

# Malaria



Et kapløb med tiden



# Millioner af menneskeliv på spil

I romanen "Den Lykkelige Kristoffer" af Martin A. Hansen får hovedpersonen feberanfald.

"... Næste dag måtte han blive i sengen med sin koldesygge (...) Anfaldene kom igen hver tredje dag til hen mod majdag (...) Drengen skjalv af kulde, blå i hovedet særlig om næsen. Øjnene rystede til bunds. Skønt klerken gav ham stærke droger i hed drik, trak de kolde ture ud til over middag."

Handlingen udspiller sig i 1600-tallets Danmark. Koldesygge og koldfeber er begge gamle danske betegnelser for den sygdom, der i dag benævnes malaria. Martin A. Hansens fortælling tager udgangspunkt i det historiske faktum, at malaria var udbredt i store dele af Danmark i 1600-tallet. Helt frem til begyndelsen af 1900-tallet var malaria et problem på Lolland og Falster.

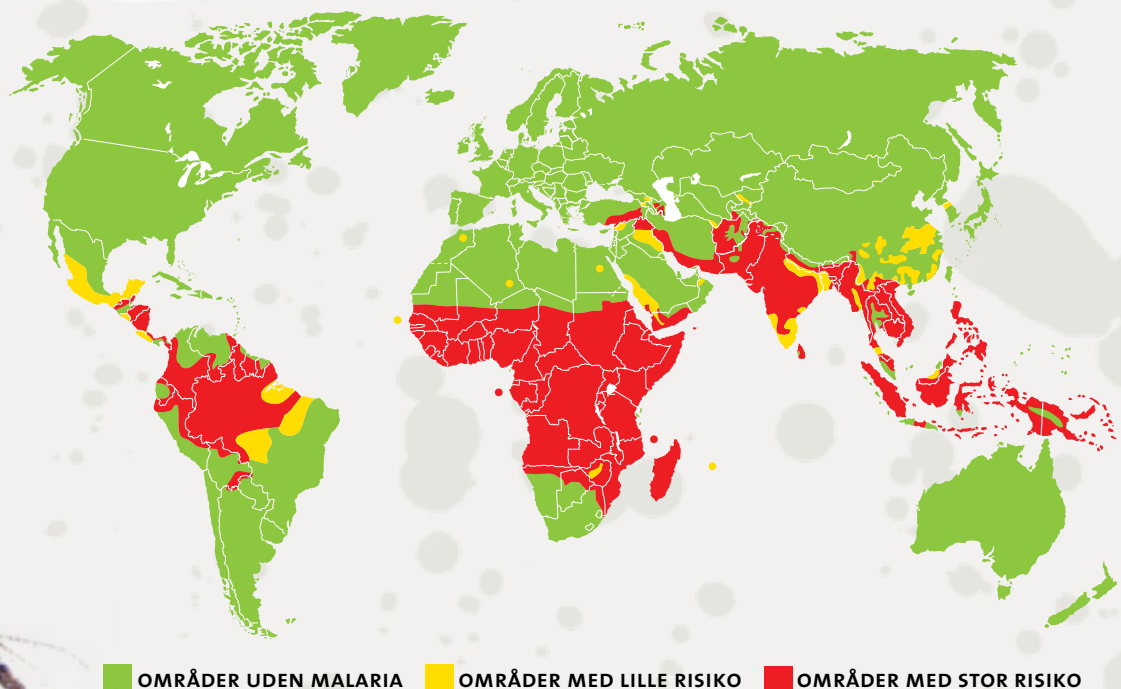
I dag er malaria udryddet i hele Europa, Nordamerika og i Japan, og der er ingen fare for at få malaria herhjemme. De få alvorlige tilfælde, der årligt registreres i Danmark, skyldes smitte ved rejser og ophold i den tropiske verden, hvor sygdommen stadig er et stort

sundhedsmæssigt og samfundsmæssigt problem. Malaria er en af de tre infektionssygdomme, der dræber flest mennesker hvert år. De to andre sygdomme er aids og tuberkulose.

Hvert år bliver 300 millioner mennesker smittet med malaria, og årligt dør mellem 2 og 3 millioner mennesker af sygdommen. De fleste dødsfald sker i Afrika, hvor man ikke har tilstrækkeligt med ressourcer til at forebygge smitten. Især små børn er udsat, og hvert halve minut dør et afrikansk barn på grund af malaria.

I en global sammenhæng anser mange malaria for at koste flere leveår end fx kræft.

Fig. 3.1



# Malariaparasitten

Som så mange andre infektionssygdomme forårsages malaria af en encellet mikroorganisme. Mange infektionssygdomme forårsages af bakterier, som er prokaryote organismer, men malaria forårsages af en parasit, som er en eukaryot organisme.

En markant forskel mellem pro- og eukaryote celler er, at eukaryoter i modsætning til prokaryoter har en veldefineret cellekerne. Mennesker og eukaryote dyr består ligesom malariaparasitten af andre celler, og der er derfor større ligheder mellem stofskiftet i parasitter og mennesket, end der er mellem stofskiftet i bakterier og mennesket. Det gør det mere vanskeligt at behandle infektioner forårsaget af parasitter. Eksempelvis er der mange typer antibiotika, der ikke virker på parasitter, fordi virkningen af antibiotika ofte er baseret på omsætningsveje, der kun findes hos prokaryote.

Malariaparasitten tilhører en slægt, hvis latinske navn er *Plasmodium*. Plasmodiumslægten omfatter mange arter, men kun fire af arterne kan angribe mennesker: *P. malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum* og *P. vivax*. Karakteristisk for dem alle er, at deres livscyklus involverer to værtsorganismer: Mennesket og malariamyggen.



Fig. 3.2: Anophelesmyg.

Når en myg, der er smittet af malaria, stikker et menneske og suger blod, bliver malariaparasitter i myggens spyt sprøjtet ind i mennesket. Kun myg af en enkelt slægt (Anopheles) kan være smittebærere, til gengæld kan 80 arter inden for denne slægt overføre smitte (være vektorer), men kun 45 arter regnes for at være vigtige vektorer. Hunmyg suger blod for at skaffe protein til at udvikle deres æg, hanmyg stikker ikke og overfører derfor ikke malaria.

## Parasittens livscyklus

### I mennesket

Malariaparasittens livscyklus (se fig. 3.3) omfatter mange forskellige stadier, og inde i mennesket gennemgår den en række forandringer, hvilket er en af årsagerne til, at det er svært at udvikle en vaccine og medicin mod malaria.

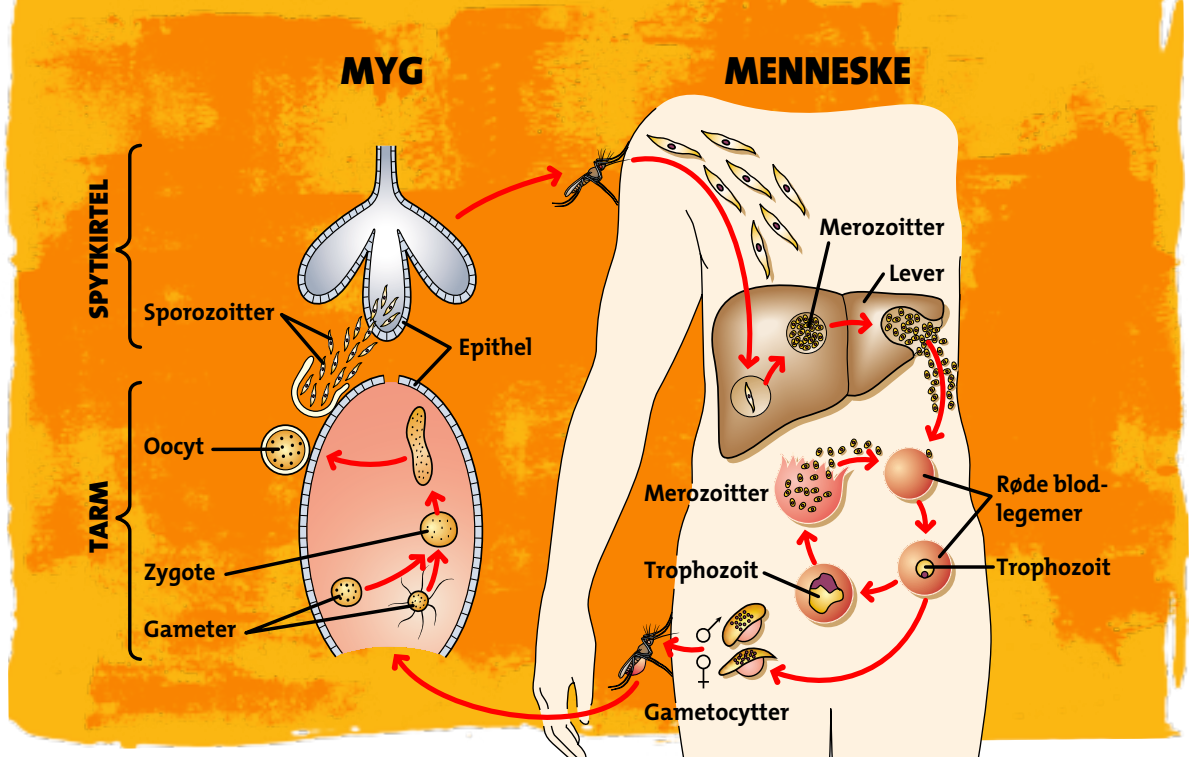
- Når en myg, der er smittet med malaria, tager et blodmåltid fra et menneske, bliver malariaparasitter sprøjtet ind i mennesket med myggens spyt.
- På dette stadium kaldes parasitterne for *sporozoitter*.
- Parasitterne kommer med blodet eller via lymfen

til leveren, hvor de invaderer levercellerne. Der kommer kun én parasit ind i den enkelte levercelle, men til gengæld går parasitten i gang med en asexuel formering og producerer nye celler, som kaldes *merozoitter*.

Parasitter af arten *P. falciparum* bliver i levercellerne i 5½ dag, mens parasitter af arten *P. malariae* bliver i 15 dage. I den periode, hvor parasitterne opholder sig i levercellerne, mærker patienten intet til infektionen.



Fig. 3.3: Illustration af parasittens livscyklus (se også side 75).



Parasitter fra arterne *P. ovale* eller *P. vivax* kan gå i dvale i leveren. En aktivering af disse sovende parasitter forklarer, hvorfor nogle patienter pludseligt får tilbagefald, efter at en infektion tilsyneladende er slået ned.

- Når merozoitterne forlader levercellerne, inficerer de straks de røde blodlegemer, hvorved de omdannes til *trophozoitter*. Trophozoitterne deler sig i blodcellerne, hvor flertallet igen omdannes til merozoitter. Når antallet af merozoitter er blevet tilstrækkeligt stort, sprænges det røde blodlegeme, og merozoitterne frigives til blodplasma, hvorfra de hurtigt igen trænger ind i nye røde blodlegemer. Nogle merozoitter omdannes til *gametocytter*, der er de seksuelle former af malariaparasitten.

### I myggen

- Når Anopheles-hunmyggen suger menneskeblod, der indeholder gametocytter, begynder en anden cyklus: I myggens tarm omdannes gametocytterne til henholdsvis hanlige mikrogameter, og til hunli-

ge makrogameter. Den mobile mikrogamet opsøger og smelter sammen med makrogameten. Efter sammensmeltningen dannes en diploid zygote.

Efter befrugtningen bevæger zygoten sig ned midt i myggens tarm, hvor den sætter sig fast på ydersiden og omdannes til en oocyt. Samtidig med at oocytten sætter sig fast, begynder den at dele sig. Den første deling er en reduktiv deling (en meiose). Malariaparasitten er således haploid i hele sin livscyklus med undtagelse i zygote-stadiet, hvor den er diploid. Ved celledelingerne i oocytten dannes adskillige tusinde sporozoitter, der, når oocytten sprænges, trænger op i myggens spytkirtler, hvor de er parate til at lade sig injicere i et menneske. Hermed er den onde cirkel etableret. Parasitternes livscyklus i myggen varer mellem otte og 35 dage afhængig af dels omgivelsernes temperatur, dels af hvilken art parasitten tilhører, og endelig af hvilken art af myggeslægten Anopheles parasitten befinder sig i. Parasitterne kan kun udvikle sig i myggene, hvis temperaturen er mellem 16 og 33 °C.



Også andre pattedyr end mennesket kan blive smittet med malaria, men det er kun menneskeaber, der kan inficeres med de samme parasitter, som inficerer mennesker (*P. ovale*, *P. malaria*, *P. falciparum* og *P. vivax*). Malaria hos fugle blev typisk anvendt som model, indtil man blev i stand til at dyrke de fire nævnte humant-patogene parasitter. I dag anvendes en musemodel med parasitten *P. yoelii* typisk til in vivo-forsøg. In vivo-forsøg er eksperimentelle undersøgelser inden i en levende organisme i modsætning til in vitro-forsøg, der er eksperimentelle undersøgelser, der udføres under laboratorieforhold.



