Kuva 1**) (Testa ja Mayer 2003b; Wang ym. 2018). Aluksi syntyy substraatti-entsyymi-välimuoto, joka saa aikaan substraatin oikean sijoittumisen reaktiota varten (Hosokawa 2008). Tämän jälkeen katalyyttisen yksikön seriniin OH-ryhmän happi liittyy esterisidoksen karbonyylihiileen nukleofilis-

lä hyökkäyksellä. Tämä saa aikaan tetrahedraalisen välimuodon syntymisen ja edelleen esterisidoksen hajoamisen alkoholin vapautuessa substraatista. Vapautuva alkoholiryhmä saa protonin katalyyttisen yksikön histidiiniltä. Seuraavaksi vesi liittyy jäljelle jääneeseen asyyl-entsyymi-välimuotoon, mikä johtaa toisen tetrahedraalisen välimuodon syntymiseen.



Kuva 1. Karboksyyliesteriasein hydrolyyttinen mekanismi. Substraatin hydrolyysiin osallistuvat kolmen aminohapon muodostama katalyyttinen yksikkö (Glu, His, Ser) ja tetrahedraalisia välimuotoja stabiloivat glysiinit (Gly) (muokattu Hosokawa 2008).

Tämän jälkeen histidiini luovuttaa protonin seriinille ja karboksyylihappo vapautuu entsyymistä. Samalla karboksyyliesteri palautuu alkuperäiseen tilaansa histidiiniin ja glutamiinihapon stabiloidessa tetrahedraalista siirtymävaihetta vetysidoksilla. Aktiivisella alueella sijaitsevat, vierekkäiset glysiini-aminohapot stabiloivat reaktiossa syntyviä tetrahedraalisia välimuotoja, jotka sisältävät negatiivisesti varautuneen hapen. Aihiolääkkeillä toinen reaktiossa vapautuvista tuotteista, alkoholi tai karboksyylihappo, toimii aktiivisena lääkeaineena.

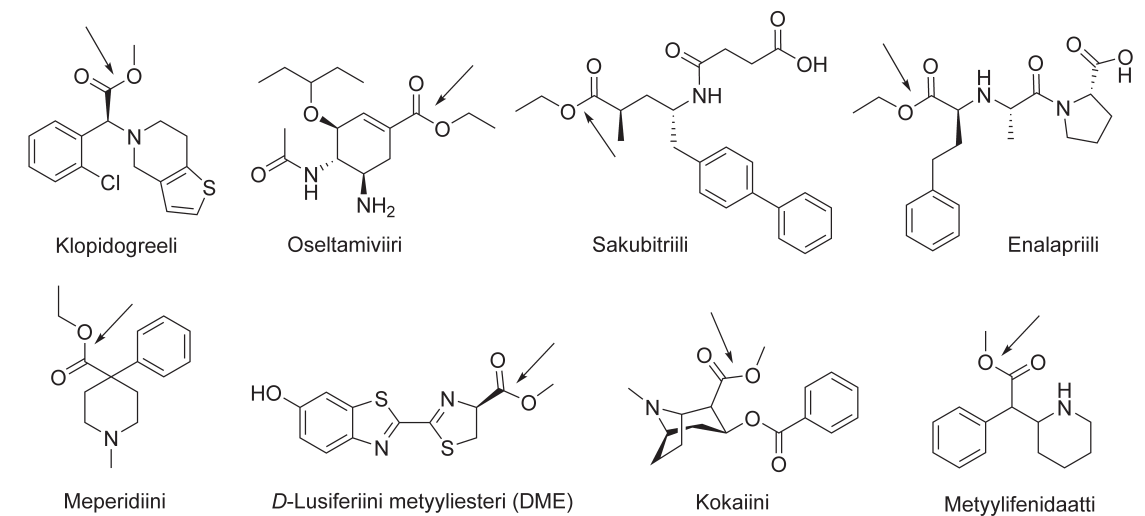
Substraattispesifisyys

Karboksyyliesteriaseilla on laaja substraattispesifisyys, ja ne voivatkin hydrolysoida yhdisteitä, jotka sisältävät esterin, amidin, tioesterin tai karbamaatin (Wang ym. 2018). Niiden tyypillisimpiä substraatteja ovat kuitenkin alifaattiset esterit (Testa ja Mayer 2003c). CES1 suosii estereitä, jotka sisältävät pienen alkoholiryhmän ja suuren asyyliryhmän (**Kuva 2**) (Wang ym. 2018). CES1 voi kuitenkin hydrolysoida myös yhdisteitä, jotka sisältävät pienen asyyliryhmän. Entsyymien kaksi erilaista taskua mahdollistavat siis monenlaisten substraattien hydrolyysin. Aktiivisen alueen orientaatio ja sijoittuminen luovat ideaalisen ympäristön erityisesti hydrofobisten substraattien hydrolyysille (Hosokawa 2008).

