

催化酰胺类药物水解代谢酶的研究进展

王誉晓, 王新鸿, 王丽梅, 邱志霞*

(中国药科大学药学院, 南京 211198)

摘要 酰胺键是将分子中的氨基和羧基脱水缩合形成的分子键, 其在药物结构设计中较为常见。酰胺键的稳定性受到多种因素的影响, 使得酰胺类药物的药代动力学行为呈明显的代谢异质性。本文围绕酰胺类药物的药代动力学行为, 提出水解酶在机体空间的表达和活性可能是引起酰胺类药物的药代动力学存在种属差异的重要原因之一, 并归纳常见的水解酰胺类药物的酶或蛋白, 为酰胺类药物的结构设计及临床研究提供参考; 提出体外评价体系选择不当可能是导致药物药代动力学特征出现体内-体外不一致性的重要原因, 总结目前用于评价药物体外代谢体系, 为药物临床前评价提供参考。

关键词 酰胺类药物; 药代动力学; 水解酶

中图分类号 R969.1 文献标志码 A

文章编号 1000-5048(2025)02-0244-08

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2024101203

引用本文 王誉晓, 王新鸿, 王丽梅, 等. 催化酰胺类药物水解代谢酶的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2025, 56(2): 244–251.

Cite this article as: WANG Yuxiao, WANG Xinhong, WANG Limei, *et al.* Research progress of hydrolases catalyzing amide drugs[J]. *J China Pharm Univ*, 2025, 56(2): 244–251.

Research progress of hydrolases catalyzing amide drugs

WANG Yuxiao, WANG Xinhong, WANG Limei, QIU Zhixia*

School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract Amide bond is formed by dehydration and condensation of amino and carboxyl groups in a molecule, which is used in structural design of drugs. The stability of the amide bond is affected by many factors, which make the pharmacokinetic behaviors of amide drugs complicated by metabolic heterogeneity. This review proposes that the expression and activity of hydrolase may be one of the important reasons for the obvious differences in the pharmacokinetics of amides among species, summarizes the common metabolic enzymes or proteins responsible for hydrolyzing amides so as to provide some reference for the structural design and further clinical study of amide drugs, and suggests that improper selection of *in vitro* evaluation systems may be an important cause for the inconsistency between *in vitro* and *in vivo* pharmacokinetic characteristics of drugs, with a summary of the currently used *in vitro* drug metabolism systems for drug evaluation, aiming to provide a basis for preclinical evaluation of drugs.

Key words amide drugs; pharmacokinetics; hydrolase

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.82274013)

酰胺键在药物结构设计中较为常见, 一方面其可作为比较稳定的连接键进行设计, 另一方面特定的酰胺键结构, 例如缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit), 可以在特定条件下被水解, 基于此原理, 很多小分子前体药物(prodrug)以及抗体偶联药物(antibody drug

conjugate, ADC)的设计可以呈现出更好的药动学行为或药理活性^[1-2]。与酯键类似, 酰胺键也可以发生由水解酶介导的水解反应, 表现出较为明显的代谢种属差异性^[3]; 然而, 与多数酯类药物不同的是, 酰胺类药物的水解代谢还存在明显的体内体外

收稿日期 2024-10-12 * 通信作者 Tel: 13813983364 E-mail: qiuzhixia_cpu@163.com

基金项目 国家自然科学基金项目 (No.82274013)

不一致性的现象,如药物在体外组分中呈现较好的稳定性,而在体内则发生较为明显的水解代谢反应,表现为生成大量的水解代谢物^[4]。

非戈替尼(filgotinib)是选择性 JAK-1 抑制剂,在欧洲、英国和日本被批准用于治疗类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)^[5]。临床前研究表明,filgotinib 在大鼠体内可生成酰胺键水解代谢物,该代谢物同样具有抑制 JAK1 的活性(约为原型的 10%);临床研究则发现,该活性代谢物在人体内暴露量为原型的近 15 倍,远远高于在临床前物种体内的暴露量^[6]。种属差异的存在很大程度上是药物在不同种属体内代谢差异导致的,研究表明,filgotinib 的结构中酰胺键的水解代谢,是造成该药物存在明显的种属差异的主要原因。而这种差异也给 filgotinib 的后续临床研究,尤其是药理学和毒理学研究带来更多困难。另外,filgotinib 在体外组分中的水解代谢程度较低,此研究结果与先前体内研究结果报道不一致^[4],而这种水解代谢的体内体外不一致性使得体外结果无法较好推至体内。由此看出,酰胺键水解代谢的上述异质性特征为酰胺类药物的药代动力学研究带来极大挑战。

药物在体内经过代谢产生的代谢物,具有多种活性变化特征,如活性降低或丧失,活性强于原药,甚至可能对机体有毒。肝是药物的主要代谢器官,非肝代谢部位如肠道等器官同样对药物有代谢作用^[7],这些代谢器官中含有药物 I 相代谢和 II 相代谢所需的各种代谢酶。细胞色素 P450 酶系(CYP450s)可以介导大部分药物的代谢,其次是酯酶,介导约 10% 药物的代谢,其中囊括了大部分含酯键、酰胺键、磷酸酯键、硫酯键的药物^[8-9]。酯酶主要包括羧酸酯酶(carboxylesterase, CES)、对氧磷酶(paraoxonase, PON)、胆碱酯酶(cholinesterase)和芳香乙酰胺脱乙酰基酶(aromatic acetamide deacetylase, AADAC)^[10]。近年来发现组织蛋白酶(cathepsin)、醛氧化酶(aldehyde oxidase, AO)、脂肪酰胺水解酶(fatty acid amide hydrolase, FAAH)以及一些血清蛋白例如白蛋白同样也具有一定的水解酰胺键或酯键的能力^[11-14]。不同于 CYP450s,负责水解酰胺键的代谢酶不仅存在明显的种属差异,同时也存在显著的个体差异。正是这种表达分布和活性在种属间甚至是体内外的显著差异成为引起酰胺类药物药代动力学出现上述种属差异较大、体内外不一致现象的重要原因之一。本文对可催