# Når malaria går i blodet



Så snart parasitterne er kommet ind i de røde blodlegemer, begynder de at nedbryde hæmoglobinet og bruge de frigjorte aminosyrer til deres eget stofskifte. Jern(II)-ionerne i den frigjorte hæg fra hæmoglobin bliver oxideret til jern(III)-ioner.

Det dannede jern(III)-hæg er giftigt for parasitten, men kan uskadeliggøres ved at bringe to hæg-molekyler til at reagere med hinanden (dimerisering), så der dannes hæmozoin. Den dannede hæmozoin er en ugiftig krystallinsk rødbrun forbindelse.

*P. falciparum* er desuden i stand til at udtrykke nogle proteiner på overfladen af blodlegemerne, hvilket får cellerne til at sætte sig fast på karvæggen i de tyndeste blodårer, kapillærerne. Det er derfor, at *P. falciparum* er den farligste af malariaparasitterne. Da kapillærerne forsyner hjernen og andre livsvigtige organer med oxygen og næringsstoffer, vil en blokering af blodtilstrømningen være livstruende for patienten.

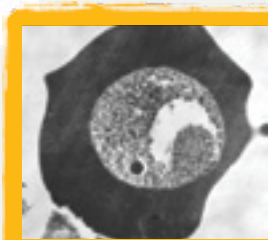
Inde i blodlegemerne formerer parasitterne sig, og til sidst er cellerne så fyldt op, at de sprænges. I tilfældene *P. falciparum*, *P. vivax* og *P. ovale* sprænges cellerne efter 48 timer, og i tilfældet *P. malariae* efter 72 timer. Ved sprængningen af cellerne invaderer parasitterne nye celler, og derudover frigives en række stoffer til blodet. Det formodes, at det er de stoffer og de immunologiske reaktioner over for dem, der fremkalder de voldsomme feberanfald, der er karakteristiske for malariapatienter. Afhængig af, hvilken type malaria patienten er inficeret med, vil feberanfaldene komme hver tredje eller fjerde dag, jævnfør beskrivelsen af Kristoffer, der fik feberanfald hver tredje dag.

I gennemsnit bliver der frigjort ti parasitter, hver gang et inficeret blodlegeme sprænges. Det betyder, at antallet af parasitter bliver tidoblet hver tredje eller fjerde dag, og derfor bliver en stor del af patientens blodlegemer hurtigt inficeret. Hvis en patient tidligere har været inficeret af malariaparasitter, og hvis det kun er nogle få måneder eller kortere tid siden, er der dog en chance for, at patientens immunsystem på grund af huskeceller er i stand til at kontrollere infektionen og hurtigere og mere effektivt kan uskadeliggøre den. De dannede antigener, der udtrykkes på blodlegemets overflade, vil bevirke, at immunsystemet kan genken-

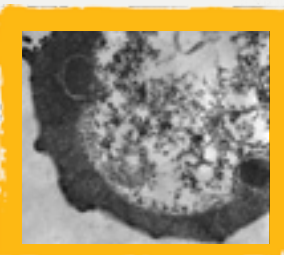
de de inficerede blodlegemer, fange dem og destruere dem i milten. Det er derfor, at mennesker, der lever i områder med meget malaria og ofte udsættes for parasitten, oplever, at malariaanfaldene bliver mildere og mildere for hver gang, de bliver inficeret. Omvendt er små børn, som for første gang udsættes for malariaparasitten, særligt sårbare. Deres immunforsvar har endnu ikke mødt parasittens antigener, og da børns immunforsvar i forvejen ikke er lige så stærkt som voksnes, har de svært ved at bekæmpe infektionen. Derfor er det i stor udstrækning børn, der dør af malaria. Ernæringstilstanden i mange malariaområder er ringe – specielt med henblik på protein. Det gør børnenes sårbarhed endnu større.

Fig. 3.4:

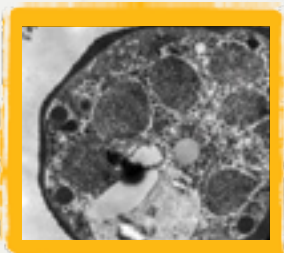
Et rødt blodlegeme er kun få timer forinden blevet invaderet af en *falciparum*-parasit. *Falciparum* betyder "halvmåneformet" og henviser til den unge trophozoits halvmåneform, der populært kaldes ringstadiet. Blodlegemets overflade er glat.



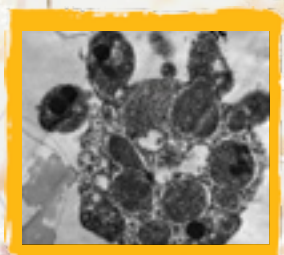
Nu vokser trophozoitten. På dette stadie er blodlegemets overflade begyndt at blive ujævn. Det er bl.a. i disse ujævnheder eller såkaldte "knubber" på ydersiden, at parasitten udtrykker de proteiner, der 'klistrer' blodlegemet til kapillærerne.



Trophozoitten er nu vokset og har delt sig så meget, at blodlegemet er helt fyldt op. De mørke strukturer er muligvis parasitkerner.



Der er gået 48 timer, og blodlegemet er blevet så fyldt, at det er ved at sprænges. Flere merozoitter er allerede på vej videre (øverst til venstre i billedet) i blodplasmaet for at finde nye blodlegemer at inficere.



# Malaria er et fattigdomsproblem

Det diskuteres, om en stor del af den tredje verden er fattig på grund af den udbredte malaria, eller om malaria er udbredt i den tredje verden på grund af fattigdommen. Under alle omstændigheder er malaria primært udbredt i den fattige del af verden. I et rigt område som den amerikanske stat Florida var malaria meget udbredt i første halvdel af forrige århundrede, men ved hjælp af forbedrede dræningsteknikker i landbruget, forbedret kontrol med myggenes udklækningssteder og de rette forholdsregler for mennesker og deres boliger lykkedes det at fjerne malariarisikoen. I et fattigt afrikansk land er det kun de færreste mennesker, der har råd til et – set fra et vestligt synspunkt – enkelt hjælpemiddel som et myggenet. Det hjælper heller ikke meget at bo i lerhytter eller interimistiske boliger af blik og pap, hvor myggene kan trænge ind gennem sprækkerne. Et yderligere problem er, at fattige mennesker for at spare på udgifterne til medicin ofte vil holde op med at tage medicin, når de er symptomfri, men inden infektionen er fuldstændig bekæmpet. Eller de vil typisk nøjes med halve doser for at gemme tabletterne til en anden gang. På den måde bliver dosis for lille til effektivt at dræbe alle parasitterne. Det medfører en øget risiko for, at de mest modstandsdygtige af parasitterne udvikler resistens mod medicinen. At bekæmpe malaria handler altså i høj grad om fattigdomsbekæmpelse, herunder etablering af sundhedsklinikker med uddannet personale, der kan informere om den korrekte brug af medicin. Endvidere kan simple forholdsregler, som fx at beskytte sig i skumringstimerne, hvor myggenes angreb intensiveres, fremme sundhedstilstanden.

Et dansk-tanzaniansk forskerhold har dokumenteret, at der kan gøres en god forebyggende indsats med forholdsvis simple tiltag. Forskerholdet forsynede beboerne i de to østtanzanianske landsbyer Magoda og Mpapayu med myggenet, og ugentligt fik landsbyerne besøg af uddannet sundhedspersonale, som informerede om at tage den rigtige medicin i de korrekte doser og om at lade være med at tage medicin, når det ikke var nødvendigt.

Efter tre år var andelen af børn, som var inficeret med parasitter, der var resistente over for et anti-malariaprodukt, faldet fra 30 til 5 procent.

## International opmærksomhed

Projektet, der blev iværksat af professor Ib Bygbjerg, Institut for Folkesundhed, Københavns Universitet og i dag ledes af professor Thor G. Theander, Institut for Medicinsk Mikrobiologi og Immunologi, har tiltrukket sig international opmærksomhed, og man samarbejder både med et af malariaforskningens flagskibe, London School of Hygiene and Tropical Medicine, og med lokale forskergrupper i en lang række udviklingslande. Som udgangspunkt blev projektet realiseret under et forskningsprogram i Danida og havde bl.a. til formål at opbygge den lokale forskningskapacitet. Dette aspekt var medvirkende årsag til, at et udvidet projekt modtog 40 mio. dollar i støtte fra ”Melinda og Bill Gates Foundation”. Microsofts hovedaktionær Bill Gates er en af de væsentligste private donorer af midler til forskning i hiv/aids, tuberkulose og malaria.

## Jagten på malariamidler

Naturstoffer har vist sig at være en rig kilde til udvikling af lægemidler mod malaria. Tilmed er det sådan, at de områder i verden hvor biodiversiteten er størst – og hvor der dermed også er størst sandsynlighed for at finde nye virksomme stoffer – ofte er de samme områder, hvor malaria er et stort problem. Det er derfor oplagt, at lokale forskere bliver engageret i jagten på nye malariamidler. Men på trods af en stor forsk-



# Naturstoffer som lægemidler

ningsindsats i både udviklede lande og i udviklingslande og på trods af store summer i forskningsstøtte fra statslige bistandsorganisationer som Danida og fra private donorer, er malarieforskningen relativt set alligevel underprioriteret. Medicinindustrien foretrækker at forske i de sygdomme, der er udbredt i den rige del af verden, fordi det skønnes, at chancen for en god forrentning af denne investering er større end forrentningen af en investering i en fattigdomssygdom. Det er da også tankevækkende, at den største forskningsindsats inden for malaria er sket i de krigsperioder, hvor rige lande har haft deres soldater i områder, hvor malaria er udbredt.



Fig. 3.5: Et barn i landsbyen Magoda i det østlige Tanzania får taget en blodprøve, der skal afsløre, om barnet har malaria.

Som det fremgår af det indledende citat om Kristoffer, blev han behandlet med stærke droger. Droger er tørrede planter, der anvendes som lægemidler. Siden tidernes morgen har mennesker anvendt planter som lægemidler. Gravfund i Ægypten har vist, at de gamle ægyptere anvendte planter i kosmetik og som lægemidler, og enkelte gravfund har endda indikeret, at selv neanderthalmennesket kendte til brugen af plantemedicin.

Den dag i dag spiller naturstoffer, som er isoleret fra planter, stadig en betydelig rolle som kilde til lægemidler. Det skønnes, at  $\frac{1}{3}$  af alle lægemidler i dag enten er naturstoffer eller er afledt fra naturstoffer. Fx isoleres den codein, der findes i codimagnyltabletter, stadig fra opiumvalmuen.

Naturstoffer har især været væsentlige for udvikling af lægemidler mod infektionssygdomme og kræft. Mikroorganismer som bakterier og svampe har været gode kilder for stoffer, der er udviklet til lægemidler mod infektionssygdomme forårsaget af bakterier (penicilliner, tetracycliner, streptomyciner) og svampe (griseofulvin), hvorimod planter har haft større betydning for udvikling af lægemidler til bekæmpelse af kræft og sygdomme fremkaldt af parasitter som fx malaria.

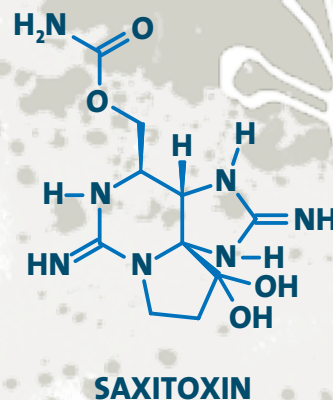
Levende organismers stofskifte er afhængig af tilstedeværelsen af bestemte stoffer, fx aminosyrer, nukleinsyrer og carbohydrater. Disse forbindelser kaldes de primære metabolitter.

Mange planter producerer herudover stoffer, der kun findes i den enkelte plante eller i nært beslægtede planter. Disse stoffer kaldes de sekundære metabolitter.

Det er generelt antaget, at de sekundære metabolitter hjælper planten i dens kamp for at overleve. Det er bl.a. vist, at visse sekundære metabolitter forhindrer nogle insekter i at æde bestemte planter. Farvestofferne i blomsternes kronblade er også sekundære metabolitter, der lokker bier og andre insekter hen til blomsterne og hermed fremmer blomsternes befrugtning.

Fig 3.6: En virkning, der batter.

Nogle naturstoffer har en meget kraftig virkning på mennesker. Saxitoxin er et af de stærkest kendte giftstoffer. Stoffet dannes af nogle dinoflagellater, der sammen med andet plankton indfanges og spises af skaldyr som østers og muslinger. Saxitoxinerne kan herved opkoncentreres i skaldyrene. Nogle få µg saxitoxin pr. kg er dødelig dosis, dvs. en person på ca. 70 kg kun behøver at indtage 0,15 mg saxitoxin for at få en dødelig dosis. Andre naturstoffer kan fremkalde hallucinationer.



