

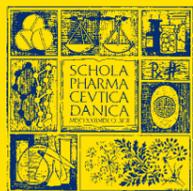
LÆGEMIDDELFORSKNING

2000

DANMARKS

FARMACEUTISKE

HØJSKOLE



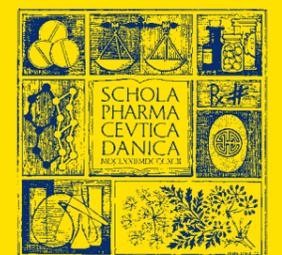
Lægemedelforskning
udgives af Danmarks Farmaceutiske Højskole

Redaktion:
Mette Rasmussen (ansvarshavende),
Jesper Munck, Rolf Haugaard og
Anne-Mette Nielsen

Grafisk design og produktion:
ProGrafica as

Fotos:
Jesper Munck og Kent Krog (forside)

Danmarks Farmaceutiske Højskole
Universitetsparken 2
2100 København Ø
Tlf · 35 30 60 00
Fax · 35 30 60 01
E-mail · dfh@dfh.dk
Internet · www.dfh.dk





Lic.pharm. Marianne Johansen er European Patent Attorney hos ALBIHNS Patentbyrå Malmö.

Ret til fri forskning - ret til fri patentering?

Med de nye patentregler, som trådte i kraft den 1. januar 2000, kan offentlige forskningsinstitutioner kræve retten til patenter, som ansatte opfindere tidligere selv havde retten til. Vi bør se positivt på loven, som vil medvirke til, at det frugtbare samarbejde mellem forskerne og erhvervslivet udbygges til gavn for samfundet.

Af Marianne Johansen

1. januar 2000 trådte en ny lov i kraft med betydning for alle, der er ansat ved offentlige forskningsinstitutioner; universiteter, sektorforskningsinstitutioner, offentlige sygehuse og sundhedsvidenskabelige forskningsinstitutioner under amterne. Loven er L 1999 347 om opfindelser ved offentlige forskningsinstitutioner, og den gælder naturligvis også for ansatte på Danmarks Farmaceutiske Højskole.

Formålet med loven er at sikre, at lovende forskningsresultater frembragt ved hjælp af offentlige midler kan blive nyttiggjort for det danske samfund gennem erhvervsmæssig udnyttelse. Før 1. januar 2000 var opfindelser gjort af det videnskabelige personale ved højere læreanstalter omfattet af Lov om arbejdstageres opfindelser, som gav opfinderne den fulde ret til deres opfindelser. Med den nye lov er dette ikke længere tilfældet.

Nu kan den offentlige arbejdsgiver kræve opfindelser overdraget til sig. Overdragelsespligten er dog begrænset til opfindelser, der er patenterbare i Danmark og frembringelser, der kan registreres som brugsmødel i henhold til reglerne herom. En brugsmødel er en rettighed, der minder om et patent. Løbetiden på 10 år er dog kun det halve af et patents løbetid på 20 år.

Blandet modtagelse

Den nye lov har – som forventet – fået en blandet modtagelse af det videnskabelige personale ved de offentlige forskningsinstitutioner. Indskrænkninger i de enkelte forskeres frihed til selv at bestemme, hvad de skal forske i, og i de enkelte forskeres frihed til selv at bestemme over, om de opnåede forskningsresultater skal igennem patenteringsmøllen for på den måde at give samfundet mulighed for at drage nytte af forskningsindsatsen, vil nok altid være genstand for almindelig sund skepsis, når der ikke er tale om frivillige ordninger.

På nuværende tidspunkt er de erfaringer, som er gjort med den nye lov om opfindelser ved offentlige forskningsinstitutioner, få. Loven har trods alt kun været i kraft i en begrænset periode, og inden lovens ikrafttræden havde alle ansatte mulighed for at bekendtgøre over for institutionen, hvilke opfindelser, de havde gjort inden skæringsdatoen.

Retten til sådanne indberettede opfindelser er forskernes egen i lighed med den lov, som gjaldt indtil 1. januar

2000. Mange forskere har benyttet sig af muligheden for at indberette allerede gjorte opfindelser, og derfor er det naturligt, at der går noget tid inden deres forskningsaktiviteter fører til nye patenterbare opfindelser. Rom blev som bekendt heller ikke bygget på en dag.

Ekspertise på institutionerne

Den nye lov kræver, at hver enkelt offentlig forskningsinstitution har eller kan skaffe ekspertise til at foretage de indledende vurderinger om en opfindelses patenterbarhed og kommercialiseringspotentialer. Og dette er ikke nogen let sag.

Erfaringsmæssigt – set med mange års erfaring fra IPR branchen (IPR = Intellectual Property Rights) – er det meget vanskeligt for ikke-IPR-kyndige personer og således også for forskere at forstå tolkningen i patentmæssig forstand af de patenterbarhedskriterer, som skal være opfyldt, for at en opfindelse er patenterbar.

Den største faldgrube er formodentlig, at patenterbarhedskriterierne udtrykkes med helt almindelige ord, som alle mennesker har en mening om betydningen af, og derfor glemmes det let, at der til hvert enkelt begreb dels ligger en definition og dels ligger fortolkninger fra retspraksis.

Men hvad er så et patent? Et patent er en tidsbegrænset forbudsret, der giver indehaveren ret til at forbyde andre erhvervsmæssigt at udnytte det produkt, den fremgangsmåde eller den anvendelse, som er defineret i patentkravene. Ved at få patent på en opfindelse opnås den beskyttelse via retssystemet, som anses for den stærkeste industrielle eneret.

Patentlovene i de enkelte lande har til formål at fremme den teknologiske udvikling i samfundet. For at opnå dette indgår samfundet en aftale med opfinderen eller opfinderne, der giver de pågældende ret til at få et tidsbegrænset monopol på deres opfindelse på normalt op til 20 år.

Modkravet er, at patenthaver offentliggør den teknologi, der er beskrevet i patentansøgningen. Denne offentliggørelse sker på et relativt tidligt tidspunkt i hele patenteringsforløbet, nemlig allerede 18 måneder efter at patentansøgningen er indleveret. Ved offentliggørelsen af patentansøgningen sikres det, at den teknologiske viden ikke hemmeligholdes og derfor kan udnyttes af andre, når patentrettigheden bortfalder. Konkurrenter får hermed også indblik i den nye teknik og kan anvende de nye erfindelser til endnu mere vidtrækkende fremskridt.