化酰胺键水解的常见酯酶和一些非酯酶或类酯酶进行了详细介绍,并综述了酰胺类药物的药代动力学行为异质性的可能原因,为酰胺类药物的药代动力学研究、药物发现以及临床合理用药提供参考。

1 催化酰胺水解的酶系

1.1 羧酸酯酶

羧酸酯酶(CES)可以催化水解内源性物质或外源性含酯键、酰胺键、硫酯键的药物,是机体中最常见的一种酯酶类型。目前研究发现,人体中对药物代谢最重要的两种亚型为 CES1 和 CES2。CES 主要位于细胞内质网管腔侧,也存在于细胞质中,但丰度较低,研究报道肝或肠微粒体中 CES 蛋白含量约为胞浆 10 倍以上^[15-16]。因此,常选择肝或肠微粒体而非胞浆来评价 CES 对药物的代谢情况。不同亚型的 CES 具有不同的组织分布特性,CES1 主要位于肝,在肺和脂肪细胞中也有一定的分布;而 CES2 主要位于小肠和结肠中,在肾中也有一定的表达,但在肝中表达量较低^[17]。此外,不同亚型的 CES 对药物结构的亲和力不同,CES1 倾向于水解大酰基和小醇基结构的药物,例如可卡因、氯吡格雷、奥司他韦等^[18-20];而 CES2 倾向于水解小酰基和大醇基结构的药物,如普鲁卡因、伊立替康(CPT-11)等^[21],水解特性与 CES1 恰好相反。同时,CES 具有明显的种属差异,在小鼠、大鼠等物种的血液中可以检测到相当高的活性水平,但在人类血液中丰度极低甚至无法检测到,CES 在啮齿类动物中具有更高的活性及底物特异性^[22]。

在新药开发阶段,若体外研究发现酰胺类药物可明显被 CES 水解代谢,药物的药代动力学可能具有较强的种属差异,具体体现在该类物质可能在临床前物种如大鼠体内代谢速度更快,代谢程度更高;药物进入临床阶段后,在人体中的水解代谢程度可能较临床前动物低。赛乐西帕(selexipag)是一种用于长期治疗肺动脉高压的前药,其酰胺键结构在体内由 CES 水解,生成代谢物 MRE-269 的活性为原型的 37 倍。Selexipag 在大鼠血浆或微粒体中其代谢程度高于猴,同样在大鼠体内代谢物暴露量高于猴;进入临床研究后,其在人体内的暴露量低于临床前物种,研究发现,该种属差异一定程度是 CES 的种属差异导致的^[23-25]。因此,对于前药来说,从临床前阶段至临床阶段,可能发生临床阶段原药

释放程度低于临床前阶段的现象。而对于其他药物,水解代谢产物可能有药理活性或毒性,当进入临床阶段,可能药物水解代谢程度更低,代谢产物更少,药物的药动学特性更符合预期。

1.2 芳香乙酰胺脱乙酰基酶

芳香乙酰胺脱乙酰基酶(AADAC)是近几年发现位于细胞内质网管腔侧可以水解酰胺键的酯酶^[15],该家族包括AADAC和AADAC样蛋白(AADACL1~4),除了通常称为KIAA1363的AADACL1,剩余AADACL2~4都鲜有研究报道^[26]。由于AADAC与CES同属于丝氨酸水解酶家族,AADAC的底物与CES的底物有一定的交叉性,例如氟他胺是AADAC的底物,同时也可以被CES2水解^[27];对硝基苯酚乙酸酯(PNPA)可以被CES和AADAC共同水解^[28]。同样的,AADAC与CES的抑制剂也有一定的交叉,其具体底物以及抑制剂总结见表1,洋地黄皂苷是CES1的特异性抑制剂,地尔硫革和维拉帕米是CES2的特异性抑制剂,目前并未找到可以特异性抑制AADAC活性的物质^[29]。AADAC不仅可以水解中性脂类物质,比如甘油二酯,同时也倾向于水解含乙酰基的外源性药物,如非那西汀、利福霉素^[30-32]。然而,AADAC有较强的底物特异性,如非那西汀和对乙酰氨基酚,两者结构中均有乙酰胺结构,但由于苯环对位取代基不同,AADAC更倾向于水解非那西汀,基本不水解对乙酰氨基酚^[30]。AADAC表达于肝、肠、肾等器官,且是一种具有明显种属差异的水解酶,其在大鼠体内表达水平低于人类^[33];此外,CES和AADAC均可以在肠道中表达,而犬肠道中无CES2,但有AADAC表达^[34],当药物同时被CES2和AADAC水解代谢时,犬作为临床前物种所得到的数据外推得到的临床数据可能会存在一定的偏差。

1.3 丁酰胆碱酯酶

胆碱酯酶(cholinesterase)在组织、血浆、体液中均有分布,主要包括乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)和丁酰胆碱酯酶(butyrylcholinesterase, BChE)。AChE主要位于神经突触上,可以水解乙酰胆碱,终止胆碱能突触的脉冲传递。BChE在肝脏中合成,分泌到血浆中^[35],另外,其在肠道细胞中也有一定的分布,不仅可以水解乙酰胆碱、苯丙酰胆碱、琥珀酰胆碱等内源性物质,还可以水解阿司匹林、乙酰苯胺等外源性异物等,目前