## Naturstoffer mod malaria

Det første virksomme lægemiddel mod malaria blev opdaget, da spanierne i begyndelsen af 1500-tallet kom til Sydamerika mod nord og syd. Her mødte de en højt udviklet kultur i Inkariget, der dækkede nutidens Peru og de tilstødende lande. Spanierne fik meget hurtigt nedkæmpet Inkariget, men mange historikere mener, at den militære succes nok snarere skyldtes, at spanierne smittede inkaerne med europæiske sygdomme som fx kopper end spaniernes militære evner. Da inkaerne var helt forsvarsløse over for europæiske sygdomme, skete der et voldsomt indhug i befolkningen, og Inkariget blev derfor forsvarsløst. Sammen med kolonisterne kom en del jesuittermunke og andre missionærer til Sydamerika. Munkene havde allerede fra Europa en tradition for at indsamle lægeplanter og for at dyrke lægeplanter i klosterhave. Den tradition fortsatte munkene i Sydamerika, og de blev derfor opmærksomme på, at indianerne benyttede barken fra et særligt træ til at behandle muskelskælven, således som det ses efter kraftig nedkøling eller ved feberanfald. Munkene indsamlede barken, afprøvede den og konstaterede, at barken var et virkningsfuldt lægemiddel. En naturlig følge af den observation var at prøve stofferne over for malaria-patienter, og hermed fik man det første lægemiddel, der rent faktisk havde en effekt på malaria. Munkene bragte barken med tilbage til Europa, hvor den blev solgt som jesuitterbark. Brugen slog først rigtig an, da det lykkedes en engelsk læge at helbrede solkongen Ludvig den XIV's søn for malaria, men selv herefter var der i det protestantiske Nordeuropa betænkelig-

hed ved at anvende midlet, idet det frygtedes at være noget katolsk trolldomsværk. Selvom Kristoffer i det indledende citat blev behandlet med "stærke droger", er det således tvivlsomt, om de ud over en mulig lindrende effekt havde nogen virkning på selve infektionen.

Barken udvindes fra træer tilhørende slægten *Cinchona*, der på dansk kaldes kinatræer, og barken betegnes derfor i dag som kinabark. Slægtens latinske navn blev valgt til ære for en spansk grevinde (som i øvrigt hed *Chinchona*), som efter legenden blev helbredt for malaria, og som i taknemmelighed bragte barken med til Europa.

Da jesuitterbark frem til midten af 1900-tallet vedblev at være det eneste effektive lægemiddel mod malaria, blev barken en vigtig handelsvare. Kinatræet fandtes kun i Peru og de tilstødende lande i Sydamerika, og eksporten blev en betydelig indtægtskilde for netop de lande. Det var derfor strengt forbudt at udføre levende planter og frø.

I midten af 1800-tallet lykkedes det dog nogle hollændere at smugle planter ud fra Bolivia og etablere plantagedrift på Java i Indonesien. I løbet af kort tid blev Indonesien og siden hen også Indien verdens førende producenter af kinabark.

Under anden verdenskrig truede japanerne Indonesien, og det medførte en usikker forsyning af kinabark. Det menes, at der døde flere allierede soldater under anden verdenskrig i Indokina på grund af malaria end på grund af japanske kugler.



Fig 3.7: Det Farmaceutiske Fakultet på Københavns Universitet råder over en stor samling kinabark indsamlet og registreret gennem flere århundreder. Her er eksempler på kinabark indsamlet i 1884 på øen St. Thomas ud for Vestafrikas kyst.



# Kinaalkaloider

I 1811 lykkedes det for første gang at isolere en ren forbindelse fra kinabark, nemlig stoffet cinchonin. I 1820 lykkedes det for to franskmænd at isolere quin (se struktur fig. 3.9a) fra barken og at udvikle en metode, der gjorde det muligt både at isolere quin og cinchonin i stor skala, så en egentlig produktion kunne begynde. Det betød et enormt fremskridt i behandlingen af malaria. Tidligere måtte man anvende den tørrede bark med den variation i sammensætning og koncentration af indholdsstoffer, som altid findes i plantemateriale. Nu kunne man fremstille præparater af de rene stoffer og dermed sikre præparater med en reproducerbar virkning. Det er specielt vigtigt for behandling med quin, der, hvis det indgives i for store doser, kan give bivirkninger i form af kvalme, susen for ørerne, lette synsforstyrrelser, udslæt og forstyrrelse af hjerterytmen.

Først 147 år efter at quin første gang blev isoleret i ren tilstand, lykkedes det i 1967 entydigt at fastslå stoffets struktur. Med anvendelse af moderne spektroskopiske metoder, specielt NMR-spektroskopi, ville dette arbejde i dag kunne gøres i løbet af en eller nogle få uger.

Ud over anvendelsen som malariamiddel benyttes quin også som smagskorrigens i tonic-vand, hvor det er ansvarligt for den bitre smag. Quins smag er dog så dominerende, at stoffet kun tilsættes i beskedne mængder – så der skal drikkes adskillige liter gin og tonic for at indtage en virksom quinindosis.

## Virkningsmekanisme og resistens

Renfremstilling af quin har gjort det muligt at undersøge virkningen på malariaparasitten. Selv i dag – næsten 200 år efter at det lykkedes at isolere stoffet i ren tilstand – diskuteres den præcise virkningsmekanisme stadig. Der er dog efterhånden enighed om, at stoffet dræber malariaparasitterne ved at forhindre dannelsen af hæmozoin ud fra hæm og derved forhindre afgiftningen af hæm.

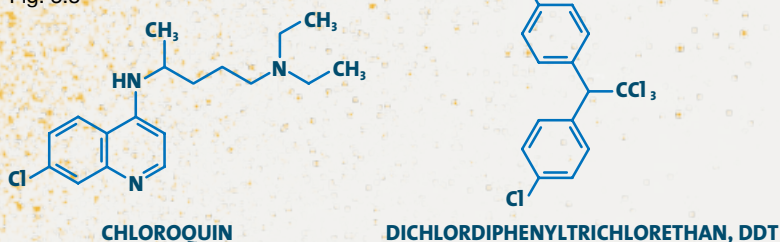
Til trods for at quin griber ind i en vital funktion i parasitten, er parasitterne alligevel i stand til at blive modstandsdygtige over for stoffet (at udvikle resistens). For at beskytte sig mod værtsorganismens immunsystem er parasitter i stand til hurtigt at kunne ændre sig, at kunne mutere.

En af de forsvarsmekanismer parasitterne udvikler, er at danne en pumpe, der er i stand til at pumpe lægemidler ud af parasitten. Herved skiller parasitten sig af med lægemidlet og er blevet resistent. Resistensudvikling hos parasitterne er et meget stort problem for behandling af malaria og medfører, at det er nødvendigt til stadighed at udvikle nye malarialægemidler for nogenlunde at kunne kontrollere sygdommen.



# Quininanaloger

Fig. 3.8

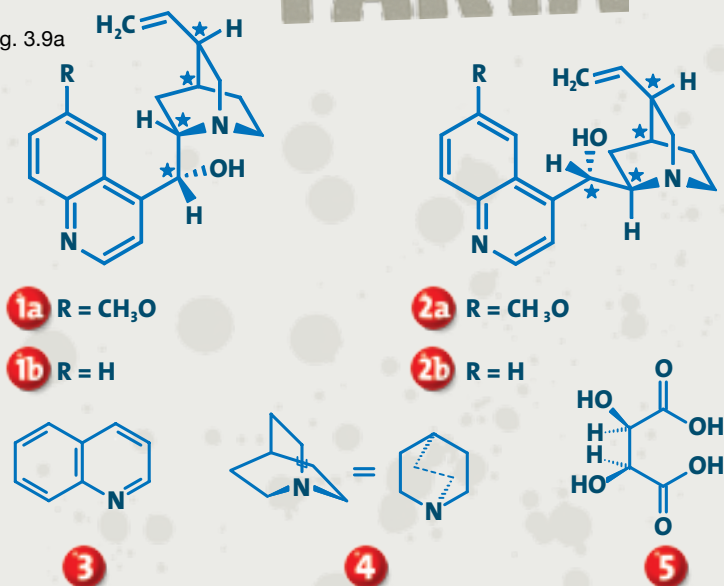


Quinin er som de fleste naturstoffer ikke et optimalt lægemiddel. En ulempe ved quinin er, at der kun er en ringe forskel på den dosis, der medfører, at stoffet virker helbredende på malaria og den lidt større dosis, der giver skader på hjertet og centralnervesystemet (herunder tinnitus). Dels på den baggrund, dels på grund af den truede quinintilførsel under den anden verdenskrig, er der blevet arbejdet intenst på at finde mere simple analoger, der har bedre egenskaber. En af de største succeser, der er opnået i den sammenhæng, er stoffet chloroquin. Stoffet blev udviklet i Tyskland i 1934, men det var især de allierede, der benyttede det under den anden verdenskrig.

Anvendelsen af chloroquin til behandling af malaria blev fortsat og udvidet efter krigen. I mange år var stoffet i stand til at helbrede stort set alle former for malaria. Ved at anvende kombinationen af chloroquin til behandling af malariapatienter og DDT til bekæmpelse af malariamyggene lykkedes det næsten at udrydde malaria fra Indien i begyndelsen af 1960'erne. Efter at parasitterne udviklede resistens over for chloroquin, og myggene udviklede resistens over for DDT, er Indien igen blevet kraftig plaget af malaria. I løbet af 1970'erne blev der observeret resistens mod chloroquin – parasitterne havde udviklet en pumpe, der kunne fjerne lægemidlet! Til trods for at chloroquin i dag har begrænset anvendelse, anses det stadig for at være det lægemiddel, der har frelst langt flest menneskeliv. Foruden chloroquin er der blevet udviklet en lang række andre analoger, hvoraf nogle stadig anvendes.

## Kinaalkaloider og chiralitet

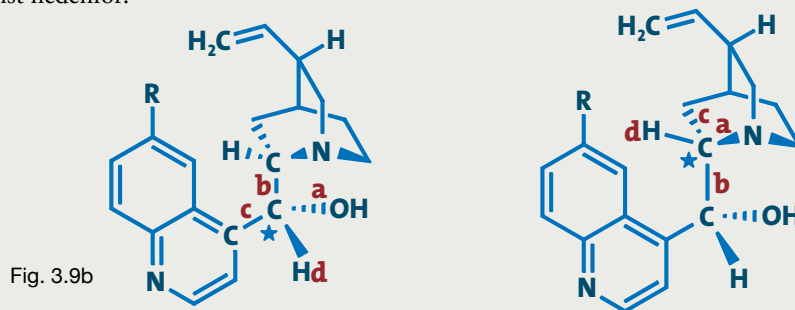
Fig. 3.9a



Quinin (1a), cinchonidin (1b), quinidin (2a) og cinchonin (2b) findes alle i barken fra kinatræet. Fælles for alle fire alkaloider er det bicykliske aromatiske quinolin-skelet (3) og det tricykliske alifatiske quinuclidin-grundskelet (4). Quinolinskelettet forekommer meget sjældent i naturen. Alle fire molekyler indeholder fire carbonatomer (mærket med ★), der er bundet til fire forskellige ligander, det vil sige fire stereogene carbonatomer. Som oftest vil molekyler, der indeholder stereogene carbonatomer være chirale, dvs. molekylet er forskelligt fra sit eget spejlbillede (*se side 63*). Molekyler, hvori der indgår et spejlplan, således som det er tilfældet i mesovinsyre (5), er dog ikke chirale. Bemærk, at spejles molekylet i et plan vinkelret på papiret, men midt mellem de to hydroxidbærende carbonatomer, gendannes molekylet uændret!



Såfremt man ønsker at angive den absolutte konfiguration under anvendelse af *R,S*-nomenklaturen, kan man gå frem som beskrevet i det følgende: Ifølge prioriteringsreglerne skal liganderne i to af disse carbonatomer prioriteres, som vist nedenfor:



Med henblik på at afklare den absolutte konfiguration af det med stjerne mærkede carbonatom i den venstre form anvendes, at de tre carbonatomer, der er vist med almindelige bindinger, ligger i papirets plan. Hydrogenatomet, forbundet til carbonatomet med en fed kile, ligger foran papirets plan, og hydroxidgruppen ligger bag papirets plan, idet bindingen hertil er en punkteret kile. For at kunne se fra det stereogene carbonatom ned mod d-liganden (hydrogenatomet) må man derfor gå om bag papiret. Herved vil man gå med uret, når man går fra  $a \rightarrow b \rightarrow c$ , dvs. her er tale om en *R*-form. I den højre form markerer de almindelige bindinger, at hydrogenatomet (d-liganden), det stereogene carbonatom og det hydroxidbærende carbonatom (b-liganden) alle ligger i papirets plan. Bindingen mellem det stereogene carbonatom og nitrogen peger frem foran papiret, og bindingen ned til c-liganden peger bagud. Når man går fra  $a \rightarrow b \rightarrow c$ , går man mod uret, og dette stereogene carbonatom har derfor *S*-konfiguration.