Intellectual Property Intellectual Capital

Fordomme mod patenter

Inden for mange teknologiske områder hersker der fordomme mod patentsystemet. Ofte hørte indvendinger er:

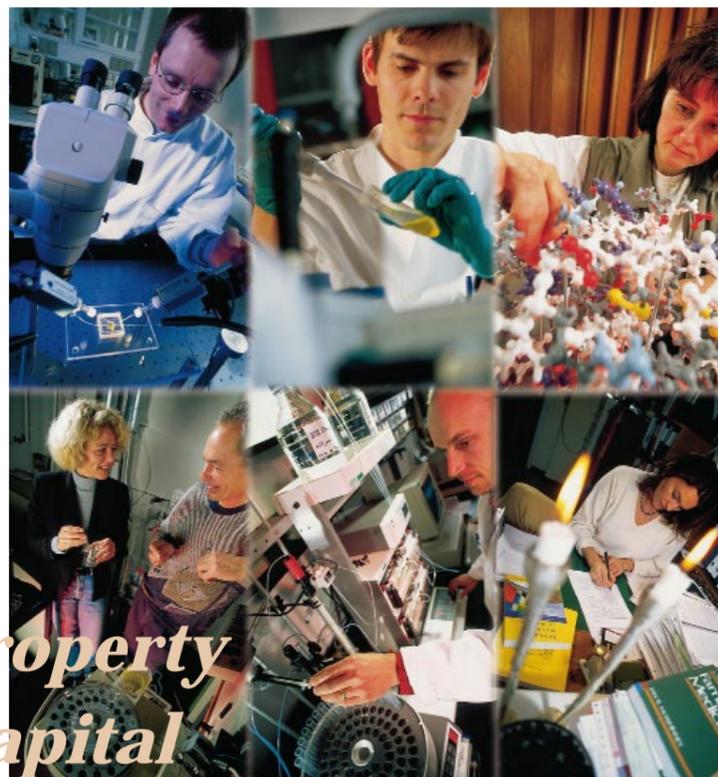
- det er unødvendigt – vi er teknologisk foran.
- det kan ikke betale sig, udviklingen går for hurtigt inden for dette felt.
- patenter er kun noget værd, hvis vi kan håndhæve dem i de enkelte lande, dvs. forfølge eventuelle krænkere.
- vores nye resultater er jo ikke noget særligt, blot en naturlig og nærliggende udvikling.
- patentering er for dyrt og uforståeligt.

Heldigvis er situationen inden for lægemiddelområdet den, at der ikke her hersker tvivl om patentsystemernes berettigelse, fordi de investeringer, der fortages i lægemiddeludvikling – både inden for udvikling af nye lægemiddelstoffer, nye formuleringer for allerede kendte lægemiddelstoffer, nye terapeutiske behandlingsprincipper og nye anvendelsesområder for kendte lægemidler – er så store, at udviklingsarbejdet kun er muligt, hvis der er en god sikkerhed for, at investeringerne kan betale sig på sigt.

Den eneste måde, dette kan ske på, er ved at have det patenterede område for sig selv. I forbindelse med fusioner og opkøb af virksomheder inden for lægemiddelområdet spiller de indgåede virksomheders patenter – samt løbetiden af patenterne – en meget stor rolle. Når det gælder mulighederne for at tiltrække ekstern finansiering til nystartede bioteknologiske og farmaceutiske virksomheder er det ligeledes vigtigt, at den tilgrundlæggende teknologi og de potentielle udviklingsmuligheder er patenteret.

Positiv vurdering

Alt i alt synes jeg, at vi skal se positivt på den nye lov om opfindelser ved offentlige forskningsinstitutioner, fordi et allerede frugtbart samarbejde mellem forskere og erhvervslivet kan udbygges yderligere, og fordi det herved gøres muligt aktivt at tilskynde og medvirke til, at patenterings- og kommercialiseringsmodne projekter føres videre.



Indhold

1. Ret til fri forskning - ret til fri patentering? Af Marianne Johansen	2-3
2. DNA-vacciner: Stort potentiale - store udfordringer Af Annette Vinther Heydenreich, Karin Bryder, Anders Fomsgaard og Lars Hovgaard	4-5
3. Moderne naturstoffkemi: effektiv analyse af naturens stofbiblioteker Dan Stærk, Else Lemmich, Henrik Franzky, John Lemmich, Søren Brøgger Christensen og Jerzy W. Jaroszewski	6-7
4. Korrekt dosering ved behandling af børns smerter Af Tina Hahn, Søren N. Rasmussen og Mette Rasmussen	8-9
5. På sporet af bivirkningen Af Jørgen Olsen, Inga Bjørnsdottir, Jette Tjørnelund og Steen Honoré Hansen	10-11
6. Kontrol af lægemidler for feberfremkaldende stoffer Af Lise Moesby, Lene Tommerup, Erik Wind Hansen og Jens Dencker Christensen	12-13
7. Ny lovende teknik til forstøvning af lægemidler Af Frederik J. Petersen, Henning G. Kristensen, Ole Wørtz og Torben Schæfer	14-15
8. Plastblødgøringsmidler og allergiske luftvejslidelser Af Søren Thor Larsen, Peter Thygesen og Gunnar Damgård Nielsen	16-17
9. Ind via mundslimhinden med svag strøm Af Jette Jacobsen og Margrethe Rømer Rassing	18-19
10. Ind gennem tarmcellerne via naturlige optagemekanismer Af Birger Brodin, Carsten Uhd Nielsen, Bente Steffansen og Sven Frøkjær	20-21
11. Membranforankring og peptidens terapeutiske effekt Af Tina Bjeldskov Pedersen, Sven Frøkjær, Ole G. Mouritsen og Kent Jørgensen	22-23
12. Ny nøgle til behandling af skizofreni? Af Bente Frølund, Uffe Kristiansen, Tine Bryan Stensbøl og Povl Krogsgaard-Larsen	24-25
13. Hjernens cannabis-lignende stoffer modvirker nervedød Af Henrik H. Hansen, Steen Honoré Hansen og Harald S. Hansen	26-27
14. Øget forståelse af vigtig receptor i hjernen Af Anders A. Jensen og Hans Bräuner Osborne	28-29
15. Design af lægemidler mod Alzheimers sygdom Af Stine Byskov Vogensen, Tine Bryan Stensbøl, Jan Egebjerg, Karla Frydenvang, Tommy Nørskov Johansen og Povl Krogsgaard-Larsen	30-31
16. Design af lægemidler mod neurodegenerative sygdomme Af Anders Hogner, Marie-Louise Lunn, Jette Sandholm Kastrup, Ingrid Kjølner Larsen, Tommy Liljefors og Jan Egebjerg	32-33
17. Fra ilden til asken med antidepressiv medicin Af Pia Knudsen, Ebba Holme Hansen og Janine Marie Morgall	34-35