Sijainti elimistössä

Karboksyyliesteriasein 1-ryhmän entsyymit ovat jatkuneet elimistössä moniin kudoksiin (Imai ym. 2006). Niitä esiintyy runsaasti maksassa ja adiposyyteissä eli rasvasoluissa sekä pienemmissä määrin munuaisissa, monosyyteissä, keuhkoissa, suolistossa, kiveksissä, sydämessä ja makrofageissa (Wang ym. 2018). Maksassa CES1-entsyymeillä on suuri rooli niiden substraatteina toimivien lääkeaineiden ensikierron metaboliassa (Laizure ym. 2013). CES1-entsyymeillä ei ole juurikaan havaittu aktiivisuutta veressä (Wang ym. 2018).

Karboksyyliesteriasein sijaitsevat tyypillisesti elinten epiteelikudoksessa (Wang ym. 2018). Solun sisästä ne ovat pääasiassa sijoittuneena endoplasmakalvostoon, jossa entsyymit sitoutuvat membraanin sisäosan KDEL-reseptoriin (viittaa aminohappojärjestykseen Lys-Asp-Glu-Leu, jonka reseptori tunnistaa) C-terminaalisen signaalipeptidinsä avulla. Membraanista irtoaminen tapahtuu tämän, noin 17–20 aminohapon mittaisen, peptidin pilkkoutuessa entsyymistä irti, jolloin se on vapaana endoplasmakalvoston lumenissa. Vapautuminen endoplasmakalvostosta viittaa siihen, että karboksyyliesteriasein eivät ole transmembraaniproteiineja. Karboksyyliesteriasein on löydettävissä myös maksan sytosolista eli solulimasta (Fukami ja Yokoi 2012).



Kuva 2. Karboksyyliesteriasein 1:n tyypillisiä substraatteja, joissa esterin muodostavat pieni alkoholiryhmä ja suuri asyyliryhmä. Nuoli osoittaa esterisidoksen, johon metaboliareaktio kohdistuu (muokattu Wang ym. 2018).

Käytännön sovellutukset ja haasteet aihiolääketeknologiassa

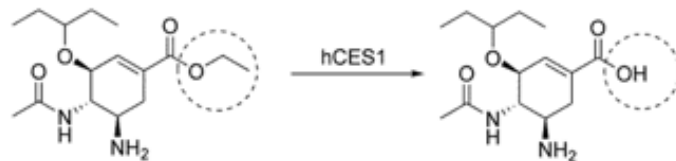
CES1-luokan entsyymeistä ihmisellä esiintyy ihmisen karboksyyliesteriäsi eli hCE1, joka osallistuu monien lääkeaineiden metaboliaan maksassa (Laizure ym. 2013). Tällöin siis aihiolääkkeen tulee imeytyä porttilaskimoon muuttumattomana ja hajota maksassa aktiiviseksi lääkeaineeksi ja aihio-osaksi, jotka vapautuvat systeemiseen verenkiertoon. Ensikierron metabolia välttävien aihiolääkemolekyylien hydrolyysi on riippuvainen verenkierron nopeudesta. Aktiivinen lääkeaine on usein liian vesiliukoinen, jolloin se erityy muuttumattomana virtsaan.