对其种属差异研究较少^[36]。近些年有研究表明,BChE可以水解脂质物质,例如4-甲基伞形叶酯棕榈酸酯;但与脂肪水解酶不同,BChE对脂质的水解速率更快,再加之BChE在肠道中的分布情况,提示BChE可能在肠道中的脂质利用或摄取中发挥作用^[37]。贝那替嗪、苯丙胺是BChE的竞争性抑制剂^[38],他汀类药物为BChE的非竞争性抑制剂,其中瑞舒伐他汀和阿托伐他汀的抑制作用最强^[39]。

1.4 组织蛋白酶

组织蛋白酶(cathepsin)位于细胞溶酶体中,在弱酸性条件下发挥水解作用,不仅可以降解蛋白,还可以水解前体蛋白从而发挥活性^[40]。蛋白酶按照作用位点的不同可以分为两大类:内切蛋白酶(endopeptidases)和外切蛋白酶(exopeptidases),其中外切蛋白酶又可分为氨肽酶和羧肽酶。组织蛋白酶有很多亚型,其中组织蛋白酶B、F、H、K、L、S、V可以作为内肽酶水解蛋白;外肽酶中的氨肽酶包含组织蛋白酶C和H,羧肽酶包含组织蛋白酶B和X^[41]。其中,组织蛋白酶B既是内肽酶,也是羧肽酶,故应用范围更广。组织蛋白酶B在肿瘤细胞中浓度可以达到1 mmol/L^[42],其水解酶活性已被应用于特定肿瘤的活性药物领域。如有些ADC的设计就是利用这一特点,在ADC结构中引入可被组织蛋白酶B水解的基团,如缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit),其可被在肿瘤中高度表达的组织蛋白酶B快速切割,释放药物,进而发挥疗效^[11]。例如,AGCM-22是一种将西妥昔单抗通过组织蛋白酶B依赖性缬氨酸-丙氨酸(Val-Ala, VA)二肽型连接子与微管蛋白抑制剂缀合形成的ADC,旨在提高靶向胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)的能力^[43];紫杉醇前药偶联物(paclitaxel prodrug conjugate, PGD)是由紫杉醇通过组织蛋白酶B可裂解的四肽(Gly-Phe-Leu-Gly)与亲水性聚(酰胺二胺)树枝状聚合物缀合形成,比紫杉醇单独用药表现出更好的抗肿瘤活性^[44]。

1.5 醛氧化酶

醛氧化酶(AO)是一种位于细胞质中的代谢酶,可以代谢N-杂环化合物等,在体内有着较高的组织分布,在肝、肾、肺等部位均有较高的表达水平^[45]。AO在体内可以氧化还原内源性或外源性物质,近些年有研究表明,AO还有其他的代谢活性,可水解某些含酰胺键的化合物。

GDC-0834是一种强效、选择性强、可逆的

ATP 竞争性小分子抑制剂, 临床用于治疗类风湿关节炎。GDC-0834 结构中含有一个酰胺键, 在临床前研究发现该酰胺键可以水解代谢生成代谢物 M1, 但水解生成量较少; 但在临床研究发现中代谢物 M1 在人体中有更高的暴露量, 这一发现提示 GDC-0834 的代谢具有明显的种属差异, 但又与普通的 CES 所代谢药物的药代动力学特性相反。目前研究发现, AO 对 GDC-0834 有明显的水解代谢活性。使用 AO 抑制剂雷洛昔芬(raloxifene)、甲萘醌(menadione)、和 β -雌二醇(β -estradiol), 发现可以抑制 GDC-0834 的酰胺键代谢物 M1 的生成。同时该研究发现 GDC-0834 对 AO 底物卡巴折伦(carbazeran), O^6 -苄基鸟嘌呤(O^6 -benzylguanine)的代谢产生抑制, 进一步印证 GDC-0834 可能与 AO 活性位点存在相互作用。由于 GDC-0834 结构与 CES 所代谢的底物特征一致, 故研究并不排除 CES 对 GDC-0834 的酰胺水解代谢^[12]。美托哌丙嗪结构中有末端酰胺键, 在体内会生成含末端羧基的代谢物, 且在人体中的生成量远远高于临床前物种, 相关研究使用了 CYP450s 重组酶以及相应的抑制剂进行研究, 发现 CYP450s 可能并未介导美托哌丙嗪的酰胺键代谢。研究进一步使用酰胺水解酶抑制剂将该代谢定位于肝中的酰胺水解酶的作用, 并使用 AO 抑制剂甲萘醌进行研究, 最终得出结论: 胞浆中的 AO 可能催化美托哌丙嗪结构中酰胺键水解代谢^[46]。

由此可见, AO 除了在体内可作为氧化还原酶发挥代谢作用, 还可作为水解酶对某些药物如酰胺类药物进行水解代谢。AO 对酰胺键的水解作用, 存在较大的种属差异, 尤其表现在临床研究中的人体代谢程度更高。对于此类药物, 临床前物种的药代动力学特征无法较好预测药物在人体内的代谢程度。*N*-[2-(dimethylamino)-ethyl]-acridine-4-carboxamide (DACA) 是一种抗癌药物, 研究发现其可被醛氧化酶水解代谢。由于醛氧化酶具有明显的种属差异, 研究使用大鼠、猪等物种都无法较好预测人体内的药代动力学行为^[47]。因此, 新药开发前期对药物结构进行设计时, 可以避免醛氧化酶的水解代谢, 从而降低药物在研发后期临床阶段面临的种属外放问题。