DNA-vacciner: Stort potentiale - store udfordringer

Udvikling af nye og mere effektive vacciner har stor betydning for at forbedre folkesundheden i verden. Her kan DNA-vacciner beskytte mod sygdomme uden de traditionelle vacciners ulemper. Imidlertid er det svært at fremstille effektive DNA-vacciner; især når de skal indtages gennem munden. DFH tager udfordringen op.

Af Annette Vinther Heydenreich, Karin Bryder, Anders Fomsgaard og Lars Hovgaard

DNA-vacciner har stort potentiale, specielt når det gælder beskyttelse mod virus sygdomme som AIDS, herpes, influenza og hepatitis, hvor DNA-vaccinerne får kroppen til at efterligne det immunrespons, som opstår ved virusinfektioner.

Samtidig er DNA-vacciner yderst attraktive, fordi de ikke medfører nogen infektionsrisiko modsat traditionelle vacciner, der består af svækkede eller døde bakterier eller virus. Her er der altid en principiel risiko for, at svækkede mikroorganismer kan mutere til sygdomsfremkaldende former, eller at enkelte mikrober i død vaccine ikke er slået ihjel.

Et af de store mål på internationalt plan er at udvikle en

DNA-vaccine mod HIV, som er det virus der forårsager AIDS. Her vil man foretrække en vaccine, som indgives gennem munden eller via andre slimhinder i kroppen, således tilstedeværelsen af sundhedsfagligt personale ikke er nødvendigt. Desuden vil en immunisering af de relevante slimhinder forventes at producere et forsvar, som allerede ved optagelsen af virus kan bremse infektionen ved slimhinden. På den måde undgår man, at HIV angriber immunsystemet.

DNA-vacciner har også den fordel, at DNA er let og billigt at producere, hurtigt kan testes og er mere temperaturstabil end almindelige vacciner. I fremtiden kan man forestille sig samtidig vaccination for flere sygdomme på grund af muligheden for at indsætte gener fra en vifte af mikroorganismer i DNA-vaccinen. På den måde vil immunforsvaret blive sat i alarmberedskab over for flere typer infektioner på én gang.

Princippet i DNA-vacciner

DNA-vacciner er baseret på gener, der danner et overfladeprotein fra den mikroorganisme, som man ønsker beskyttelse imod, f.eks. en virus. Vaccinen fremstilles ved at indsætte genet for det ønskede virusprotein i et plasmid, som er et lille

ringformet stykke DNA. Efter vaccinationen udtrykkes genet i celler i lymfesystemet, hvorved cellerne danner virusproteinet på deres overflader. Proteinet sætter nu immunforsvaret i alarmberedskab overfor den pågældende virus på samme måde, som en almindelig vaccine gør det. Immunsystemet genkender det producerede virusprotein som fremmed, hvorved et beskyttende immunrespons iværksættes.

Immunforsvaret reagerer på to måder efter en DNA-vaccination. For det første dannes der antistoffer, som neutraliserer virusproteinet og som senere vil gøre det samme, hvis personen skulle blive smittet med det pågældende virus. For det andet medfører DNA-vaccinationen, at der produceres T-celler, som dræber de inficerede celler. T-celler dannes sjældent ved brug af konventionelle vacciner, men de antages at være essentielle for at skabe en immunisering mod virus som HIV samt ved fremstilling af kræftvacciner.

Selvom det er over ti år siden, at princippet bag DNA-vacciner blev beskrevet og fundet værdifuldt, er der endnu ikke markedsført vacciner af denne type. Det skyldes især, at det er vanskeligt at udvælge de overfladeproteiner fra virus og bakterier, som DNA-vaccinen skal danne, samt at DNA kun i meget ringe grad optages i kroppens celler.

For at opnå en tilstrækkelig optagelse i cellerne må man enten skyde DNA direkte ind i cellerne eller maskere DNA-vaccinen. Hertil benyttes tomme virus, polymerer eller liposomer, som er kugleformede sække af fedtstoffer. Endelig giver DNA-vacciner som andre genteknologiske lægemidler anledning til etiske overvejelser, da de principielt set kan blive integreret i arveanlæggene. Ingen af de hidtidige studier har imidlertid vist, at dette sker i praksis.

Svær formulering

Selvom adskillige kliniske studier har vist beskyttende immunitet ved DNA-vaccination, er optagelsen af plasmider i cellerne ineffektiv, og det samme gælder cellernes produktion af de proteiner fra virus eller bakterier, som DNA-vaccinen indeholder opskriften på. Det er ofte nødvendigt at anvende store mængder plasmid, selvom det er tilstrækkeligt, at bare 100-1000 celler præsenterer de artsfremmede proteiner på deres overflade.

Den lave optagelse i cellerne skyldes især DNA-molekylets fysiske og kemiske egenskaber. Molekylet er stort og har derfor svært ved at passere cellemembranen, og samtidig er molekylet vandopløseligt, hvilket ligeledes vanskeliggør passagen over de fedtholdige cellemembraner. Desuden nedbrydes DNA-vaccinen af enzymer både i blodet og i cellerne, og endelig er det nødvendigt at få transporteret vaccinen hen til de celler i lymfesystemet, som præsenterer artsfremmede proteiner for immunforsvaret.

På trods af intens forskning er udvalget af anvendelige transportsystemer endnu begrænset. Til DNA-vaccination har

man hovedsagelig anvendt to metoder. Den første er injektioner i muskler eller under huden med nøgent DNA. Den anden er gen-pistoler, hvor DNA-vaccinen kobles til guldpartikler, som så skydes direkte ind i hudceller.