CES1-entsyymit hydrolysoivat monia laajassa käytössä olevia aihiolääkkeitä, kuten enalapriilia sekä muita ACE-estäjiä, dabigatraania, simvastatiinia, lovastatiinia ja oseltamiviiriä (Laizure ym. 2013). Oseltamiviirikarboksylaatti on neuraminidaasin estäjä, jota käytetään influenssan hoitoon ja ehkäisyyn (Duodecim lääketietokanta 2018). CES1-entsyymeille tyypillisten substraattien tavoin se muodostuu suuresta asyyliryhmästä ja pienestä alkoholiryhmästä (Kuva 2) (Laizure ym. 2013). Aktiivinen lääkeaine oseltamiviirikarboksylaatti on liian polaarinen imeytymään ohutsuoesta, ja näin ollen sillä onkin hyvin pieni biologinen hyötösuus suun kautta annettuna. Tästä karboksyylihaposta muodostettu etoksies-teri on huomattavasti vähemmän polaarinen, ja sillä onkin hyvä biologinen hyötösuus. Imeytymisen jälkeen inaktiivinen esteri hydrolysoidaan nopeasti maksassa hCE1:n toimesta aktiiviseksi karboksyla- tiksi (Kuva 3). Aihiolääkemuodon ansiosta oseltami- viiri voidaan annostella suun kautta epäkäytännöllisen ja kalliin suonensisäisen annostelun sijaan. Vesiliukoisena molekyylinä oseltamiviirikarboksylaatin eliminaatio tapahtuu erittymällä muuttumattomana virtsaan (Duodecim lääketietokanta 2018).

CES1-entsyymeillä on lisäksi monia muita mahdollisia sovellutuksia. Esimerkiksi atorvastatiini on

niukasti rasvaliukoinen karboksyylihaporakenteensa takia, mikä estää sen imeytymistä ohutsuoesta ja pienentää hyötösuutta (Mizoi ym. 2016). Mizoin tutkimuksessa atorvastatiinista syntetisoitiin esterifikaatiolla aihiolääkkeitä, joilla oli suurempi hyötösuus. Nämä aihiolääkkeet hydrolysoituivat maksassa CES1-entsyymien toimesta, ja vapauttivat näin aktiivisen lääkeaineen systeemiseen verenkiertoon. Formuloimalla atorvastatiinista esterirakenteisia aihiolääkkeitä voitaisiin siis parantaa sen biologista hyötösuutta ja seurauksena pienentää terapeutista annosta. CES1-ryhmän entsyymejä on löydetty myös keuhkojen sytosolista ja mikrosomeista, jolloin niitä voitaisiin mahdollisesti hyödyntää suunnitel- taessa aihiolääkkeitä annettavaksi keuhkojen kautta (Gabriele ym. 2018).

Yksilöiden välillä on hCE1:llä havaittu suuriakin eroja hydrolyysin tehokkuudessa tutkittaessa sub- straatteina toimivien lääkeaineiden pitoisuuksia ve- ressä johtuen geneettisestä variaatiosta (Laizure ym. 2013). Näiden lääkeaineiden avulla on havaittu 6–30-kertaisia eroja entsyymien pitoisuuksissa mak- san mikrosomeissa. Tämä voi näkyä suurinakin eroi- na lääkeaineen farmakokinetiikassa sekä fysiologis- sa vaikutuksissa ja voi johtaa haittavaikutusten esiin- tymiseen tai vasteen puuttumiseen tavallisilla tera- peuttisilla annoksilla. CES1-entsyymien substraateilla on havaittu myös monia interaktioita, jotka johtavat muuttuneeseen plasmaprofiiliin. Esimerkiksi simvas- tatiini ja telmisartaani inhiboivat CES1-entsyymejä (Wang ym. 2018). Lisäksi greippimehun, jolla on tie- detty olevan interaktioita CYP450-entsyymien kans- sa, on todettu inhiboivan enalapriilin ja lovastatiinin CES1-katalysoitua hydrolyysiä (Li ym. 2007). Karbok- syyliesteriaktiivisuudella on mahdollisesti myös eroa miesten ja naisten välillä (Laizure ym. 2013). Ky- seisten lääkkeiden kliinisessä käytössä tulisikin ottaa huomioon mahdolliset seikat, jotka aiheuttavat eroja lääkeaineiden plasmapitoisuuksissa.



Kuva 3. Aihiolääke oseltamiviirin metaboloituminen maksassa hCE1:n vaikutuksesta aktiiviseksi oseltami- viirikarboksylaatiksi. Reaktiossa aihio-osana irtoaa etanolimolekyyli (muokattu Laizure ym. 2013).