1.6 脂肪酰胺水解酶

脂肪酰胺水解酶(FAAH)是一种膜相关蛋白, 位于肠道内质网、线粒体内膜, 且具有水解酶活

性。FAAH 不仅能催化内源性大麻素、*N*-花生四烯酰乙醇酰胺和 2-花生四烯酸甘油(2-AG)的水解, 而且还能催化水解棕榈酰乙醇酰胺(PEA), 油酰胺(一种睡眠诱导因子)和油酰乙醇酰胺^[13]。内源性大麻素是一种由膜磷脂前体按需释放的脂质介质, 作用于大麻素受体 CB1 和 CB2, 这一系统涉及广泛的生理过程^[48], 如代谢紊乱等。抑制 FAAH 的水解能力可以增加内源性大麻素的浓度, 进而影响相关生理和病理过程^[49]。

1.7 血清白蛋白

人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)是血浆中含量最多的蛋白质, 其功能包括药物的转运、结合、分布和代谢^[50]。近年来研究发现, HSA 和 α -酸性糖蛋白(AGP)具有酯酶样活性, 可以水解血浆中的酯类和含酰胺键药物, 从而影响药物的药代动力学行为^[51-52]。Withangulatin A (WA) 结构含有两个酯键, 口服生物利用度较低。从水解代谢的角度来看, WA 中的酯键具有被水解的倾向, 当使用酯酶特异性抑制剂进行研究时, 发现其代谢不受抑制剂影响。本课题组最新研究发现血清白蛋白可显著水解血浆中的 WA。通过非线性代谢动力学研究发现, WA 在 HSA 中与在人血浆中的代谢清除率相近, 同时尝试通过使用分子对接技术^[14], WA 能与 Sudlow 位点 I 的 Lys199、Sudlow 位点 II 的 Arg-410 和 Tyr-411 等氨基酸残基形成氢键, 而 WA 与 CES 位点的相互作用较低, 几乎不能与 CES 的氨基酸残基形成氢键^[53]。所以当 WA 进入到血液中, 优先被 HSA 竞争水解代谢。HSA 的类酯酶活性不仅水解酯键药物, 如阿司匹林、乙酸萘酯, 同时可以水解酰胺类药物硝基乙酰苯胺、环磷酸胺以及有机磷化合物等^[51]。HSA 的类酯酶活性一定程度上会改变药物的药代动力学行为, 导致药物半衰期缩短, 生物利用度降低。基于 HSA 设计前药或药物递送系统, 可以改变药物药代动力学特征, 提高药物疗效。

2 酰胺类药物药动学行为探究存在的问题

含酰胺药物的种属差异原因可以通过代谢酶表达和活性在种属间的差异性进行解释, 而体内体外不一致性的问题更聚焦于体外体系的选择与评价。

2.1 肝脏体外代谢评价体系

体外评价药物代谢常使用微粒体组分, 例如使用肝微粒体评价药物在肝脏内的代谢, 而使用微粒体评价药物体外代谢具有一定的局限性。首

表 1 催化酰胺水解酶系总结

酶	表达部位	底物	抑制剂	参考文献
CES1	肝、肺、脂肪	4-硝基苯乙酸酯, 对硝基苯酚乙酸酯(PNPA), D-荧光素甲酯, 哌醋甲酯(MPH), 利多卡因, 可卡因, 氯吡格雷, 奥司他韦, 咪达普利	双-(4-硝基苯基)磷酸(BNPP), 苯基甲基磺酰氟化物(PMSF), 洋地黄皂苷, 辛伐他汀, 阿立哌唑, 奋乃静, 硫利达嗪, 氟西汀, 替米沙坦	[10, 15, 19–21, 29, 70–72]
CES2	小肠、肾、肝	4-硝基苯乙酸酯, PNPA, 荧光素双醋酸, 伊立替康, 普鲁卡因, 氟他胺	BNPP, PMSF, 地尔硫革, 维拉帕米, 辛伐他汀, 替米沙坦, 毒扁豆碱, 长春碱	[10, 15, 21, 29, 70, 73]
AADAC	肠道、肝、肾	4-硝基苯乙酸酯, PNPA, 非那西汀, 利福霉素, 氟他胺, 酮康唑, 茚地普隆	BNPP, PMSF, 长春碱, 替米沙坦, 毒扁豆碱	[10, 15, 27, 31, 70, 73]
BChE	肝、血液、肠道	可卡因, 班布特罗, 伊立替康, 美维库铵, 琥珀酰胆碱	毒扁豆碱, 四异丙基焦磷酸亚胺(iso-OMPA), 他克林, 贝那替嗪, 苯丙胺, 他汀类药物	[10, 74]
Cathepsin B	组织	— ^a	氟甲基酮, 洛昔他汀, 氮嘧啶肽, 寡核苷酸	[75]
AO	肝、肾、肺	卡巴折伦, O ⁶ -苄基鸟嘌呤, 酞嗪, 扎来普隆	雷洛昔芬, 甲萘醌, β -雌二醇	[12]
FAAH	肠道	内源性大麻素, N-花生四烯酰乙醇酰胺, 2-花生四烯酸甘油(2-AG), 棕榈酰乙醇酰胺(PEA), 油酰胺, 油酰乙醇酰胺	— ^b	[13]
血浆蛋白	血浆	环磷酰胺, 烟酸酯, 硝基乙酰苯胺, α/β -萘乙酸酯, 地西洋, 棕榈酸阿司匹林, 酮洛芬葡萄糖醛酸酯		[51]