Ved normal cirkulation i kroppen kommer DNA-vaccinen ind i cellerne ved, at vaccinen under optagelsen omsluttet af små sække, som kaldes endosomer. Endosomerne smeltes sammen med andre sække, lysosomer, som har lav pH og indeholder store mængder enzymer, som nedbryder DNA. Derfor bør plasmiderne være beskyttede, så de forlader endosomerne i intakt stand, hvilket kan gøres ved at indpakke plasmiderne i fedtstoffer eller polymerer. Endelig skal plasmiderne være i stand til at trænge gennem kernemembranen. Først når DNA-vaccinen er kommet ind i cellekernen, aflæses opskriften på det artsfremmede protein, som derefter produceres af cellernes proteinfabrikker i cellevæsken.

Mulig oral DNA vaccine

Vanskelighederne bliver endnu større, når DNA-vaccinen skal indgives via munden. Her må man både beskytte vaccinen mod enzymatisk nedbrydning i mave-tarmkanalen og i blodet.

Vi arbejder på at udvikle et transportsystem baseret på faste fedtpartikler med en størrelse på 100-300 nanometer. Her kan DNA enten indkapsles i en lipidmatrix eller bindes på partiklernes overflade. Lipidernes faste form bevirker, at DNA-vaccinen frigives langsomt ved enten diffusion eller erosion, hvorved der både opnås en forlænget afgift og en beskyttelse af DNA-vaccinen.

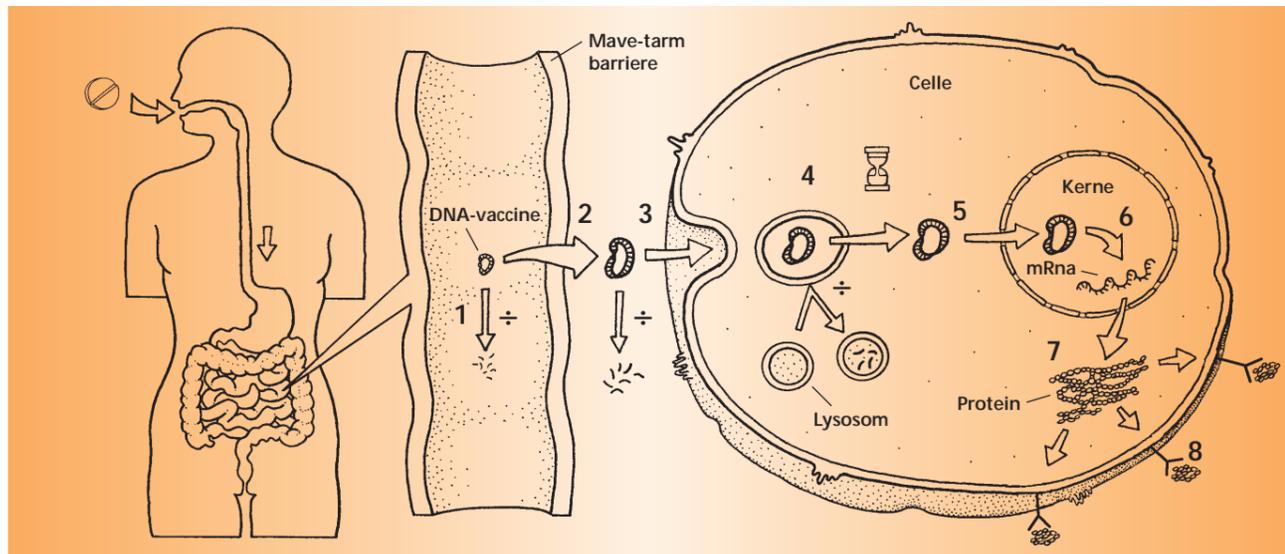
Lipidpartiklerne kan fremstilles af ugiftige stoffer. Ved at benytte positivt ladede komponenter kan partiklerne fremstilles med en positiv overfladeladning, således at de kan kompleksbinde det negativt ladede DNA, så vaccinen pakkes på overfladen. Vi ønsker imidlertid ikke ladningsneutralitet af kompleksene, men en positiv nettoladning, som øger partiklernes vekselvirkning med den negativt ladede cellemembran.

Forsøg med mus

Partikler af størrelser mellem 50 nanometer og 5 mikrometer kan passere tarmvæggen i begrænset omfang – jo mindre partikler, i jo højere grad passerer de væggen og optages i blodet. Dette sker primært i afgrænsede områder i tarmen, som direkte er forbundet med lymfesystemet. Ved potente lægemiddelstoffer som DNA-vacciner, der indgives i små mængder, vil denne optagelsesvej kunne anvendes.

Orale immuniseringsforsøg er igangsat på mus for at undersøge, i hvilket omfang antistoffer dannes i livmoder-slimhinden, endetarmen og blodbanen. Såfremt et positivt resultat opnås, vil T-celle produktionen mod HIV blive undersøgt. Det langsigtede mål er DNA-vacciner, der kan indgives i tablettform.

Projektet er støttet af bl.a. Centre for Drug Design and Transport.



Mange barrierer i kroppen skal passeres, og mange processer skal styres for at opnå en virksom DNA-vaccine, som kan indtages gennem munden:

1) Nedbrydning i mave-tarmkanalen skal undgås. 2) Vaccinen skal passere over tarmvæggen. 3) Derefter skal vaccinen optages af lymfesystemets antigen-præsenterende celler, som findes på den anden side af tarmvæggen, og her skal cellemembranen passeres. 4) Ved optagelsen i cellen pakkes plasmidet med DNA-vaccinen ind i endosomer; som under transporten gennem cellen smelter sammen med små sække kaldet lysosomer, der indeholder nedbrydende enzymer. Plasmidet skal frigives til cellevæsken, før det nedbrydes enzymatisk i lysosomerne. 5) Plasmidet bevæger sig hen til cellekernen, hvor det skal være i stand til at trænge ind gennem kernemembranen. 6) DNA-vaccinen aflæses i cellekernen. 7) Derpå produceres det protein fra en virus eller en bakterie, som vaccinen koder for. 8) Endelig skal det artsfremmede protein præsenteres på cellens overflade til genkendelse for immunsystemet. (Ill. Mette Langebæk)



Cand.pharm.
Annette Vinther
Heydenreich er
ph.d.-studerende ved
Institut for Farmaci.