Karboksyyliesteriäsiin aktiivisuudessa ja jakau- tumisessa on huomattaviakin vaihteluita myös eri eläinlajien välillä (Taketani ym. 2007). Esimerkiksi rotalla CES-entsyymien aktiivisuus on suurempi ih- miseen verrattuna, jolloin aihiolääkkeen hydrolyysi aktiiviseksi lääkeaineeksi on usein myös suurempaa. Lisäksi pienillä jyräjillä CES-entsyymien pitoisuus plasmassa on huomattavan suuri, kun taas ihmisellä CES-entsyymit eivät esiinny plasmassa käytännössä lainkaan (Hatfield ym. 2016). Tämä aiheuttaa vaike- uksia lääkkeiden suunnittelussa, sillä prekliinisessä vaiheessa koe-eläimillä määritettyjä farmakokineet- tisiä ja -dynaamisia tuloksia ei välttämättä voida suo- raan soveltaa ihmisille (Taketani ym. 2007).

Karboksyyliesteriäsi 2

Rakenne ja toiminta

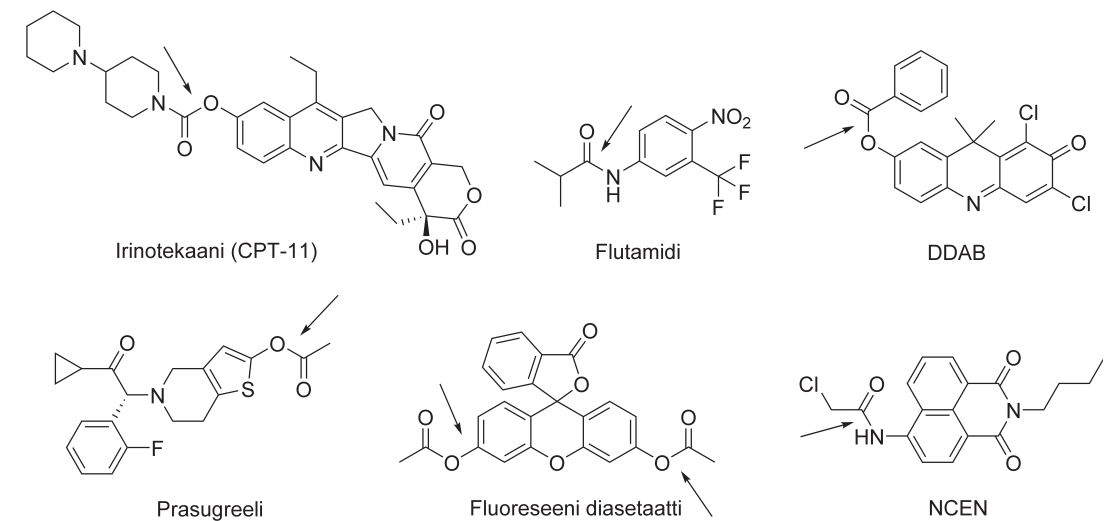
Karboksyyliesteriäsi 2 kuuluu CES1:n tapaan seri- nihydrolaasien ryhmään, mutta esiintyy vain mono- meerimuodossa (Wang ym. 2018). CES2 sisältää sa- moista aminohapoista koostuvan katalyyttisen yk- sikön kuin CES1-ryhmällä (Ser, Glu, His), mutta ne sijaitsevat eri kohdissa entsyymien aminohappoket- juu. Nämä aminohapot ovat suuressa roolissa ent- syymien katalyyttisessä aktiivisuudessa. CES2:n aktiivisen kohdan tasku on myös muodoltaan erilainen verrattuna CES1:een, mikä näkyy erilaisena tyypil-

lisenä substraattispesifisyytenä. CES2 ei myöskään sisällä kahta taskua aktiivisessa kohdassaan, jolloin substraattikirjo on myös suppeampi.

CES2 hydrolysoi substraatteja samalla emäskata- lysoidulla mekanismilla kuin CES1 (Kuva 1) (Wang ym. 2018). Tässä reaktiossa asyyl-entsyymimolekyyli toimii välivaiheena alkoholin vapautuessa. Lopuksi välituote hajoaa vapauttaen karboksyylihapon ja al- kuperäisessä muodossaan olevan entsyymien.