CES1: 羧酸酯酶1; CES2: 羧酸酯酶2; AADAC: 芳香乙酰胺脱乙酰基酶; BChE: 丁酰胆碱酯酶; Cathepsin B: 组织蛋白酶B; AO: 醛氧化酶; FAAH: 脂肪酰胺水解酶; —^a: 底物常以特定酰胺键(肽键)结构显示; —^b: 目前暂未发现抑制剂药物

先, 制备过程中, 通过差速离心得到的微粒体中主要含有位于内质网上的酶, 如 CYP450s、酯酶等, 微粒体组分中包含了大部分代谢酶, 却也缺少了位于细胞质中的代谢酶, 例如 AO^[54–55]。使用 S9 或胞浆等组分可以弥补微粒体中部分酶的缺失; 另外, 低温制备过程也不可避免会造成一部分酶含量减少或活性降低^[56–57]。因此, 体外组分中酶的缺失或活性降低势必会影响对药物体外代谢评价的可靠性。

针对微粒体等体外组分所存在的缺点, 近些年有研究通过使用肝细胞进行体外代谢相关研究。当使用 3D 培养技术培养增殖性人肝细胞, 可以恢复其成熟的肝脏功能, 有效评估药物的肝脏特性, 甚至实现转运蛋白介导的药物摄取等^[58–59]。原代肝细胞的使用, 丰富了临床前的体外评价体系, 但肝细胞制备技术及培养条件较复杂, 在应用范围上不及微粒体。类器官技术使用成体干细胞或多功能干细胞进行体外诱导发育, 形成微型器官, 这种类器官技术保留了细胞间的接触, 可以模拟肝脏发育以及肝脏疾病的发生, 进行个性化药物筛选, 推动临床研究及新药研发^[60–61]。此外, 肝脏的体外研究还有离体肝灌注法、肝切片法, 但对实验设备和操作技术要求较高, 限制了其应用^[62–64]。

2.2 肠道体外代谢评价体系

目前, 通常使用微粒体进行药物的肠道代谢

研究, 而微粒体主要从肠黏膜上皮细胞中制备得到, 这种体外研究体系往往存在代谢酶系“过于简单”的问题。组织切片基本包含了肠道中大部分代谢酶, 而组织切片价格高昂且不易获得, 所以应用范围有一定的限制^[65]。Caco-2 细胞模型常作为研究肠道吸收转运的细胞模型, Caco-2 单细胞层在形态学和生物学上与肠黏膜上皮细胞相似, 但该细胞模型对于药物体外代谢方面的评价有一定的局限。肠黏膜上皮细胞中主要表达 CES2 和 AADAC, CES1 的表达程度很低, 而 Caco-2 细胞中 CES1 高表达, 当使用 Caco-2 细胞评价酯类、酰胺类药物的体外代谢时, 得到的数据是不准确的。原代肠细胞是通过使用胶原酶消化肠黏膜所分离得到的肠细胞, 其具有较多种类的代谢酶, 但原代肠细胞制备产量低, 存活时间有限, 代谢酶活性比肠黏膜更低, 同时限制了原代肠细胞的应用^[17, 28, 66–67]。目前有研究建立冷冻肠黏膜系统, 用于评估药物在肠内药物特性, 包括药物代谢、药物-药物相互作用和药物毒性等, 实现了肠道体外代谢模型的扩充^[67–68]。也有相关研究利用干细胞的再生能力, 建立肠道类器官的 3D 类器官结构, 可以模仿真实肠道器官的特征, 并进行高通量筛选药物、药物疗效测试以及毒理学评价等^[69]。

目前药物在肝肠体外研究体系或方法总结归纳, 见表 2。

表 2 肝肠体外研究体系或方法汇总

代谢部位	研究体系或方法	优 势	局 限	参考文献
肝脏	肝微粒体、胞浆、S9	制备容易, 操作简单	体系酶缺失, 与体内代谢相差较大	[54–56]
	肝细胞	一定程度保留肝脏功能	制备技术及培养条件复杂	[58–59]
	类器官技术	模拟肝脏发育以及肝脏疾病的发生	培育周期较长, 可重复性、均一性较低	[60–61]
	离体肝灌注法	具有肝脏正常生理活性和生化功能, 排除其他器官干扰	技术和设备要求较高	[62–63]
	肝切片法	保留器官的组织结构和细胞结构, 更好反应药物在体内的代谢		[64]
肠道	肠微粒体、胞浆、S9	制备较容易, 操作简单	代谢酶类少, 易失活, 研究结果与体内代谢相差较大	[65]
	肠细胞	基本保留了肠黏膜上皮细胞中代谢酶的活性	制备产量低, 存活时间有限, 代谢酶活性比肠黏膜低	[17, 28, 66–67]
	类器官技术	模仿真实肠道器官的特征	培育周期较长, 可重复性、均一性较低	[68]
	冷冻肠黏膜系统	保留肠黏膜上皮细胞及黏膜的代谢酶	制备技术复杂	[67–68]
	肠切片法	保留器官的组织结构和细胞结构, 更好反应药物在体内的代谢	技术和设备要求较高	[65]

3 结语与展望

酰胺水解代谢存在明显的种属差异性和体外-体内不一致性, 目前针对其代谢机制的研究相对较少, 这为含酰胺药物的药动学和药效学关联研究带来了一定的挑战。研究表明, 酰胺水解酶在表达和活性上的异质性是酰胺类药物存在种属差异以及体内体外不一致性的重要原因。对于种属差异大的问题, PBPK 模型的应用以及慎重选择临床前研究物种可提升该类药物的药动学研究的可靠性。对于水解代谢的体内-体外不一致性的问题, 可以选择单一或综合的体外代谢体系进行研究, 进而将体外数据推至体内, 预测该类药物在人体内的药代动力学行为。

References

[1] Husain A, Monga J, Narwal S, *et al.* Prodrug rewards in medicinal chemistry: an advance and challenges approach for drug designing[J]. *Chem Biodivers*, 2023, **20**(11): e202301169.