Quinin og quinidin har derfor modsat konfiguration ved de to stereogene carbonatomer og samme absolutte konfiguration ved de to resterende stereogene carbonatomer. De to stoffer er derfor diastereomere forbindelser. Hvis de havde haft modsat absolut konfiguration ved alle stereogene carbonatomer, havde de været enantiomere forbindelser (spejlbilledformer af hinanden). Diastereomere forbindelser har forskellige egenskaber, dvs. de har forskellig opløselighed, forskellige smeltepunkter og forskellige biologiske egenskaber. Eksempelvis kan nævnes, at quinin kan

anvendes mod malaria, hvorimod quinidin er mere velegnet til nogle hjertesygdomme, hvor hjertet slår uregelmæssigt, og er mindre egnet til behandling af malaria.

Enantiomere forbindelser har samme opløselighed, samme smeltepunkt, og vil dreje planpolariseret lys lige meget, men i modsat retning (altså højre om eller venstre om) og vil typisk have forskellige biologiske egenskaber. Dette sidste hænger sammen med, at for at udøve en biologisk effekt skal stoffet vekselvirke med et biologisk makromolekyle, ofte et protein (et enzym eller en receptor, der er et bindingssted for et transmitterstof). Proteiner er opbygget af aminosyrer, der på nær glycine er chirale. Dette vil medføre, at proteinstoffer er chirale, idet de indeholder mange stereogene carbonatomer, og der ikke vil være symmetri i molekylerne. Et chiralt molekyle vil reagere forskelligt med de to enantiomere forbindelser, jævnfør analogien med vores hænder.

Chiralitet kan forstås ved at sammenligne med vores hænder. Hvis vi presser håndfladerne mod hinanden, ses venstre og højre som et spejlbillede af hinanden. Men de er ikke identiske. Venstre og højre hånd kan noget forskelligt.

Uanset om vi er højrehåndede eller venstrehåndede, kan vi i flæng anvende fx en kop, en skruetrækker eller en blyant, der alle er identiske med deres respektive spejlbilleder, men vi må anvende specielt fremstillede chirale redskaber, når vi skal skrælle kartofler, åbne en dåse eller skal klippe noget over.

# Quinghaosu (Artemisinin)



Fig. 3.10:  
Quinghao.

I år 340 f.Kr. beskrev den kinesiske læge Ge Hong, at kinesisk bynke *Artemisia annua* (på kinesisk quinghao) var et effektivt middel til behandling af feber. I 1971 påviste en kinesisk forskergruppe, at ekstrakt af planten kunne helbrede malaria i gnavere. Senere lykkedes det at isolere det meget virksomme naturstof artemisinin (på kinesisk quinghaosu, idet endelsen su på kinesisk betyder ekstrakt fra) og at vise, at stoffet er et uhyre effektivt middel til behandling af malaria. Artemisinin tilhører den forholdsvis lille gruppe af naturstoffer, der indeholder en peroxidbro. Denne funktionalitet er væsentlig for den antiparasitære effekt af molekylet. I lighed med quinon er artemisinin imidlertid ikke et optimalt lægemiddel. Fx er vandopløseligheden ringe, og det er et problem for optagelsen af lægemidlet, ligesom det forhindrer fremstil-

ling af injektionsvæsker. For at løse det problem er der blevet fremstillet mere vandopløselige derivater. Artemisinin og derivater har været anvendt med stor succes til behandling af malaria i Kina i mere end femten år samt i Thailand og Vietnam i mere end ti år. Stofferne finder stadig større anvendelse i den tropiske verden. En alvorlig ulempe ved behandling med artemisinin er, at til trods for at lægemidlet er uhyre effektivt og hurtigt slår en infektion ned, ses der meget hyppige tilbagefald. Det er ikke fuldt opklaret hvorfor, men en sandsynlig forklaring er, at artemisinin ikke slår alle parasitterne ihjel. Nogle formår derfor at dele sig igen. Det problem kan mindskes ved at anvende artemisinin i kombination med andre lægemidler.

Opdagelsen af artemisinin var af stor betydning, idet lægemidlet også kan bekæmpe infektioner med malariparasitter, der er resistente over for størstedelen af andre kendte malariamidler. Endnu er der ikke påvist resistens over for artemisinin og dets derivater.

## Dårlig luft

Ordet malaria stammer fra de latinske ord malus (dårlig) og aria (luft), altså dårlig luft. På fransk: mal air. På italiensk: male aria. Navnet opstod, fordi den herskende teori helt frem til midten af 1800-tallet gik ud på, at sygdommen kom fra ildelugtende dampe fra sumpe. Sygdommen hed derfor også sumpfeber. På fransk hedder malaria paludisme, der kommer af det latinske navn palus, som betyder mose eller sump. Et meget udbredt malariapræparat hedder Paludrine.

I 1880 opdagede den franske læge Alphonse Laveran den malariefremkaldende encellede parasit kaldet Plasmodium. Den eukaryote organisme er en såkaldt protozo, og for sin opdagelse af sygdomme fremkaldt af protozoer modtog Alphonse Laveran i 1907 Nobelprisen i medicin.

I 1897 opdagede den britiske læge, Ronald Ross, at det er malariamyggen, der overfører protozoen til mennesket. Han fandt parasitten inde i en myg, som havde stukket en malariapatient, og siden fandt han i en anden myg en parasit i et andet stadium af livscyklus. I 1902 modtog Ronald Ross Nobelprisen i medicin for opdagelsen af, at det er myg, der overfører parasitten mellem mennesker.

Navnet malurt har imidlertid ikke noget med det latinske ord for dårlig at gøre. Mal er den ældre form af møl, og planten fik sit navn, fordi den tidligere anvendtes som mølmiddel.

I dag arbejdes med to hypoteser, der kan forklare effekten af artemisinin.

Den ene går ud på, at artemisinin i lighed med quinon virker ved at blokere for dannelsen af hæmozoin, altså ved at blokere dimeriseringen af hæg. Hypotesen underbygges af, at metalioner som fx jern(III) aktiverer peroxidbroen og gør artemisinin til et kraftigt alkylringsmiddel. Det er således nærliggende at antage, at artemisinin bliver påvirket af den jernholdige hæg, der blev frilagt, efterhånden som parasitten fordøjer hæmoglobinet. Ved at alkylere hæg bliver det forhindret i at dimerisere.

Den anden hypotese er baseret på, at artemisinin standser en calciumpumpe i malariparasitterne. En for høj koncentration af calciumioner inde i en celle vil slå cellen ihjel.

Botanisk set er planten *Artemisia annua* nært beslægtet med den danske malurt (*Artemisia maritima*), men sidstnævnte indeholder ikke stoffer med effekt mod feber.



# Artemisinin's struktur

FAKTA

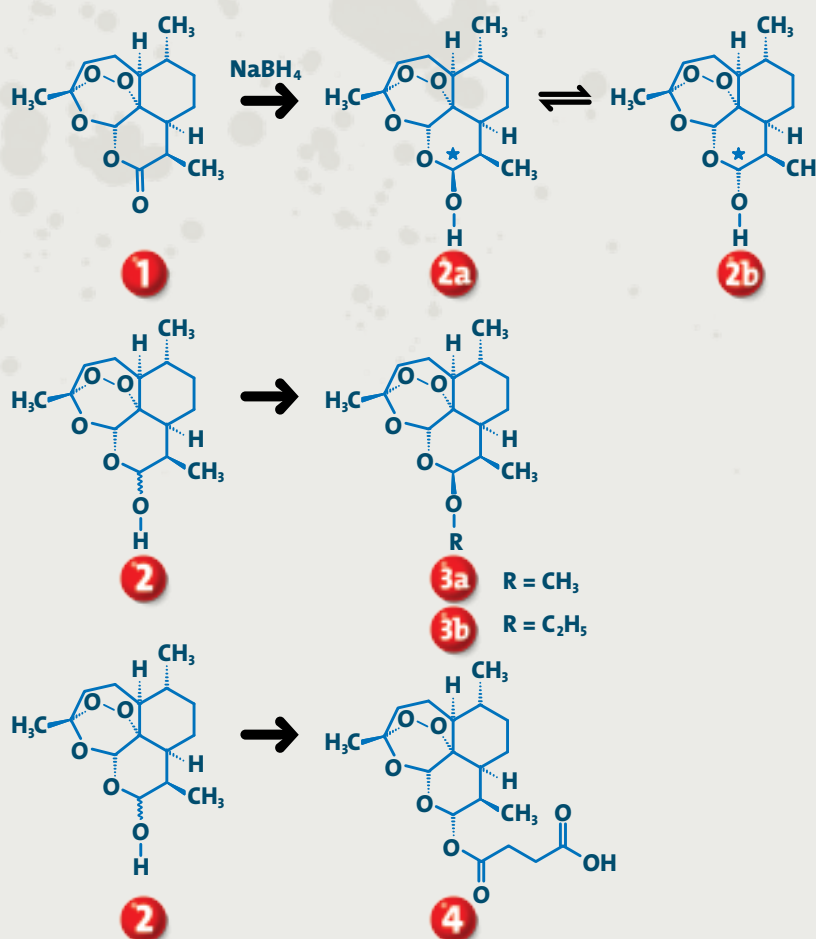


Fig. 3.11

De funktionelle grupper i artemisinin (1) omfatter en estergruppe, en peroxidbro og to acetallignende grupper. En acetal er en forbindelse, hvor der sidder to alkoxygrupper på samme carbon [ $\text{R}_2\text{C}(\text{OR}')_2$ , de to R-grupper og de to R'-grupper behøver ikke at være identiske]. I tilfældet artemisinin (1) er et carbonatom bundet til en alkoxygruppe og en peroxidbro og et andet carbon til en alkoxygruppe og en carbonyloxygruppe. Egenskaberne af disse to funktionelle grupper vil minde meget om egenskaberne for en acetalgruppe. Ved reduktion med natriumborhydrid observeres, at carbonyl i estergruppen er mere reduktionsfølsom end peroxidbroen. Dette medfører, at der ved reduktionen dannes halvacetalen (2). En halvacetal er en forbindelse, hvor den ene af alkoxygrupperne i en acetal er erstattet med en hydroxygruppe. Stereokemien ved det stereogene carbonatom (markeret med en stjerne i 2a og 2b) i halvacetaler er normalt ikke sta-

bil, der vil indstille sig en ligevægt mellem de to stereoisomere forbindelser 2a og 2b. I formelbilledet 2 er bindingen mellem carbonatomet og hydroxygruppen tegnet med en bølgelinie. Dette markerer, at bindingen kan enten gå op over papirets plan, gå ned under papirets plan, eller at der indstiller sig en ligevægt mellem de to former. Halvacetalen 2 kan efterfølgende omdannes til acetalerne 3a eller 3b. Stereokemien ved acetalcarbonatomet i 3a og 3b er i modsætning til stereokemien ved halvacetalcarbonatomet i 2 stabil. En markant forøgelse af vandopløseligheden er opnået ved fremstilling af esteren 4. Denne forbindelse indeholder også en carboxylsyregruppe, der vil findes som carboxylat ved fysiologisk pH (pH 7,4). En ionisk forbindelse vil typisk være markant mere opløselig i vand end den tilsvarende uioniserede forbindelse. Fx er salte af benzoesyre meget lettere opløselige i vand end benzoesyre.

# Gan cao

## (Kinesisk lakridsrod)



Fig. 3.12:  
Glycyrrhiza glabra.

Lakridsrod har i årtusinder både været anvendt som smagskorrigerende og som lægemiddel. I Europa har man udelukkende anvendt roden fra arten *Glycyrrhiza glabra*, hvorimod man i Kina anvender både *Glycyrrhiza glabra*, *G. uralensis* og *G. inflata* som stamplante til lakrids. Omkring 1972 kom en kinesisk stipendiat, Chen Ming, til København og medbragte nogle tørrede planter, der anvendtes i kinesisk medicin. Blandt de planter, der blev bragt til København var også *G. inflata*. Chen Ming besøgte Arsalan Kharazmi, der dengang var forskningsleder på Rigshospitalet. Her rådede man over en teknik, der gjorde det muligt at dyrke malariaparasitter i små plastikbrønde. Ved at tilsætte ekstrakter fra det medbragte plantemateriale til medierne, hvori parasitterne blev dyrket, kunne det påvises, at parasitternes vækst blev standset.