Ph.d. Karin Bryder
er immunolog ved
Molekylærvirologisk
Laboratorium, Statens
Serum Institut.



Dr.med. Anders
Fomsgaard er
afdelingslæge ved
Molekylærvirologisk
Laboratorium,
Statens Serum Institut.



Ph.d. Lars Hovgaard
er lektor ved Institut
for Farmaci.

Moderne naturstofkemi: effektiv analyse af naturens stofbiblioteker

Den biologiske mangfoldighed, biodiversiteten, betyder en endnu større mangfoldighed af kemiske indholdsstoffer, en kemodiversitet. Moderne teknologi giver nye muligheder og fornyet interesse for naturens stofbiblioteker i udviklingen af lægemidler.

Dan Stærk, Else Lemmich, Henrik Franzky, John Lemmich, Søren Brøgger Christensen og Jerzy W. Jaroszewski

At naturen er en rig kilde til lægemidler er der mange velkendte eksempler på: morfin fra opiumvalmuen, kinin fra kinabark, de hjertevirksomme digitalisglykosider fra fingerbølplanten og penicillin fra penicilliumsvampen. Mindre kendte er nok nyere tilføjelser til listen over naturstoffer, som har dannet basis for stærkt efterspurgt medicin: taxol fra takstræet, der bruges til behandling af kræft, artemisinin fra en kinesisk malurt, som anvendes i malaribehandling, samt mevastatin fra mikroorganismer, som bruges ved hjertesygdomme.

For at rationalisere afprøvningen af syntetiske stoffer for deres potentiale som lægemidler, har man gennem de sidste 10-15 år produceret såkaldte kombinatoriske biblioteker, det vil sige samlinger af beslægtede stoffer. Overfor denne, syntetisk skabte, kemiske mangfoldighed står naturens mangfoldighed, skabt ved evolution gennem 4 milliarder år, som langt overgår, hvad kemikere har fantasi og praktiske muligheder for at skabe. Problemet har hidtil været at få adgang til naturens store stofbibliotek uden alt for store praktiske vanskeligheder og økonomiske omkostninger.

Der er i øjeblikket en stærkt stigende interesse for naturstoffer som lægemidler, fordi den teknologiske udvikling nu giver mulighed for at udnytte de naturlige stofbiblioteker hurtigere. Udtrykket dereplikation anvendes om processen, som fører frem til en kemisk og biologisk karakterisering af bestanddele i en kompleks stofblanding; f.eks. en plan-teeekstrakt.

Udtrykket dereplikation anvendes om processen, som fører frem til en kemisk og biologisk karakterisering af bestanddele i en kompleks stofblanding; f.eks. en plan-teeekstrakt.

Eksempler på ledestrukturer, som undersøges i gruppen.

Inspiration fra naturstofferne

Trods fremskridt inden for moderne sygdomsbehandling er der stadig områder, hvor der er behov for nye lægemidler og for en øget forskningsindsats. Dette gælder for eksempel infektionssygdomme, hvor mikroorganismers og parasiters udvikling af modstandsdygtighed over for de anvendte lægemidler i stigende grad vanskeliggør behandlingen af både mikrobielle og parasitære infektioner verden over.

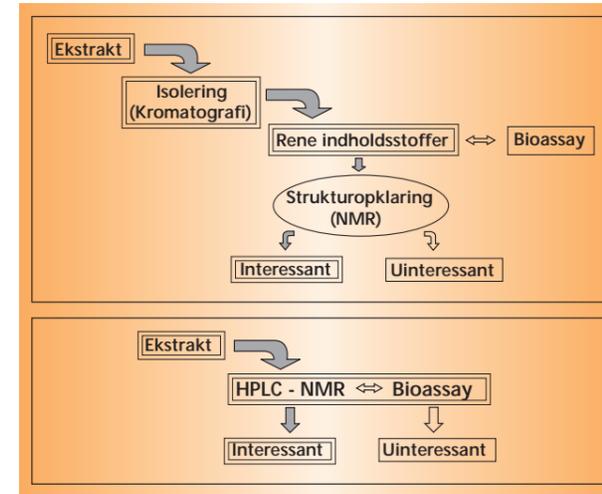
Lægemidlerne fremprovokerer en biokemisk tilpasning af mikroorganismene, så de kan tåle medicinen. Derfor er der til stadighed behov for nye ideer til mulige lægemidler, såkaldte ledestrukturer. En ny ledestruktur er et molekyle, som har en ny kemisk opbygning og også ofte en ny virkningsmekanisme. Ud fra en ledestruktur forsøger man at syntetisere forbedrede varianter. I søgen efter nye ledestrukturer kan man udnytte naturens kemiske mangfoldighed og underkaste naturstofbibliotekerne en farmakologisk testning.

Ved den traditionelle naturstofkemiske fremgangsmåde i arbejdet med biologisk aktive ekstrakter bliver størstedelen af tiden brugt til isolering og renfremstilling af det aktive stof, efterfulgt af kemisk karakterisering, som har til formål at fastlægge den kemiske struktur. Først derefter kan en farmakologisk karakterisering påbegyndes. Fremgangsmåden er ikke optimal på grund af den lange arbejdsproces, hvor isolering og oprensning varer adskillige måneder, før man kan begynde de farmakologiske undersøgelser, der skal vise, om der er tale om et lovende stof. Processen kan tidsmæssigt ikke konkurrere med en hurtig farmakologisk screening af allerede eksisterende samlinger af stoffer med kendt kemisk struktur eller med design og fremstilling af et syntetisk stofbibliotek. Sidstnævnte fremgangsmåder praktiseres i dag bredt i den farmaceutiske industri.

Moderne arbejdsprocesser

I nutidig videnskab sker der ofte en sammensmeltning af vidensdiscipliner og teknologier, der tidligere har været adskilt. Et eksempel herpå er en sammenkobling af en effektiv separationsproces, som væsekromatografi (HPLC), med en slagkraftig metode til strukturopløsning som kernemagnetisk resonansspektroskopi (NMR). HPLC er en kromatografisk separationsmetode, der karakteriseres ved stor separationsevne og hastighed. NMR-spektroskopi er i dag den bedste teknik til strukturbestemmelse af organiske stoffer, og dette område har der i mange år været satset stærkt på i den naturstofkemiske gruppe ved DFH.