[2] Mckertish CM, Kayser V. A novel dual-payload ADC for the treatment of HER2+ breast and colon cancer[J]. *Pharmaceutics*, 2023, **15**(8): 2020.

[3] Ichikawa T, Yamada T, Treiber A, *et al.* Cross-species comparison of the metabolism and excretion of selexipag[J]. *Xenobiotica*, 2019, **49**(3): 284-301.

[4] Zhuang Y, Sun QS, Jing T, *et al.* Contributions of intestine and liver to the absorption and disposition of FZJ-003, a selective JAK1 inhibitor with structure modification of filgotinib[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2022, **175**: 106211.

[5] Namour F, Anderson K, Nelson C, *et al.* Filgotinib: a clinical

pharmacology review[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2022, **61**(6): 819-832.

[6] Meng A, Anderson K, Nelson C, *et al.* Exposure-response relationships for the efficacy and safety of filgotinib and its metabolite GS-829845 in subjects with rheumatoid arthritis based on phase 2 and phase 3 studies[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2022, **88**(7): 3211-3221.

[7] Tilg H, Adolph TE, Trauner M. Gut-liver axis: Pathophysiological concepts and clinical implications[J]. *Cell Metab*, 2022, **34**(11): 1700-1718.

[8] Basit A, Neradugomma NK, Wolford C, *et al.* Characterization of differential tissue abundance of major non-CYP enzymes in human[J]. *Mol Pharm*, 2020, **17**(11): 4114-4124.

[9] Song YR, Li CX, Liu GZ, *et al.* Drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes have multifarious influences on treatment outcomes[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2021, **60**(5): 585-601.

[10] Fukami T, Yokoi T. The emerging role of human esterases[J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2012, **27**(5): 466-477.

[11] Fan PW, Zhang DL, Halladay JS, *et al.* Going beyond common drug metabolizing enzymes: case studies of biotransformation involving aldehyde oxidase, γ -glutamyl transpeptidase, cathepsin B, flavin-containing monooxygenase, and ADP-ribosyltransferase[J]. *Drug Metab Dispos*, 2016, **44**(8): 1253-1261.

[12] Sodhi JK, Wong S, Kirkpatrick DS, *et al.* A novel reaction mediated by human aldehyde oxidase: amide hydrolysis of GDC-0834[J]. *Drug Metab Dispos*, 2015, **43**(6): 908-915.

[13] Capasso R, Matias I, Lutz B, *et al.* Fatty acid amide hydrolase controls mouse intestinal motility *in vivo*[J]. *Gastroenterology*, 2005, **129**(3): 941-951.

[14] Zhuang Y, Wang YX, Li N, *et al.* Hydrolytic metabolism of withangulatin A mediated by serum albumin instead of common esterases in plasma[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2023, **48**(4): 363-376.