I et samarbejde med Søren Brøgger Christensen fra Det Farmaceutiske Fakultet på Københavns Universitet lykkedes det at isolere det virksomme stof. Stoffet blev fundet ved, at komponenterne i planteekstrakten blev adskilt ved chromatografi. Ved at teste de forskellige komponenter på samme måde, som den rå ekstrakt blev testet, kunne den væsentligste aktivitet knyttes til en komponent i ekstrakten. Under anvendelse af moderne spektroskopiske metoder, specielt NMR-spektroskopi, var det muligt at vise, at stoffet var *licochalcon A*. Denne forbindelse var blevet isoleret et par år før fra *G. inflata*, men de antiparasitære effekter var ikke tidligere observeret.

På basis af *licochalcon A* blev den bioteknologiske virksomhed Lica Pharmaceuticals etableret. Virksomheden arbejder nu med at udvikle et nyt lægemiddel mod malaria ud fra *licochalcon A*. Sammenlignet med andre malarialægemidler har *licochalcon A* en meget simpel struktur. Selve chalconskelettet lader sig nemt syntetisere ud fra et benzaldehyd og en acetophenon.

## FAKTA

### Struktur- opklaringen af *licochalcon A*

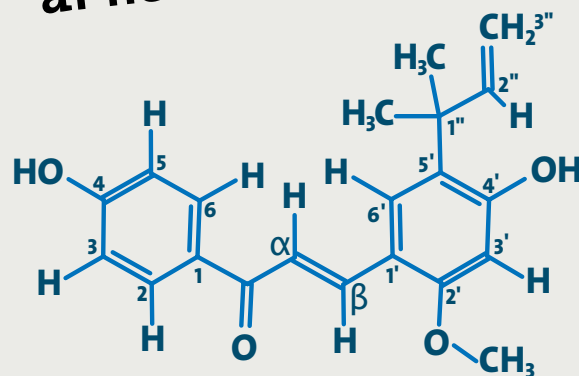


Fig. 3.13: Struktur af *licochalcon A*.

Alle atomkerner, der ikke indeholder både et lige antal protoner og et lige antal neutroner, har magnetiske egenskaber. Dette vil således gælde for  $^1\text{H}$ , der består af 1 proton, og  $^{13}\text{C}$ , der består af 6 protoner og 7 neutroner. Derimod indeholder kernen  $^{12}\text{C}$  både 6 protoner og 6 neutroner, og den vil derfor ikke have magnetiske egenskaber.  $^{12}\text{C}$  udgør næsten 98,9% af alt naturligt forekommende carbon, og  $^{13}\text{C}$  udgør på nær en ringe mængde af det radioaktive  $^{14}\text{C}$  den resterende mængde af naturligt forekommende carbon. Når en kerne har magnetiske egenskaber, kan den detekteres ved NMR-spektroskopi (**N**uclear **M**agnetic **R**esonance, på dansk kernemagnetisk resonans, men forkortelsen NMR benyttes overalt). NMR er blevet et af naturstofkemikerens vigtigste redskaber til at opklare strukturen af naturstoffer. Fremkomsten af strømspoler af superledende materialer har gjort det muligt at fremstille magneter med feltstyrker på 20 tesla; til sammenligning kan nævnes, at jordens magnetfelt er ca.  $10^{-4}$  tesla. Under anvendelse af disse magneter og moderne computerteknologi er det i dag muligt at skaffe sig detaljerede oplysninger om molekylers opbygning. Inden for organiske molekyler er det primært  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$ -kernen, der måles på. Ved fortolkningen af  $^1\text{H}$  NMR-spektre lægges vægt på tre parametre: signalets placering i spektret ( $\delta$ -værdien), der måles i parts per million, ppm, signalets intensitet



(integralet), der måles relativt til intensiteten af de øvrige signaler, og signalets opsplitning (multipliciteten), der måles i Hz. Signalets placering i spektret bestemmes primært af elektrontætheden ved signalet. Den typiske placering af signaler hidrørende fra forskellige typer protoner kan findes i egnede tabeller. Signalets intensitet vil i protonspektre være proportionalt med antallet af protoner, der giver anledning til signalet, og måles ved at måle højden af forskydningen af integrationskurvens basislinie over signalet. Signalets multiplicitet vil være en funktion af antallet af protoner, der er 3 eller 2 bindinger væk, selvom

koblinger over et større antal bindinger (long range koblinger) kan forekomme. Nogle simple regler for fortolkning af koblingsmønstre er, at 1) ækvivalente kerner kobler ikke med hinanden, og 2) hvis en kerne kobler med  $n$  ækvivalente kerner, vil den splitte op i  $(n+1)$  toppe, hvis den kobler med  $n$  og  $m$  ækvivalente kerner, vil den splitte op i  $(n+1)(m+1)$  toppe. Et signal, der ikke splitter op, kaldes en singlet. Hvis signalet splitter op i to toppe, kaldes det en doublet, i tre toppe en triplet og i fire toppe en quartet. I fig. 3.14 er  $^1\text{H}$  NMR-spektret af licochalcon A vist.

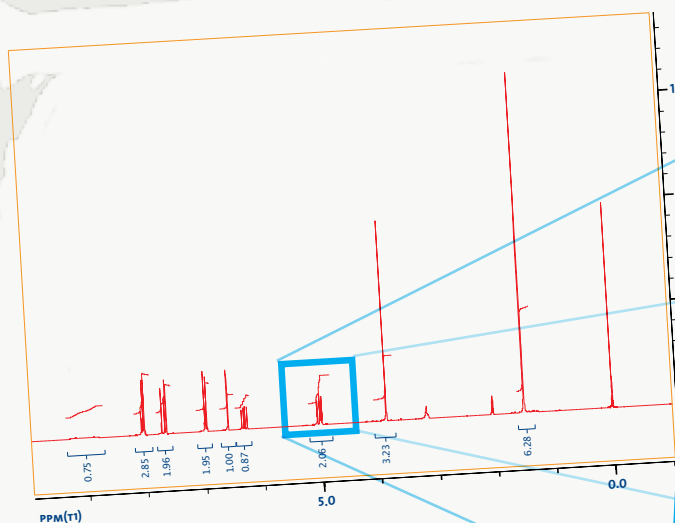


Fig. 3.14

Fortolkning: Ved 0,00 ppm ligger et referencesignal. Signalet ved 2,1 ppm er fra opløsningsmidlet (deutereret acetone), og signalet ved 3,2 ppm er et vandbånd. Signalet ved 1,52 ppm, integralet viser 6 H, er en singlet. Dette udseende vil forventes for de seks protoner siddende på de to methylgrupper ved C1", idet disse 6 protoner er ækvivalente, og der ikke findes andre protoner 2 eller 3 bindinger væk fra disse protoner. Signalet ved 3,87 ppm, integralet viser 3 H, er en singlet, hvis beliggenhed og multiplicitet afslører, at det må hidrøre fra en methoxygruppe (methoxygruppen på C2'). Signalet ved 5,00 ppm, integralet viser 2 H, består af 8 toppe, der ligger i 4 par, to dobbelte doubletter.

I NMR-spektret (fig. 3.15) er signalet vist i forstørrelse (en udbredning). Afstanden mellem toppene i

de 4 par er 1,5 Hz, hvilket antyder, at der er tale om to protoner, der begge sidder for enden af en dobbeltbinding (de to protoner på C3"). Koblingen mellem de to endestillede protoner er typisk 0 – 2 Hz. Afstanden mellem første signal i det første par og det første signal i det tredje par er 10,8 Hz, hvilket svarer til en ciskobling over en dobbeltbinding. Afstanden mellem det første signal i det andet par og det første signal i det fjerde par er 17,7 Hz, hvilket svarer til en transkobling over en dobbeltbinding. Signalet ved 6,30 ppm, integralet viser 1 H, er splittet op i 4 toppe. Afstanden mellem første og anden top er 10,8 Hz, svarende til ciskoblingen fundet i signalet ved 5,0 ppm. Afstanden mellem første og tredje top er 17,7 Hz, svarende til transkoblingen fundet i signalet ved 5,0 ppm. Dette signal må derfor hidrøre fra C2".

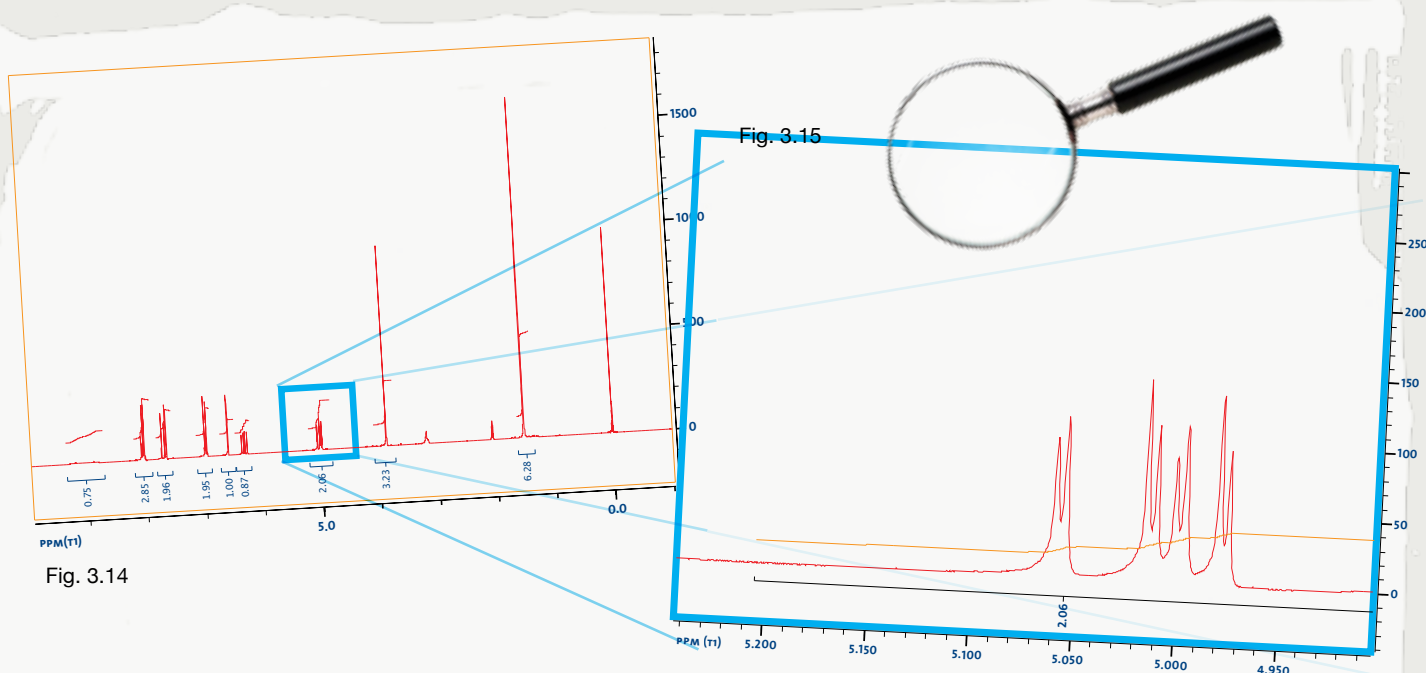


Fig. 3.15

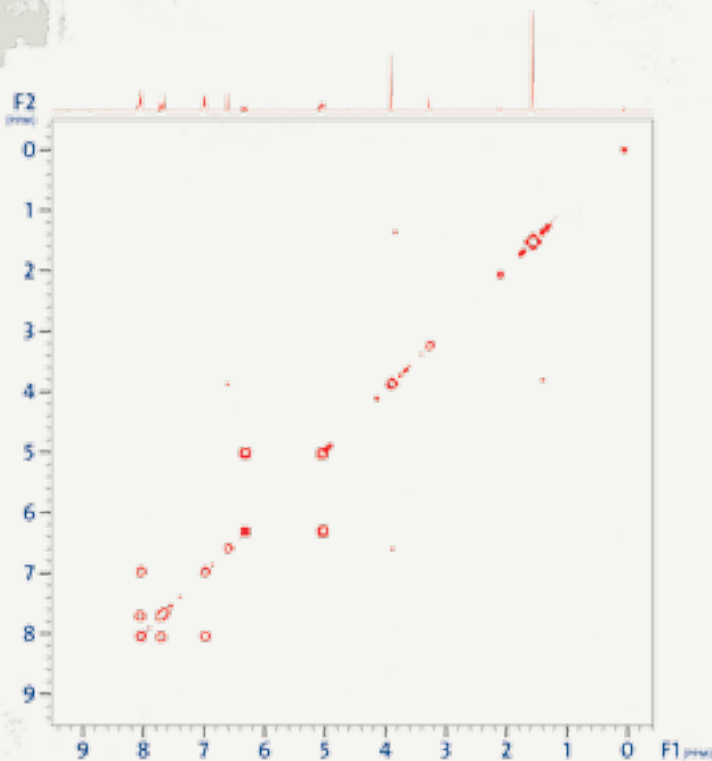


Fig. 3.16

Langs de to akser ses et  $^1\text{H}$  NMR-spektrum af licochalcon A. Spektret af licochalcon A ligger også langs diagonalen af spektret, men er her vist som højdekurver. Uden for diagonalen findes nogle *off-diagonal*-toppe. For at afklare om to kerner kobler med hinanden gennemføres følgende procedure: Det ene af de to signaler udvælges, fx på akse parallelt med X-aksen. Fx kan man vælge signalet ved 5,00 ppm. Ved at gå ned parallelt med Y-aksen kommer man ned til signalet på diagonalen og herefter ned til en off diagonal top beliggende under diagonalen. Fra denne top gås parallelt med X-aksen hen til signalet i spektret langs Y-aksen, herved kommer man frem til signalet ved 6,30 ppm. Denne analyse viser, at kernerne, der giver anledning til disse to signaler, kobler med hinanden. Tilsvarende kan der vises korrelation mellem signalerne ved 6,96 ppm og signalerne ved 8,0 ppm og mellem signalerne ved 7,70 ppm og signalet ved 8,03 ppm.