Ved kombination af HPLC-separation og NMR-karakterisering i én arbejdsproces vil man opnå en hurtig metode til karakterisering af stoffer i en kompleks blanding, altså en dereplikation. En frugtbar kombination af HPLC og NMR kræver imidlertid, at en række teknologiske problemer bliver løst. De vigtigste krav er, at NMR-delen udviser tilstrækkelig



Øverst: Traditionel søgen efter ledestrukturer fra naturstofkemiske biblioteker.

Nederst: Fremgangsmåde der kombinerer separation med kemisk og biologisk karakterisering af en ekstrakt.

høj følsomhed, hvilket har kunnet opnås i de seneste år ved anvendelse af magneter med høj feltstyrke. Der ses nu en begyndende udvikling inden for HPLC-NMR, som er særdeles velegnet til "on-line" kemisk karakterisering af komponenterne i et naturstofbibliotek.

Kombineres dette med en indledende biologisk karakterisering i et panel af automatiserede tests, får man samtidig en hurtig undersøgelse af flere farmakologiske egenskaber. Kun de stoffer, der udviser interessante kemiske og farmakologiske karakteristika isoleres og oprenses præparativt. Hovedgevinsten er, at dereplikation af en ekstrakt nu kan gennemføres på dage eller uger, i stedet for flere måneder.

Nye ledestrukturer

Ved Danmarks Farmaceutiske Højskole er der en rig tradition for studier af farmakologisk aktive naturstoffer og derivater heraf. Identificering af et lovende naturstof efterfølges typisk af præklinisk farmakologisk karakterisering og medicinsk udvikling - en modificering af naturstoffet, som har til formål at forbedre dets farmakologiske egenskaber.

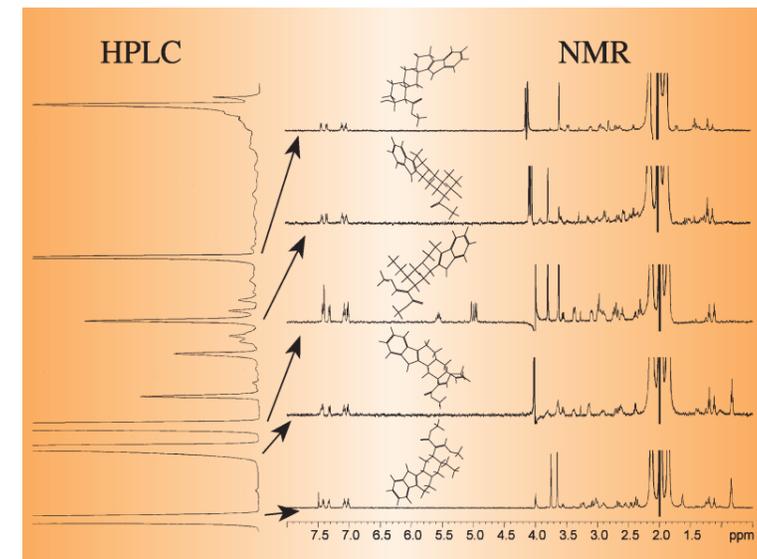
Denne forskning har resulteret i identificering af en række stoffer og stofgrupper, som undersøges med henblik på en mulig videreudvikling mod anvendelse som lægemidler. Første eksempel er peptid-konjugater af thapsigargin, et naturstof fra middelhavsplanten *Thapsia garganica*. Disse stoffer undersøges for deres evne til at fremkalde organselektiv celledød ved prostatakræft. Det andet eksempel er licochalcon A, et stof med antiparasitære virkninger, isoleret fra en kinesisk lakridsrod. Det tredje eksempel er analoger til philanthotoxin-433, et neurotoksin fra en egyptisk hveps, som muligvis kan bruges til at behandle neurodegenerative sygdomme i hjernen. Ved syntetisk at modificere strukturen af dette naturstof, hvilket bl.a.

er sket i samarbejde med Lundbeck A/S, er det lykkedes at opnå en langt større selektivitet og potens med hensyn til binding til det biologiske mål-molekyle, end det er tilfældet for det naturlige toksin. I alle tre eksempler er de opnåede resultater så interessante, at en patenteringsprocedure enten er gennemført eller indledt.

Også den seneste forskning i den naturstofkemiske gruppe har resulteret i opdagelsen af en række naturstoffer med potentiale som medicinsk ledestrukturer, især rettet mod malariparasitter. Disse naturstoffer underkastes i øjeblikket prækliniske undersøgelser.

Der har fundet en oprustning sted med hensyn til farmakologiske tests, således at gruppen nu i egne laboratorier har faciliteter til at teste stoffer og ekstrakter med virkning mod malariparasitter. Gruppen råder også over farmakologiske testmetoder baseret på både sensitive og resistente cancer-cellelinier og der arbejdes stadig på at udvide det tilgængelige testpanel.

Moderne bioteknologi samt kortlægningen af det humane genom skaber viden om nye terapeutiske angrebepunkter ved sygdomsbehandling. Den viden, kombineret med en rationel udnyttelse af naturstofkemiske biblioteker, giver stærkt forbedrede muligheder for en hurtigere udvikling af nye ledestrukturer på basis af naturens enorme kemodiversitet.



Dereplikation af indolalkaloider fra barken af det afrikanske træ *Corynanthe pachyceras*. NMR spektre optages "on-line" af de enkelte toppe i kromatogrammet.



Ph.d. Dan Stærk er adjunkt ved Institut for Medicinalkemi.



Cand.pharm. Else Lemmich er lektor ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Henrik Franzky er lektor ved Institut for Medicinalkemi.



Cand.pharm. John Lemmich er lektor ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Søren Brøgger Christensen er lektor ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Jerzy W. Jaroszewski er professor ved Institut for Medicinalkemi.

Korrekt dosering ved behandling af børns smerter

Paracetamol er et meget anvendt lægemiddel til behandling af smerter hos små børn efter operationer. En ny undersøgelse gør det muligt at give veldokumenterede anbefalinger om doser til de læger, som dagligt står overfor at skulle behandle smerter hos børn.