Substraattispesifisyys

Karboksyyliesteriäsi hydrolysoivat yhdisteitä, jotka sisältävät esterin, amidin, tioesterin tai karbamaatin (Wang ym. 2018). Tyypillisimpä substraatteja ovat ali- faattiset esterit (Testa ja Mayer 2003c). CES2-entsy- ymit, kuten ihmisen karboksyyliesteriäsi hCE2, hyd- rolysoivat parhaiten yhdisteitä, joissa esterin ovat muodostaneet suuri alkoholiryhmä ja suhteellisen pieni asyyliryhmä (Kuva 4) (Imai ym. 2006). Entsy- ymien aktiivisuus vähenee substraatin asyyliryhmän kasvaessa. Tämän lisäksi metyyliryhmän sijaitsemi- nen haaroittuneen asyyliryhmän 3-asemassa vähen- tää hydrolyysiä verrattuna metyyliryhmään 2-ase- massa, johtuen tällöin syntyvästä steerisestä estees- tä. CES2 on ilmeisesti substraattispesifisyydeltään suppeampi kuin CES1, eikä kykene hydrolysoimaan yhtä monenlaisia yhdisteitä.



Kuva 4. CES2-entsyymien tyypillisiä substraatteja, joissa esterin muodostavat pieni asyyliryhmä ja suuri alkoholiryhmä. Punainen nuoli osoittaa kuvassa esterisidoksen, johon hydrolyysi kohdistuu. DDAB = Didodecyldimethylammonium bromide, NCEN = N-(2-butyl-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de] isoquinolin-6-yl)- 2-chloroacetamide (muokattu Wang ym. 2018).

sä voida soveltaa suoraan ihmiseen (Taketani ym. 2007). Tästä huolimatta karboksyyliesteräsit ovat olleet erittäin hyödyllisiä aihiolääketeknologiassa ja kliinisessä käytössä.

Lisääntyneestä kiinnostuksesta ja tutkimuksesta huolimatta aihiolääkkeiden aktivointiin osallistuvat karboksyyliesteräsit ovat vielä melko huonosti tunnettuja ja hyödynnettyjä. Näitä kehosta löytyviä entsyymejä voidaankin mahdollisesti hyödyntää niiden luontaisilla ilmenemispaikoilla vielä paljon apukeinoina aihiolääketeknologiassa sekä lääkesuunnittelussa.

SUMMARY

Carboxylesterases in the hydrolytic activation of prodrugs

→ Anni Nahkala*

Pharmacist

Tammedica pharmacy, Tampere

anni.nahkala@gmail.com

→ Kristiina Huttunen

Adjunct professor, Ph.D.

University of Eastern Finland

kristiina.huttunen@uef.fi

*Correspondence

Nowadays prodrug technology is utilized more and more often to improve the biopharmaceutical and pharmacokinetic properties of drugs that are both currently on the market or still under development. About half of the prodrugs currently on the market are activated by the body's hydrolytic enzymes. Most of these prodrugs are more specifically activated by esterases such as carboxylesterases.

At the moment the most important groups of carboxylesterases found in the human body that activate prodrugs are CES1 and CES2. Both human carboxylesterases, hCE1 and hCE2, are generally found in the epithelium of organs that are commonly exposed to xenobiotic compounds. However, hCE1 is most commonly found in the liver, whereas hCE2 can predominantly be found in the small intestine. CES1 enzymes generally prefer to hydrolyze esters with a bulky acyl group and a small alcohol group. CES2 enzymes instead prefer to hydrolyze esters that contain a small acyl group and a bulky alcohol group. Carboxylesterases catalyze hydrolysis using a base-catalyzed mechanism, that contains both an acylation and a deacylation.

Carboxylesterases hydrolyze many prodrugs that are currently on the market and have also been researched as a possibility to improve the properties of other drugs. They can be applied to the metabolic activation of several different ester prodrugs and can be used as target enzymes for prodrugs administered via many different sites.

Considerable variety has been observed in both activity and distribution of carboxylesterases among species, genders and individuals, resulting in varying physiological response and challenges in prodrug development since the results from animal tests may not correlate to humans. Just as for the CYP450 enzymes, numerous drug and food interactions have also been discovered for human carboxylesterases. The hydrolytic activation of an hCE2 substrate prodrug that escapes first-pass metabolism is also still unclear since it no longer has direct access to the small intestine where hCE2 is mostly located. Thus, a lot more research on carboxylesterases is required to uncover their full potential and limitations.

Keywords: Prodrugs, carboxylesterases, hydrolysis, metabolism, substrate specificity

SIDONNAISUUDET

Ei sidonnaisuuksia.