Et NOESY-spektrum (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) viser på tilsvarende måde hvilke kerner, der rumligt ligger tæt på hinanden: Dette spektrum viser, at methoxygruppen rumligt sidder tæt på protonen, der giver anledning til signalet ved 6,59 ppm, og herved fastlægges hvilket signal, der hidrører fra H3; den terminale  $\text{CH}_2$ -gruppe tæt på protonen, der giver anledning til signalet ved 6,30 ppm; og at de to ækvivalente methylgrupper sidder tæt på protonen, der giver anledning til signalet ved 7,64 ppm, og herved fastlægges hvilket signal, der hidrører fra H5. Ved fortolkning af  $^{13}\text{C}$  NMR-spektre anvendes primært signalets beliggenhed. Koblingen til protonerne er som regel ophævet under optegnelse af spektrene og den teknik, der benyttes til at optage spektrene, medfører, at signalernes intensitet ikke er proportional med antallet af kerner, der giver anledning til signalerne.

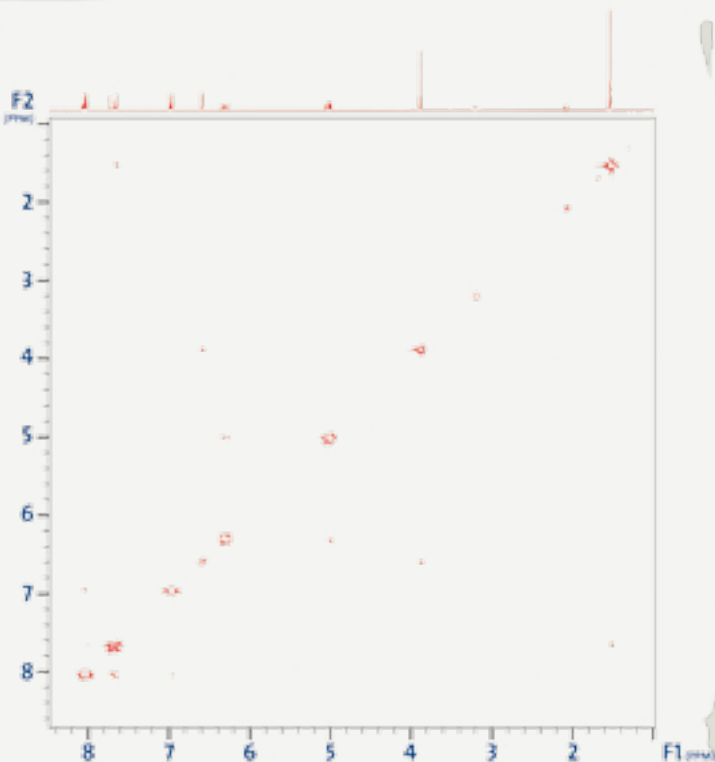


Fig. 3.17



Fig. 3.18 viser et  $^{13}\text{C}$  NMR-spektrum af licochalcon A: De to signaler ved 27,5 ppm og 205 ppm hidrører fra opløsningsmidlet (deuteroacetone). Signalet ved 0,0 ppm er en reference. Ved fortolkning af dette spektrum anvendes primært tabelværker, der viser den typiske beliggenhed for forskellige typer carbon.

Fig. 3.18

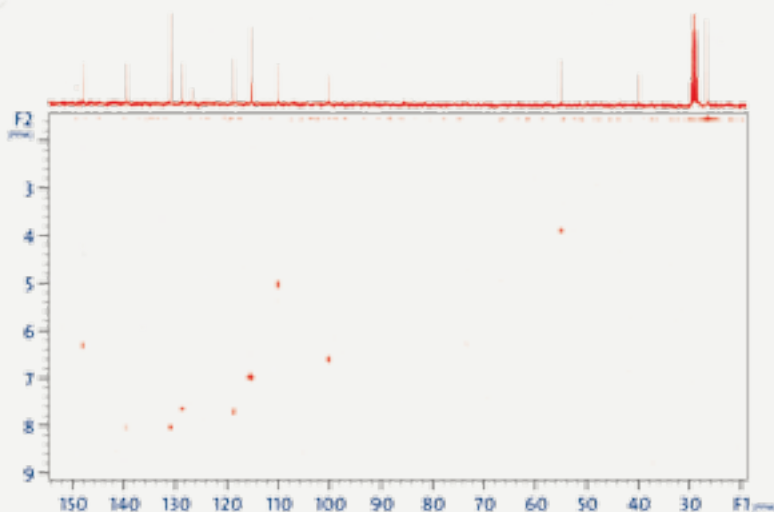
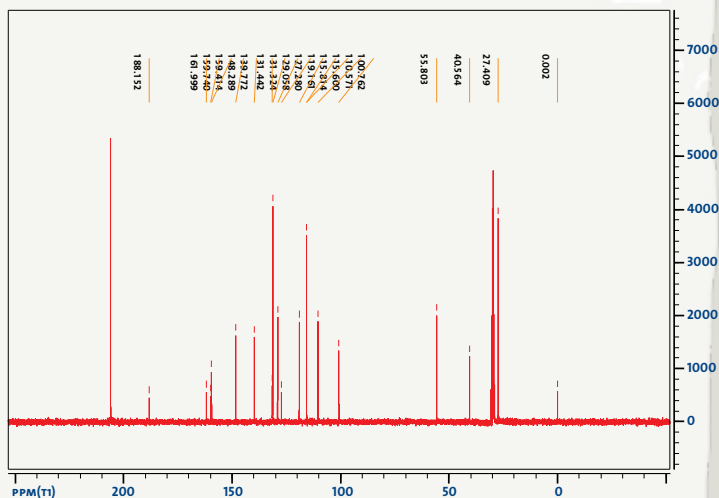


Fig. 3.19

Dog kan tolkningen hjælpes ved at optegne et HSQC-spektrum (heteronuclear single-quantum correlation). Her i dette spektrum ligger  $^1\text{H}$  NMR-spektret langs Y-aksen og  $^{13}\text{C}$  NMR-spektret langs X-aksen. Ved at gå ind fra et signal i  $^1\text{H}$  NMR-spektret parallelt med X-aksen kommer man ind til en top, der ligger lodret under et signal i  $^{13}\text{C}$  NMR-spektret. Det kan nu konkluderes, at den proton, der giver anledning til signalet i  $^1\text{H}$  NMR-spektret, sidder på det carbon, der giver anledning til signalet i  $^{13}\text{C}$  NMR-spektret. HSQC-spektroskopi giver således mulighed for at korrelere, at fastlægge, hvilke protoner, der er bundet til et carbon. Tilsvarende er det ved hjælp af HMBC-spektre (heteronuclear multiple-bond correlation) muligt at korrelere protoner til de carbonkerner, der sidder 2 til 3 bindinger væk fra protonen.

Fig. 3.20

| KERNE                  | $\delta$ I PPM | KOBLING I HZ     | KERNE              | $\delta$ I PPM |
|------------------------|----------------|------------------|--------------------|----------------|
|                        |                |                  | C1                 | 131,4          |
| H2, H6                 | 8,02           | KOMPLEKST        | C2, C6             | 131,3          |
| H3, H5                 | 6,96           | KOMPLEKST        | C3, C5             | 115,8          |
|                        |                |                  | C4                 | 162,0          |
|                        |                |                  | C=O                | 188,2          |
| H $\alpha$             | 7,70           | d, 15,6          | C $\alpha$         | 119,7          |
| H $\beta$              | 8,04           | d, 15,6          | C $\beta$          | 139,8          |
|                        |                |                  | C1'                | 115,6          |
|                        |                |                  | C2'                | 159,4          |
| H3'                    | 6,59           | s                | C3'                | 100,8          |
|                        |                |                  | C4'                | 159,8          |
|                        |                |                  | C5'                | 127,3          |
| H6'                    | 7,64           | s                | C6'                | 129,1          |
|                        |                |                  | C1''               | 40,6           |
| H2''                   | 6,30           | dd, 10,8 og 17,7 | C2''               | 148,3          |
| H3''                   | 4,98           | dd, 10,8 og 1,5  | C3''               | 110,6          |
|                        | 5,01           | dd, 17,7 og 1,5  |                    |                |
| (CH <sub>3</sub> )C1'' | 1,51           | s                | (CH <sub>3</sub> ) | 27,4           |
| CH <sub>3</sub> O      | 3,87           | s                | CH <sub>3</sub> O  | 55,8           |

Tilordning af signalerne i  $^1\text{H}$  NMR- og  $^{13}\text{C}$  NMR-spektrene af licochalcon A: Signalerne for de kvartærne carbonatomer (ikke H-bærende carbon) er tilordnet under anvendelse af HMBC-spektre. (s betyder singlet, d doublet, dd dobbelt doublet).

## Chalcon-syntese

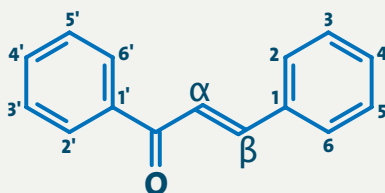


Fig. 3.21: Carbonskelettet i chalconer.

Chalconer er organiske forbindelser, der indeholder carbonskelettet 1,3-diphenylprop-2-en-1-on (se fig. 3.21). Chalconer findes i adskillige planter. De naturligt forekommende chalconer dannes i planten med oxygenholdige substituer i 2', 4', 6', 3 og 4 stillingen, men der kendes adskillige eksempler på, at chalconen efterfølgende omdannes, så den får et andet substitutionsmønster. Licochalcon A er en såkaldt retrochalcon, hvor de oxygenholdige substituer findes i 4', 2' og 4-stillingen (se fig. 3.13). Mange chalconer er stærkt gule og bidrager hermed til at give planter farve. Sammenlignet med andre naturstoffer er chalconer simple forbindelser.

Mange chalconer lader sig syntetisere ved en Claisen-Schmidt-reaktion, der er en af mange forskellige typer aldolkondensationer.

Ved en aldolkondensation udnyttes, at en carbonylgruppe vil være stærkt polariseret på grund af den store forskel i elektronegativiteten af carbon og oxygen. Der vil derfor være en partiel negativ ladning på oxygen og en partiel positiv ladning på carbon:

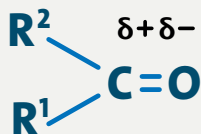


Fig. 3.22

Såfremt carbonylforbindelsen har hydrogen ved et  $\alpha$ -carbon (et carbon bundet til carbonylgruppen), vil dette være aktiveret. Ved tilsætning af stærk base kan det aktiverede  $\alpha$ -hydrogen fraspalte en proton. Den anion, der dannes ved fraspaltning af et protonen, kan opskrives ved to resonansformer (1) og (2):

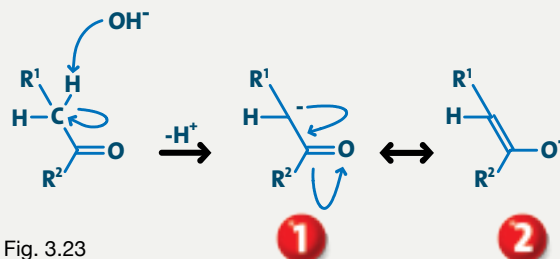
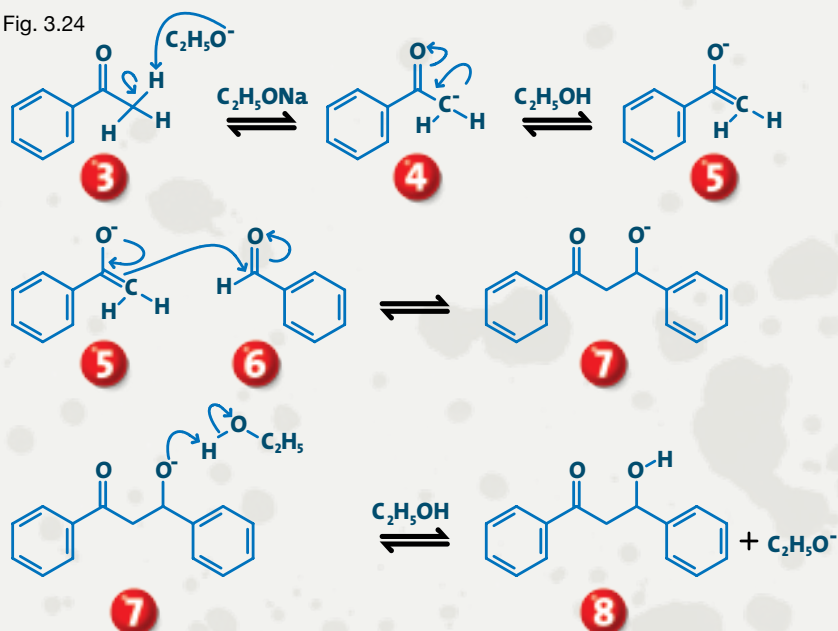


Fig. 3.23

Den dannede anion (2) betegnes en enolation. I resonansformel (1) har carbon en negativ ladning. Generelt er ketoner og aldehyder så svage syrer, at  $\alpha$ -hydrogen kun fraspaltes i meget ringe grad.