Af Tina Hahn, Søren N. Rasmussen og Mette Rasmussen

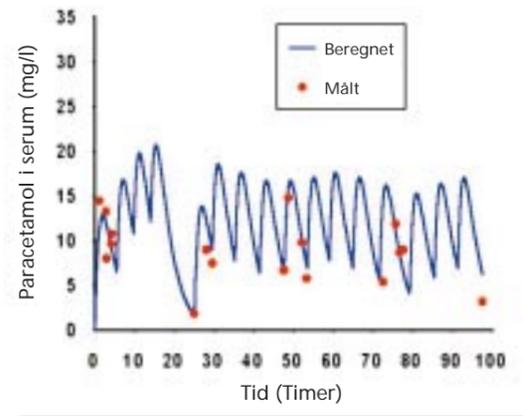
Mange spædbørn og småbørn gennemgår forholdsvis store operationer, som efterfølgende kan kræve smertebehandling i flere dage. Smerterne er ofte så stærke, at børnene må behandles med morfinlignende stoffer, opioider, som giver de fleste børn ubehagelige bivirkninger såsom kvalme, forstoppelse og vandladningsbesvær.

Derfor giver man normalt svagerevirkende smertestillende lægemidler som paracetamol sammen med opioider, hvilket gør det muligt at spare på opioiderne og skåne børnene for nogle bivirkninger.

Når smerter efter operationer skal lindres hos børn, er paracetamol den mest anvendte smertestillende medicin, enten som eneste lægemiddel eller i kombination med andre. Alligevel er det aldrig tidligere blevet undersøgt, om børn kan tåle at få paracetamol i en længere periode, selvom medicinen ofte anvendes i flere dage ad gangen.

Forskningen har hidtil kun fokuseret på, hvordan kroppen optager, fordeler, omsætter og nedbryder paracetamol efter indgift af én enkelt dosis. Det vides således ikke, hvor høje koncentrationer af paracetamol børnene når op på, når de får mere end en enkelt dosis.

Stikpiller er den oftest benyttede måde at give børn paracetamol på efter operationer, fordi mindre børn ofte ikke kan sluge tabletter, eller fordi kvalme besværliggør indgivelsen af lægemidler, der skal optages via mave-tarm kanalen. Endelig



Koncentration-tids-profil for et typisk barn. Det ses her, at den computergenererede model (—) og de aktuelt målte koncentrationer (•) stemmer fint overens. Paracetamol er her indgivet ca. hver 6. time, men efter ca. 20 timer er der sprunget en dosis over.

kan selve operationen, f.eks. operation for ganespalte, vanskeliggøre indtagelse af tabletter og mikstur.

I Danmark benytter man ikke intravenøs paracetamol, da det er forholdsvis dyrt og kræver, at barnet har et kateter liggende i en blodåre i mange dage.

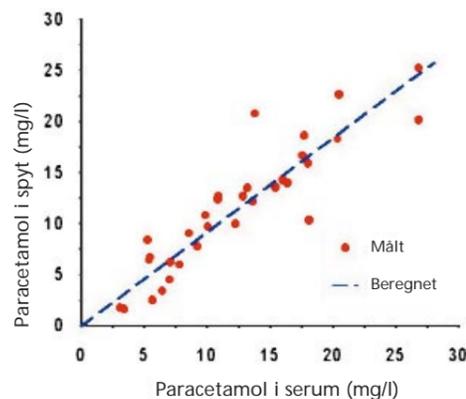
Gentagen indgift og bivirkninger

For de fleste lægemidler er der en god sammenhæng mellem den koncentration af lægemidlet, som opnås i kroppens forskellige væsker, og virkningen. Dog er der oftest tale om, at koncentrationen skal overstige en vis tærskelværdi, før at en effekt indtræder.

Nyere udenlandske undersøgelser har vist, at dette tærskelniveau for paracetamol formodentlig ligger omkring 10 mg/l i blodet hos børn, hvilket giver omkring halvdelen af børnene en tilfredsstillende smertelindring efter operationer.

For at nedsætte risikoen for bivirkninger er der i høj grad brug for undersøgelser, der belyser hvilke koncentrationer, som opnås ved gentagen indgift af stikpiller med paracetamol til børn. Især er det vigtigt at undersøge, om paracetamol ophobes i kroppen.

Paracetamol er et meget ufarligt og effektivt lægemiddel, når det anvendes med omtanke; dog er der veldokumenterede bivirkninger på leveren ved overdosering, hvilket selvfølgelig aktualiserer en undersøgelse af kroppens reaktioner, når stoffet gives til spædbørn og større børn i en længere periode.



Det er nu vist, at koncentrationen af paracetamol i spyt hos børn er den samme som i blodet. Det kan spare børn for de ubehageligheder, som er forbundet med udtagning af blodprøver: angst, smerte og infektionsrisiko.



Klinisk undersøgelse

Vi har for nyligt afsluttet en klinisk undersøgelse af 23 børn i alderen 9 uger til 11 år, der fik stikpiller med paracetamol fire gange i døgnet i op til fem døgn, svarende til 25 mg paracetamol pr. kilo kropsvægt hver sjette time.

Der er mange etiske krav til kliniske projekter, der inkluderer børn, men da paracetamol findes i samme koncentration i spyt og blod, skal der kun tages få blodprøver fra hvert barn for at få de fornødne informationer. I undersøgelsen kunne både blodprøver og spytpøver tages uden at volde børnene smerte. Samtidig var doseringen med paracetamol ikke væsentlig forskellig fra den almindelige dosering til børn. Undersøgelsen var godkendt af både Lægemiddelstyrelsen og den lokale videnskabetiske komité.

Efterfølgende blev alle oplysninger om dosis, doseringstidspunkt og målte koncentrationer af paracetamol i blod og spyt for hvert enkelt barn bearbejdet i et til formålet udarbejdet computerprogram. Programmet estimerer en matematisk model, som kan beskrive ændringer i lægemidlets koncentration i kroppen. Herved kan man udregne farmakokinetiske data, det vil sige data om kroppens evne til at absorbere, fordele, nedbryde og udskille paracetamol.

Ingen ophobning

Resultaterne viste, at børn er forholdsvis hurtige til at optage paracetamol fra stikpiller i sammenligning med voksne. Der kan være forskellige forklaringer på dette, men især de mere snævre forhold i børns endetarm betyder, at der opstår en tæt kontakt mellem selve stikpillerne og tarmvæggen. Jo større kontaktflade, der er mellem lægemidlet og blodkarrene i tarmvæggen, desto hurtigere absorption kan forventes.