[15] Shimizu M, Fukami T, Nakajima M, *et al.* Screening of specific

- inhibitors for human carboxylesterases or arylacetamide deacetylase[J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, **42**(7): 1103-1109.
- [16] Sato Y, Miyashita A, Iwatsubo T, *et al.* Simultaneous absolute protein quantification of carboxylesterases 1 and 2 in human liver tissue fractions using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Drug Metab Dispos*, 2012, **40**(7): 1389-1396.
- [17] Imai T. Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design[J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2006, **21**(3): 173-185.
- [18] Xu J, Qiu JC, Ji X, *et al.* Potential pharmacokinetic herb-drug interactions: have we overlooked the importance of human carboxylesterases 1 and 2?[J]. *Curr Drug Metab*, 2019, **20**(2): 130-137.
- [19] Yan MC, Zhang Z, Liu ZM, *et al.* Catalytic hydrolysis mechanism of cocaine by human carboxylesterase 1: an orthoester intermediate slows down the reaction[J]. *Molecules*, 2019, **24**(22): 4057.
- [20] Wang YQ, Shang XF, Wang L, *et al.* Interspecies variation of clopidogrel hydrolysis in liver microsomes from various mammals[J]. *Chem Biol Interact*, 2020, **315**: 108871.
- [21] Kisui F, Fukami T, Nakano M, *et al.* Strain and sex differences in drug hydrolase activities in rodent livers[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2020, **142**: 105143.
- [22] Di L. The impact of carboxylesterases in drug metabolism and pharmacokinetics[J]. *Curr Drug Metab*, 2019, **20**(2): 91-102.
- [23] Sitbon O, Channick R, Chin KM, *et al.* Selexipag for the treatment of pulmonary arterial hypertension[J]. *N Engl J Med*, 2015, **373**(26): 2522-2533.
- [24] Klose H, Chin KM, Ewert R, *et al.* Temporarily switching from oral to intravenous selexipag in patients with pulmonary arterial hypertension: safety, tolerability, and pharmacokinetic results from an open-label, phase III study[J]. *Respir Res*, 2021, **22**(1): 34.
- [25] Ichikawa T, Yamada T, Treiber A, *et al.* Pharmacokinetics of the selective prostacyclin receptor agonist selexipag in rats, dogs and monkeys[J]. *Xenobiotica*, 2018, **48**(2): 186-196.
- [26] Wagner C, Hois V, Taschler U, *et al.* KIAA1363-a multifunctional enzyme in xenobiotic detoxification and lipid ester hydrolysis[J]. *Metabolites*, 2022, **12**(6): 516.
- [27] Honda S, Fukami T, Tsujiguchi T, *et al.* Hydrolase activities of *Cynomolgus* monkey liver microsomes and recombinant CES1, CES2, and AADAC[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2021, **161**: 105807.
- [28] Kobayashi Y, Fukami T, Shimizu M, *et al.* Contributions of arylacetamide deacetylase and carboxylesterase 2 to flutamide hydrolysis in human liver[J]. *Drug Metab Dispos*, 2012, **40**(6): 1080-1084.
- [29] Hammid A, Fallon JK, Lassila T, *et al.* Activity and expression of carboxylesterases and arylacetamide deacetylase in human ocular tissues[J]. *Drug Metab Dispos*, 2022, **50**(12): 1483-1492.
- [30] Watanabe A, Fukami T, Takahashi S, *et al.* Arylacetamide deacetylase is a determinant enzyme for the difference in hydrolase activities of phenacetin and acetaminophen[J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, **38**(9): 1532-1537.
- [31] Honda S, Fukami T, Hirokawa K, *et al.* Differences in hydrolase activities in the liver and small intestine between marmosets and humans[J]. *Drug Metab Dispos*, 2021, **49**(9): 718-728.
- [32] Sun RQ, Lin ZF, Wang XY, *et al.* Correction: AADAC protects colorectal cancer liver colonization from ferroptosis through SLC7A11-dependent inhibition of lipid peroxidation[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, **41**(1): 313.
- [33] Kobayashi Y, Fukami T, Nakajima A, *et al.* Species differences in tissue distribution and enzyme activities of arylacetamide deacetylase in human, rat, and mouse[J]. *Drug Metab Dispos*, 2012, **40**(4): 671-679.
- [34] Kurokawa T, Fukami T, Yoshida T, *et al.* Arylacetamide deacetylase is responsible for activation of prasugrel in human and dog[J]. *Drug Metab Dispos*, 2016, **44**(3): 409-416.
- [35] Mahomoodally F, Abdallah HH, Suroowan S, *et al.* *In silico* exploration of bioactive phytochemicals against neurodegenerative diseases via inhibition of cholinesterases[J]. *Curr Pharm Des*, 2020, **26**(33): 4151-4162.
- [36] Silman I. The multiple biological roles of the cholinesterases[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2021, **162**: 41-56.
- [37] Gok M, Cicek C, Sari S, *et al.* Novel activity of human BChE: lipid hydrolysis[J]. *Biochimie*, 2023, **204**: 127-135.
- [38] Bodur E, Cokuğraş AN, Tezcan EF. Inhibition effects of benactyzine and drofenine on human serum butyrylcholinesterase[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2001, **386**(1): 25-29.
- [39] Atay MS, Sari S, Bodur E. Molecular and computational analysis identify statins as selective inhibitors of human butyrylcholinesterase[J]. *Protein J*, 2023, **42**(2): 104-111.
- [40] Cao MD, Luo XY, Wu KM, *et al.* Targeting lysosomes in human disease: from basic research to clinical applications[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, **6**(1): 379.
- [41] Stoka V, Vasiljeva O, Nakanishi H, *et al.* The role of cysteine protease cathepsins B, H, C, and X/Z in neurodegenerative diseases and cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, **24**(21): 15613.
- [42] Mohamed MM, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6**(10): 764-775.
- [43] Li DP, Sun XY, Li YQ, *et al.* AGCM-22, a novel cetuximab-based EGFR-targeting antibody-drug-conjugate with highly selective anti-glioblastoma efficacy[J]. *Bioorg Med Chem*, 2024, **102**: 117657.
- [44] Satsangi A, Roy SS, Satsangi RK, *et al.* Design of a paclitaxel prodrug conjugate for active targeting of an enzyme upregulated in breast cancer cells[J]. *Mol Pharm*, 2014, **11**(6): 1906-1918.
- [45] Kozminski KD, Selimkhanov J, Heyward S, *et al.* Contribution of extrahepatic aldehyde oxidase activity to human clearance[J]. *Drug Metab Dispos*, 2021, **49**(9): 743-749.
- [46] Busby RW, Cai XK, Yang S, *et al.* Metopimazine is primarily