I tilstedeværelse af base vil der kunne ske en reaktion mellem  $\alpha$ -carbon i en carbonylforbindelse med  $\alpha$ -hydrogen og carbonylcarbon i en anden carbonylforbindelse. Nedenfor er denne reaktion beskrevet under anvendelse af acetophenon (3) og benzaldehyd (6) som eksempel:

Fig. 3.24



Ved den indledende reaktion får acetophenon (3) en negativ ladning, ved at et  $\alpha$ -hydrogen fjernes med stærk base. I næste reaktionstrin angriber det negativt ladede  $\alpha$ -carbon i (4), der er en resonansform af (5), ved carbonylcarbon i benzaldehydet (6). Der dannes et alkoholat (7), som er en stærk base. Det dannede alkoholat bliver neutraliseret ved reaktion med opløsningsmidlet (i eksemplet ethanol), der reagerer som syre. Herved dannes en  $\beta$ -hydroxyketon (8). En  $\beta$ -hydroxyketon har, som andre ketoner, aktiverede  $\alpha$ -hydrogenatomer, der vil kunne fraspaltes med base. Den dannede anion (9) vil kunne fraspalte en hydroxidion og herved omdannes til en  $\alpha,\beta$ -umættet keton, der i det valgte eksempel vil være chalcon (10):

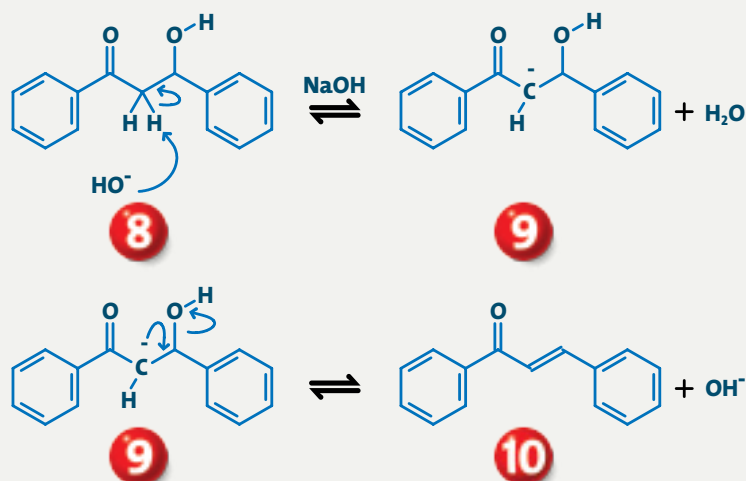


Fig. 3.25

Claisen-Schmidt-reaktionen forløber generelt i godt udbytte, når acetophenon og benzaldehyd bringes til at reagere med hinanden. Reaktionen er en ligevægtsreaktion, men da den dannede chalcon (10) krystalliserer ud, efterhånden som den dannes, vil ligevægten forskydes til fordel for chalconen. I princippet kan der dannes både en *cis*- og en *trans*forbindelse, men i praksis observeres kun *trans*produktet. Under anvendelse af passende substituerede acetophenoner og benzaldehyder kan et stort antal chalconer fremstilles ved denne procedure.

I praksis kan reaktionen bringes til at forløbe ved at opløse 10 mmol af et passende substitueret benzaldehyd og 10 mmol af en passende substitueret acetophenon i 50 ml ethanol. Efter tilsætning af en opløsning af 1 g natriumhydroxid i 50 ml ethanol hensættes blandingen ved stuetemperatur. Efter kort tid ses en gulfarvning af reaktionsblandingen, og efter yderligere henstand fremkommer et gulligt bundfald af chalconen. Den dannede chalcon kan frafiltreres og omkrystalliseres af ethanol. Reaktionen forløber generelt i mere end 95% udbytte og giver som oftest et produkt af en meget høj renhed. Der opnås i reglen

dårligt udbytte, hvis det anvendte benzaldehyd eller den anvendte acetophenon er substitueret med frie hydroxygrupper. Reaktionen forløb kan følges ved tyndtlagschromatografi, TLC. Som stationær fase anvendes almindelig kiselgel (Mercks færdigplader 5549 Kiselgel 60F) og som løbevæske en blanding af toluen og ethylacetat. Man kan fx starte med forholdet toluen-ethylacetat 9:1. Hvis stofferne løber meget langsomt med denne eluent, tilsættes mere ethylacetat, fx ændres forholdet til 4:1. Hvis stofferne løber meget hurtigt i toluen-ethylacetat 9:1, gøres forholdet større fx 19:1. Pletterne kan visualiseres ved at se på pladen under UV-lys eller ved at dyppe pladen i en basisk opløsning af kaliumpermanganat. (Der fremstilles en 1% opløsning af kaliumpermanganat i vand og en 5% opløsning af natriumcarbonat i vand. Umiddelbart før brug blandes lige dele af de to opløsninger. En basisk opløsning af permanganat er ikke stabil i længere tid, hvorfor de to opløsninger blandes lige før brug.) Pletterne vil fremkomme som gule pletter på lilla baggrund. Pladerne aftegnes straks, da farverne forsvinder efter nogen tid.



# Mulige nye våben i kampen mod malaria



Indsatsen inden for malariaforskningen handler i høj grad om at udvikle en vaccine, men det er en meget kompliceret opgave, og det er endnu ikke lykkedes. En af hindringerne er, at parasitten undervejs i sin livscyklus lever i tre forskellige miljøer – i myggen, i menneskets lever og i menneskets blodbane hhv. plasma og blodlegemer – og at den opfører sig vidt forskelligt i de forskellige stadier. Livsstadierne er så forskellige, at forskerne ikke forventer at kunne udvikle en medicin eller en vaccine, der kan virke på dem alle.

Kortlægningen af malariaparasittens og malariamyg-gens genomer har givet håb om nye våben. På den ene side at udvikle nye lægemidler, der effektivt kan bekæmpe parasitten og på den anden side at manipulere myggens gener, så den ikke kan sprede sygdommen.

## Udvikling af vaccine - passivisering af malaria-parasitten

Der arbejdes med tre hovedtyper af vacciner:

- Transmission-blokerende vaccine, der skal forhindre parasitten i at udvikle sig inde i myggen.
- Anti-sporozoit-vaccine, der skal forhindre parasitten i at trænge ind i en levercelle.
- Anti-blodstadie-vaccine, der bliver designet til at mildne sygdomsforløbet ved malaria og nedsætte dødeligheden blandt børn.



Det er den sidst nævnte type, der er mest fokus på i forhold til udvikling af en medicin eller vaccine, der kan gøre en forskel på det afrikanske kontinent og de øvrige malaria-udsatte områder. Der er nemlig stor risiko for, at anti-sporozoit- og transmission-blokerende vacciner ikke kan være 100 procent effektive, og fuldstændig effekt er afgørende for at kunne bekæmpe malaria i områder, hvor mennesker dagligt

udsættes for stik fra malariamyg. Ved hvert stik fra en malariamyg sprøjtes omkring 100 sporozoit ind i menneskets blodbane, hvor det kun tager dem ca. 30 minutter at nå frem til leveren. Lykkes det bare én parasit at trænge ind i en levercelle i et menneske, eller lykkes det bare én parasit at udvikle sig inde i en myg, kan parasitten udvikle sig videre til næste stadium, som vaccinen ikke virker på. Derfor foretrækker mange forskere at bruge kræfterne på at udvikle en anti-blodstadie-vaccine, der i det mindste kan mildne sygdomsforløbet og nedsætte dødeligheden blandt børn.

Alle blodlegemer bliver filtreret igennem milten, og det er i dette organ, at gamle blodlegemer bliver destrueret. Milten kan også genkende parasitinficerede røde blodlegemer, og de vil ligeledes blive destrueret. For at undgå passage igennem milten udtrykker *P. falciparum* parasitten nogle proteiner på overfladen af det inficerede røde blodlegeme. Proteinerne gør, at blodlegemet bliver "hængende" i kapillærerne, og parasitterne kan formere sig videre til næste stadium – ukønnet formering til merozoitter eller kønnet formering til gametocytter.

Når immunforsvaret finder ud af, at der er tale om fremmede proteiner, danner det antistoffer, som forhindrer, at proteinerne kan klæbe blodlegemer fast til karvæggene. De forskere, der arbejder med at udvikle en anti-blodstadie vaccine, prøver at fremstille en vaccine, der dækker hele blodlegemet, og dermed forhindrer det i at klæbe til kapillærerne. Vaccinen skal altså ikke virke inde i blodcellerne men udenpå.

Andre forskere har andre vaccinemål. Det kan fx være at rejse antistoffer mod proteiner på overfladen af selve parasitten. I det tilfælde skal antistofferne forhindre, at parasitten kan trænge ind i et nyt blodlegeme.

Hvis det er første gang, et menneske bliver inficeret med *P. falciparum*, er der risiko for, at det tager

immunforsvaret for lang tid at opdage og agere på de fjendtlige proteiner. Overlever mennesket infektionen, er immunsystemets huskeceller beredte ved næste angreb, men så udtrykker parasitten blot en anden proteinvariant, som immunforsvaret ikke har set før. Immunforsvaret danner antistoffer også mod dette protein, og sådan kan kapløbet fortsætte op til mere end 50 gange, har det vist sig. Til sidst har parasitten ikke flere nye proteiner at diske op med, og efterfølgende malariainfektioner vil blive neutraliseret i milten. Det pågældende menneske har på dette stadium udviklet tilstrækkelig immunitet til at modstå, at parasitten klæber til blodårer i vigtige organer som hjerne og moderkage, og risikoen for at dø af sygdommen er kraftigt reduceret.

Den proteinfamilie, som *P. falciparum* udtrykker, blev identificeret i 1995, og familien af gener, der koder for proteinerne, blev døbt *var*. Efterhånden som parasittens genom er blevet sekventeret, har det vist sig, at hvert parasitgenom har omkring 50 *var*-gener, som skiftevis kan aktiveres.

I 2003 lykkedes det et dansk forskerhold at bestemme et *var*-gen, der kun bliver aktiveret i gravide kvinder, og dermed gør både hende og fostret særligt sårbar. Selvom en kvinde gennem gentagne malariainfektioner har udviklet immunitet, bliver hun sårbar ved en (førstegangs)graviditet, fordi malariaparasitten aktiverer et gen, som udelukkende udtrykker proteiner, der binder sig til vævsceller i moderkagen. Proteinerne blokerer blodgennemstrømningen i moderkagen, og parasitterne udvikler sig og inficerer flere og flere blodlegemer. Derved får fostret ikke de nødvendige næringsstoffer og ilt, og den gravide får typisk blod-

mangel og bliver svækket. Hun føder for tidligt, og den nyfødte har ringe chance for at overleve.

På baggrund af en anden vigtig opdagelse i 2003, nærer det danske forskerhold håb om, at det snart bliver muligt at udvikle en vaccine for gravide og små børn. Forskerne identificerede også et *var*-gen, der viste sig at være aktiveret hos børn med alvorlig malaria, men ikke hos voksne med malaria. Ydermere viste forskernes undersøgelser, at genet ikke varierer fra Øst- til Vestafrika, selvom parasitterne ellers har for vane ikke blot at mutere og variere, efterhånden som et menneskes immunforsvar lærer at genkende dem, men også varierer meget fra region til region.