KIRJALLISUUS

Choi K, Swierczewska M, Lee S, Chen X: Protease-activated drug development. *Theranostics* 2: 156-178, 2012

Clas S, Sanchez R, Nofsinger R: Chemistry-enabled drug delivery (prodrugs): recent progress and challenges. *Drug Discov Today* 19: 79-87, 2014

Di L: The impact of carboxylesterases in drug metabolism and pharmacokinetics. *Curr Drug Metab* 20: 91-102, 2019

Duodecim lääketietokanta. Haettu internetistä 7.10.2018. www.terveysportti.fi

Ettmayer P, Amidon GL, Clement B, Testa B: Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J Med Chem* 47: 2393-2404, 2004

Fukami T, Yokoi T: The emerging role of human esterases. *Drug Metab Pharmacokinet* 27: 466-477, 2012

Gabriele M, Puccini P, Lucchi M, Vizziello A, Gervasi PG, Longo V: Precense and inter-individual variability of carboxylesterases (CES1 and CES2) in human lung. *Biochem Pharmacol* 150: 64-71, 2018

Hatfield M, Umans R, Hyatt J ym.: Carboxylesterases: General detoxifying enzymes. *Chem Biol Interact* 259: 327-331, 2016

Hosokawa M: Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs. *Molecules* 13: 412-431, 2008

Imai T, Taketani M, Shii M, Hosokawa M, Chiba K: Substrate specificity of carboxylesterase isozymes and their contribution to hydrolase activity in human liver and small intestine. *Drug Metab Dispos* 34: 1734-1741, 2006

Imai T, Ohura K: The role of intestinal carboxylesterase in the oral absorption of prodrugs. *Curr Drug Metab* 11: 793-805, 2010

Jornada DH, dos Santos Fernandes GF ym.: The prodrug approach: A successful tool for improving drug solubility. *Molecules* 21: 42, 2015

Laizure SC, Herring V, Hu Z, Witbrodt K, Parker RB: The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance? *Pharmacotherapy* 33: 210-222, 2013

Li P, Callery PS, Gan LS, Balani SK: Esterase inhibition attribute of grapefruit juice leading to a new drug interaction. *Drug Metab Dispos* 35: 1023-1031, 2007

Mizoi K, Takahashi M, Haba M, Hosokawa M: Synthesis and evaluation of atorvastatin esters as prodrugs metabolically activated by human carboxylesterases. *Bioorg Med Chem Lett* 26: 921-923, 2016

Nyberg L, Rosenborg J, Weibull E, Jönsson S, Kennedy B, Nilsson M: Pharmacokinetics of bambuterol in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 45: 471-478, 1998

Pratt SE, Durland-Busbice S, Shepard RL, Heinz-Taheny K, Iversen PW, Dantzig AH: Human carboxylesterase-2 hydrolyzes the prodrug of gemcitabine (LY2334737) and confers prodrug sensitivity to cancer cells. *Clin Cancer Res* 19: 1159-1168, 2013

Stella VJ, Borchardt RT, Hageman MJ, Oliyai R, Maag H, Tilley JW: *Prodrugs: Challenges and Rewards Part 1 & 2*; Springer Science + Business Media: New York, 2007

Taketani M, Shii M, Ohura K, Ninomiya S, Imai T: Carboxylesterase in the liver and small intestine of experimental animals and human. *Life Sci* 81: 924-932, 2007

Tashima T: Intriguing possibilities and beneficial aspects of transporter-conscious drug design. *Bioorg Med Chem* 23: 4119-4131, 2015

Testa B, Mayer J: *Metabolic hydrolysis and prodrug design. Kirjassa: Hydrolysis in drug and prodrug metabolism: Chemistry, biochemistry and enzymology.* s. 1-9. VHCA ja WILEY-VCH, Zürich 2003a

Testa B, Mayer J: *Catalytic mechanisms of hydrolytic enzymes. Kirjassa: Hydrolysis in drug and prodrug metabolism: Chemistry, biochemistry and enzymology.* s. 47-79. VHCA ja WILEY-VCH, Zürich 2003b

Testa B, Mayer J: *Classification, localization and some physiological roles of hydrolytic enzymes. Kirjassa: Hydrolysis in drug and prodrug metabolism: Chemistry, biochemistry and enzymology.* s.11-46. VHCA ja WILEY-VCH, Zürich 2003c

Wang D, Zou L, Jin Q, Hou J, Ge G, Yang L: Human carboxylesterases: a comprehensive review. *Acta Pharm Sin B* 8: 699-712, 2018

Zawilska J, Wojcieszak J, Olejniczak A: Prodrugs: a challenge for the drug development. *Pharmacol Rep* 65: 1-14, 2013