- metabolized by a liver amidase in humans[J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2022, **10**(1): e00903.
- [47] Schofield PC, Robertson IG, Paxton JW. Inter-species variation in the metabolism and inhibition of *N*-[(2'-dimethylamino)ethyl] acridine-4-carboxamide (DACA) by aldehyde oxidase[J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, **59**(2): 161-165.
- [48] Pertwee RG. Elevating endocannabinoid levels: pharmacological strategies and potential therapeutic applications[J]. *Proc Nutr Soc*, 2014, **73**(1): 96-105.
- [49] van Egmond N, Straub VM, van der Stelt M. Targeting endocannabinoid signaling: FAAH and MAG lipase inhibitors[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2021, **61**: 441-463.
- [50] Rabbani G, Ahn SN. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: a natural cargo[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, **123**: 979-990.
- [51] De Simone G, di Masi A, Ascenzi P. Serum albumin: a multi-faced enzyme[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(18): 10086.
- [52] Kono K, Fukuchi Y, Okawa H, *et al.* Unique hydrolysis of an ester-type prodrug of levodopa in human plasma: relay-type role sharing between alpha-1 acid glycoprotein and human serum albumin[J]. *Mol Pharm*, 2019, **16**(10): 4131-4138.
- [53] Watanabe H, Tanase S, Nakajou K, *et al.* Role of arg-410 and Tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity[J]. *Biochem J*, 2000, **349**(Pt 3): 813-819.
- [54] Sun L, Mi K, Hou YX, *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic drug-drug interactions: research methods and applications[J]. *Metabolites*, 2023, **13**(8): 897.
- [55] Tsugoshi Y, Watanabe Y, Tanikawa Y, *et al.* Inhibitory effects of organophosphate esters on carboxylesterase activity of rat liver microsomes[J]. *Chem Biol Interact*, 2020, **327**: 109148.
- [56] Khidkhan K, Poapolathep S, Kulprasertsri S, *et al.* Comparative *in vitro* biotransformation of fipronil in domestic poultry using liver microsome[J]. *J Vet Sci*, 2022, **23**(6): e82.
- [57] Wang XW, He B, Shi J, *et al.* Comparative proteomics analysis of human liver microsomes and S9 fractions[J]. *Drug Metab Dispos*, 2020, **48**(1): 31-40.
- [58] Qiao SD, Feng SS, Wu ZT, *et al.* Functional proliferating human hepatocytes: *in vitro* hepatocyte model for drug metabolism, excretion, and toxicity[J]. *Drug Metab Dispos*, 2021, **49**(4): 305-313.
- [59] Wang HB, Brown PC, Chow EY, *et al.* 3D cell culture models: drug pharmacokinetics, safety assessment, and regulatory consideration[J]. *Clin Transl Sci*, 2021, **14**(5): 1659-1680.
- [60] Marsee A, Roos FJM, Verstegen MMA, *et al.* Building consensus on definition and nomenclature of hepatic, pancreatic, and biliary organoids[J]. *Cell Stem Cell*, 2021, **28**(5): 816-832.
- [61] Heydari Z, Moeinvaziri F, Agarwal T, *et al.* Organoids: a novel modality in disease modeling[J]. *Biores Manuf*, 2021, **4**(4): 689-716.
- [62] Miller CO, Cao J. Probing hepatic glucose metabolism via ¹³C NMR spectroscopy in perfused livers-applications to drug development[J]. *Metabolites*, 2021, **11**(11): 712.
- [63] Blondeel J, Gilbo N, Wylin T, *et al.* Porcine normothermic isolated liver perfusion[J]. *J Vis Exp*, 2023(196): (196).
- [64] Czuba LC, Wu X, Huang WZ, *et al.* Altered vitamin A metabolism in human liver slices corresponds to fibrogenesis[J]. *Clin Transl Sci*, 2021, **14**(3): 976-989.
- [65] Davies M, Peramuhendige P, King L, *et al.* Evaluation of *in vitro* models for assessment of human intestinal metabolism in drug discovery[J]. *Drug Metab Dispos*, 2020, **48**(11): 1169-1182.
- [66] Chen X, Yu FJ, Guo XL, *et al.* Clock gene Bmal1 controls diurnal rhythms in expression and activity of intestinal carboxylesterase 1[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021, **73**(1): 52-59.
- [67] Li AP. *In vitro* human cell-based experimental models for the evaluation of enteric metabolism and drug interaction potential of drugs and natural products[J]. *Drug Metab Dispos*, 2020, **48**(10): 980-992.
- [68] Li AP, Alam N, Amaral K, *et al.* Cryopreserved human intestinal mucosal epithelium: a novel *in vitro* experimental system for the evaluation of enteric drug metabolism, cytochrome P450 induction, and enterotoxicity[J]. *Drug Metab Dispos*, 2018, **46**(11): 1562-1571.
- [69] Tian CM, Yang MF, Xu HM, *et al.* Stem cell-derived intestinal organoids: a novel modality for IBD[J]. *Cell Death Discov*, 2023, **9**(1): 255.
- [70] Cavallero A, Puccini P, Aprile V, *et al.* Presence, enzymatic activity, and subcellular localization of paraoxonases 1, 2, and 3 in human lung tissues[J]. *Life Sci*, 2022, **311**(Pt A): 121147.
- [71] Liu SB, Wang ZT, Tian X, *et al.* Predicting the effects of CYP2C19 and carboxylesterases on vicagrel, a novel P2Y₁₂ antagonist, by physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling approach[J]. *Front Pharmacol*, 2020, **11**: 591854.
- [72] Parker RB, Casey Laizure S. The effect of ethanol on oral cocaine pharmacokinetics reveals an unrecognized class of ethanol-mediated drug interactions[J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, **38**(2): 317-322.
- [73] Zhu T, Wu Y, Li XM, *et al.* Vicagrel is hydrolyzed by Raf kinase inhibitor protein in human intestine[J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2022, **43**(6): 247-254.
- [74] Xu AN, He F, Zhang XN, *et al.* Tacrine-hydroxamate derivatives as multitarget-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease: design, synthesis, and biological evaluation[J]. *Bioorg Chem*, 2020, **98**: 103721.
- [75] Mijanović O, Branković A, Panin AN, *et al.* Cathepsin B: a sell-sword of cancer progression[J]. *Cancer Lett*, 2019, **449**: 207-214.