Forskernes hypotese er, at når der findes et *var*-gen, som er identisk i mange malaria-parasitter, må det være, fordi det udtrykker et klæbeprotein, der binder særlig stærkt til kapillærerne, og derfor er et sikkert våben for parasitten, når den sætter ind over for et ikke-immunt barn. Proteinet synes med andre ord at være en ideel kandidat til en global vaccine for små børn.

Foreløbig har forskningen ikke afsløret andre *var*-gener eller klæbeproteiner, der er ens fra parasit til parasit og fra region til region, men det har vist sig, at flere små sekvenser går igen. Det antages, at netop de sekvenser er afgørende for proteinets struktur og funktion. Forskerne arbejder på at finde sekvenserne i proteinet, så de herefter kan undersøge effekten af antistoffer imod dem. Et bud på en fremtidig vaccine til blodstadieformerne af parasitten vil derfor kunne blive en vaccine, baseret på de få konserverede sekvenser i en ellers hypervariabel proteinfamilie.

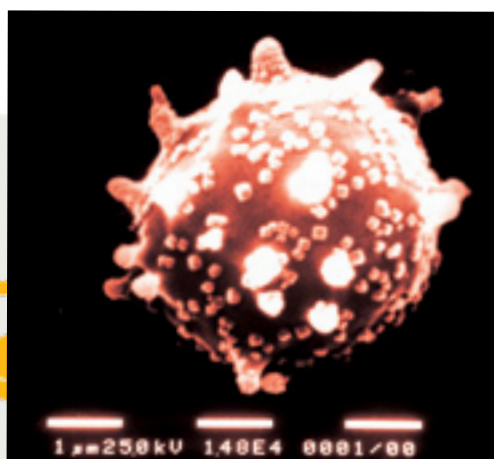
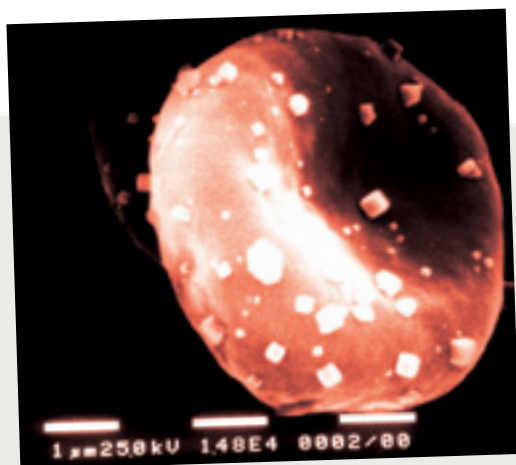


Fig. 3.26: Elektronmikroskopfotografier af til venstre et rødt blodlegeme uden klæbeproteiner og til højre et tilsvarende med klæbeproteiner.



# Parasittens og myggens genomer er kortlagt

Både malariaparasittens og malariamygges genomer blev kortlagt i 2002 og stillet gratis til rådighed for forskere i hele verden. Kendskabet til parasittens arveanlæg kan føre til nye lægemidler, mens myggens genom åbner mulighed for at udvikle transgene myg, som er ude af stand til at sprede sygdommen.

Vi kender nu samtlige arveanlæg i den mest dødbrin- gende malariaparasit, *P. falciparum*, og i den variant af malariamyggen, som spreder sygdommen i Afrika, *Anopheles gambiae*. Det kan give nye muligheder for at behandle malaria og formindske udbredelsen af den frygtede infektionssygdom.



Fig. 3.27: En malariamyg suger blod. Den afrikanske art af myg- gen, *A. gambiae*, stikker næsten udelukkende mennesker og har en særlig forkærlighed for sve- dige, ildelugtende fødder.

## Parasitten - nye mål for lægemidler

Kendskabet til malariaparasittens genom kan bruges til at opnå en dybere forståelse af parasittens biologi og dens samspil mellem værterne; mennesker og ma- lariamyg.

Parasittens genom indeholder omkring 5300 gener, og funktionen af 60 procent af generne er endnu ukendt. Flere internationale forskergrupper bruger nu DNA-chips til at analysere hvilke gener, der er aktive på forskellige stadier af parasittens livscyklus. Når et gen aktiveres, danner genet en enkeltstrenget kopi af sig selv, mRNA, som indeholder opskriften på et

protein. Med DNA-chips kan man måle, hvilke typer mRNA der dannes i de forskellige stadier, som para- sitten gennemgår i menneskekroppen. På den måde kan man pejle sig ind på genernes funktion og ad den vej identificere nye mål for lægemidler.

Omkring 550 af malariaparasittens gener koder for et organel i parasitten – en apicoplast – som spiller ho- vedrollen i parasittens fedtstofskifte. Apicoplasten er en dyrisk udgave af planters og algers grønkorn, som bruges til at absorbere lys i fotosyntesen, og parasit- ten har sandsynligvis opsamlet organellet fra alger på et tidligt stadium i evolutionen. Apicoplasten er det eneste organel i parasitten, der er i stand til at pro- ducere fedtsyrer, som parasitten bruger til at trænge ind gennem de fedtholdige cellemembraner i humane blodlegemer.

Apicoplasten er et interessant mål for lægemidler, dels fordi det er livsnødvendigt for parasitten, dels fordi organellet dannes ud fra oprindelige plantegener, som ikke findes i det humane genom. Medicin, der er rettet mod apicoplasten, vil derfor næppe påvirke den menneskelige organisme og næppe medføre bivirk- ninger. Samtidig med, at genomet blev offentliggjort, kortlagde en amerikansk forskergruppe processerne bag fedtstofskiftet i og omkring apicoplasten. Læge-

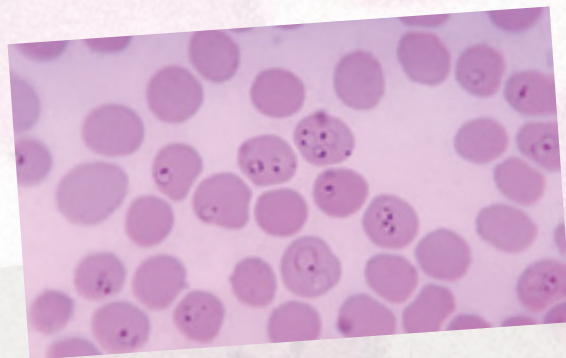


Fig. 3.28: Inficerede røde blodlegemer. De små cirkler inde i blodlegemerne er malariparasitter, mens de mørke plet- ter er parasittens hæmozoin.



midler, som stikker en kæp i hjulet på parasittens syntese af fedtsyrer, vil sandsynligvis være effektive til at bekæmpe parasitten.

Kendskabet til parasittens genom skaber også bedre mulighed for at opklare, hvordan malariaparasitten udvikler resistens mod medicin. Her bruges DNA-chips til at undersøge forskelle og ændringer i parasittens genom – polymorfismer – gennem studier af forskellige stammer af parasitter. Resistensudvikling bygger på genetisk variation.

### Kan transgene myg neutralisere parasitten?

Malaria myggenes genom indeholder omkring 14.000 gener. Kendskabet til genomet åbner bl.a. nye muligheder for at manipulere med myggens gener, så den ikke længere vil være i stand til at fungere som vært for malariaparasitten. Hvis det lykkes at udvikle konkurrencedygtige transgene myg og introducere dem i store antal i de naturlige populationer, kan sygdommens udbredelse muligvis formindskes dramatisk. De første skridt på vejen er taget.

Når en myg suger blod fra et inficeret menneske, trænger parasitterne gennem tarmvæggen, og på ydersiden af tarmvæggen danner parasitten en oocyt, som indeholder tusind af sporozoitte. Oocytten binder sig til receptorproteiner på epithelcellerne på tarmvæggenes yderside (se fig. 3.3).

I 2002 fandt amerikanske og tyske forskere et peptid, SM1, som binder sig til de samme receptorer som oocytten. Hvis man injicerer peptidet i myg eller lader myggene suge blod, som indeholder peptidet, kan parasitten ikke formere sig i myggen. Årsagen er sandsynligvis, at peptidet blokerer de receptorer på tarmvæggen, som oocytten binder sig til.

Forskergruppen har ved gensplejsning fremstillet myg med det gen, som koder for SM1-peptidet, plus et gen, der sørger for, at SM1 udtrykkes i tarmvæggen. De to gener er stabilt indsat i myggens arveanlæg og videreføres gennem generationerne.

En serie eksperimenter, hvor myg sugede blod fra inficerede mus, viste, at antallet af transgene myg med

oocytter var 47 procent lavere end i en kontrolgruppe af almindelige malariamyg. I de transgene myg, som indeholdt oocytter, var antallet af oocytter 80 procent mindre end i kontrolgruppen.

Ved udsættelse af transgene malariamyg i naturen er det tanken at koble de nye gener til et transposon; en DNA-sekvens, som også kaldes et hoppende gen. Når et transposon introduceres i en population af insekter, spredes transposonet ofte hurtigt i populationen, når myggene formerer sig.

### Perspektiver og risici

At lukke store mængder transgene insekter ud i naturen er aldrig prøvet før, og muligheden rejser adskillige spørgsmål:

- Kan myg, som er fremavlet i laboratoriet, konkurrere med vilde myg, eller vil de uddø, inden de nye genetiske egenskaber bliver spredt i den naturlige population?
- Vil beskyttelsen være total, hvis man stikkes af transgene myg? Eller er der tale om falsk sikkerhed?
- Kan parasitten mutere, så den kan overleve i de transgene myg?
- Vil den genetiske ændring blive ved med at være stabil? Det er nødvendigt, hvis strategien skal lykkes. En midlertidig pause i overførslen af malariparasitter til mennesker kan blive katastrofal, fordi menneskers modstandsdygtighed over for malaria sandsynligvis vil blive svækket, så sygdommen bliver endnu mere alvorlig, når parasitten vender tilbage.

Den slags spørgsmål skal besvares, inden en storstilet udsættelse af transgene malariamyg kan komme på tale. En mulighed er at slippe myggene løs på isolerede øer og overvåge udviklingen nøje gennem en årrække. En kandidat er øen Sao Tomé, som ligger nær Ækvator ud for Afrikas vestkyst.

Hvis alt går godt, er perspektivet til at få øje på – et stik af en malariamyg vil blot medføre kløe, men ikke udgøre en fare for alvorlig sygdom.



# De mest udbredte lægemidler til forebyggelse af malaria

**Chloroquin:** Som nævnt det lægemiddel, der formentlig har reddet flest menneskeliv. Chloroquins virkemåde er ikke fuldt opklaret, men lige som i tilfældet quinin, menes stoffet at forhindre dannelsen af hæmozoin, som sikrer parasitten et ugiftigt miljø i blodlegemerne. Chloroquin hæmmer altså parasitternes udvikling i blodlegemerne.

Chloroquin er effektivt til forebyggelse og behandling af akutte malariaanfald forårsaget af *P. vivax*, *P. ovale* og *P. malariae*. Men i mange regioner har den farligste parasit *P. falciparum* udviklet resistens over for stoffet. Chloroquin anbefales derfor ikke til malariaforebyggelse i andre regioner end Mellemøsten og Mellemamerika.

**Paludrine:** Er handelsnavnet for et præparat, der er en kombination af chloroquin og stoffet proguanil, der hæmmer parasitternes kernerdeling. Påvirker alle plasmodierne i det stadie, hvor de invaderer de røde blodlegemer, og i tilfældet *P. falciparum* også allerede i det stadie, hvor de er i levercellerne. Så sent som midten af 1980'erne bestod den mest almindelige malariaforebyggelse i at anvende kombinationen af de to stoffer. Der er observeret tiltagende resistens over for Paludrine. Præparatet anbefales i områder, hvor der kun er rapporteret sporadisk resistens over for chloroquin.

**Lariam:** Er handelsnavnet for et præparat, der er baseret på stoffet meflochin. Det er ikke afklaret, hvordan stoffet angriber parasitterne, men det har vist sig effektivt til at bekæmpe dem i blodstadiet. Lariam anbefales i områder med stor risiko for smitte med *P. falciparum*, og hvor der er udviklet resistens over for chloroquin. Dvs. først og fremmest i tropisk Afrika og Sydøstasien. Der er observeret en række alvorlige bivirkninger ved Lariam. Anoreksi, kvalme, svimmelhed og træthed forekommer hos mere end halvdelen af brugerne. Endvidere er der en del brugere af Lariam, der har udviklet depression og har fået tendens til at hallucinere. Derfor går man i dag mere og mere over til det dyre alternativ Malarone.

**Malarone:** Er handelsnavnet for et kombinationspræparat, der er baseret på stofferne atovaquon og proguanil, og som virker på både blod- og leverstadier. Atovaquon hæmmer processerne i parasittens mitochondrier, og sidstnævnte hæmmer parasitternes kernerdeling. En Malarone-tablet koster mellem 25 og 30 kroner. Til sammenligning koster en Paludrine-tablet mellem 1 og 2 kroner.