Hvis man sammenligner med undersøgelser, hvor der kun er indgivet én dosis paracetamol til børn, afviger de farmakokinetiske parametre ikke nævneværdigt, selvom der gives flere på hinanden følgende doser. Koncentration-tidsprofiler for typiske børn viser nemlig, at der ingen ophobning var at spore selv efter flere dages behandling. Der indstiller sig nemlig en ligevægt mellem mængden af stof, der indgives, og mængden af stof, der udskilles, når lægemidler tages med fast interval.

Når der er etableret ligevægt mellem indgift og udskillelse, er det muligt at beregne en gennemsnitskoncentration for hver patient. Middelværdien i blodet var for disse børn 15,2 mg/l. Altså over den tærskelværdi på 10 mg/l, man formoder har smertestillende virkning.

Alternative nedbrydningsveje

Børn har et umodent enzymsystem med hensyn til nedbrydning af lægemidler, og de enzymsystemer, som nedbryder paracetamol hos voksne, er først fuldt udviklede i 12-års alderen. Men allerede ved fødslen er små børn i stand til at omdirigere paracetamol til nogle veludviklede alternative nedbrydningsveje.

Det er først nu vist, at børns alternative enzymsystemer har kapacitet nok til at nedbryde og udskille paracetamol, selvom det gives i flere dage med fast interval. Dette er vigtigt, for hvis nedbrydningen og udskillelsen ikke er tilstrækkelig effektiv, kan der dannes for store mængder af det levertoksiske stof NAPQI (N-acetyl-p-benzoquinonimin).

Normalt dannes NAPQI i meget små mængder ved nedbrydning af paracetamol og inaktiveres af aminosyren glutathion, hvorved stoffet mister sin giftighed. Glutathion skal tilføres kroppen via kosten og findes hos raske personer i rigelige mængder. Hos patienter i dårlig ernæringsmæssig tilstand kan glutathiondepoterne derimod være udtømte, hvorfor man her skal udvise særlig forsigtighed med dosering af paracetamol.

På baggrund af de resultater, der er opnået i projektet, har det været muligt at komme med en veldokumenteret dosisrekommendation til de læger, som hver dag står overfor at skulle ordinere smertelindrende behandling af længerevarende postoperative smerter hos børn.

Der er dog stadig god grund til at observere de enkelte børns reaktion på behandlingen, da børnene reagerer meget forskelligt på lægemidlet. Hos et atypisk barn steg koncentrationen af paracetamol for hver indgift, sandsynligvis fordi barnet var meget langsomt til at optage paracetamol fra stikpillerne, hvorfor der altså stadig var en stor del af en foregående dosis i kroppen, når en ny blev indgivet. De målte koncentrationer hos barnet var dog så forholdsvis lave, at der ikke var risiko for toksiske bivirkninger.

Undersøgelsen blev udført i samarbejde med overlæge Steen W. Henneberg, afdelingslæge Rolf Holm-Knudsen og afdelingslæge Kirsten Eriksen fra Børneanæstesi-afdelingen på Rigshospitalet samt Karina Marinheiro og Annette Poulsen, som var farmaceutstuderende på DFH.



Cand.pharm. Tina Hahn er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci.



Cand.pharm. Søren N. Rasmussen er lektor ved Institut for Farmakologi.



Ph.d. Mette Rasmussen er lektor ved Institut for Farmaci.

På sporet af bivirkningen

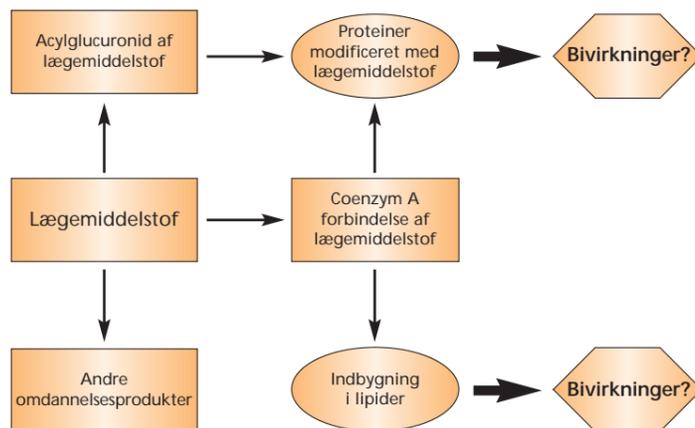
Nogle lægemiddelstoffer omdannes i kroppen til reaktive produkter, som reagerer med proteiner og andre biomolekyler, hvilket kan medføre bivirkninger. Derfor er det vigtigt at opnå større viden indenfor området. Målet er at kunne forudsige risikoen for bivirkninger ud fra lægemiddelstoffets struktur.

Af Jørgen Olsen, Inga Bjørnsdottir, Jette Tjørnelund og Steen Honoré Hansen

På indlægssedlerne i lægemiddelpakkerne findes der normalt et - ofte skræmmende langt - afsnit om mere eller mindre hyppigt forekommende bivirkninger. Typisk stammer vor viden om bivirkninger fra iagttagelser af lægemiddelbrugere, men ofte er vi ikke i stand til at kæde de ubehagelige gener sammen med molekylære processer i kroppen.

I mange tilfælde tilskrives bivirkninger selve lægemiddelstoffet, men de senere års forskning har vist, at bivirkningerne kan forvoldes af nedbrydningsprodukter af lægemidlerne. Især i leveren omdannes mange lægemidler i varierende grad. Omdannelsesprodukterne anses generelt for at være farmakologisk inaktive, og ofte bliver lægemidelmolekylet ændret på en måde, så udskillelsen fra kroppen øges.

Desværre er inaktivering ikke altid lig med uskadeliggørelse. Et af de mest velkendte eksempler på dette fænomen er det smertestillende lægemiddelstof paracetamol, der bl.a. findes i Pamol® og Panodil®. Ved overdosering kan leveren omdanne paracetamol til et reaktivt produkt, som i høje koncentrationer kan skade leveren fatalt.



Diagrammet viser mulige biokemiske veje for NSAID lægemiddelstoffer, der indeholder en carboxylsyregruppe. Nogle af reaktionsvejene kan medføre bivirkninger.

Omdannelse og bivirkninger

Andre smertestillende stoffer fra gruppen af non-steroidale antiinflammatoriske stoffer (NSAID'er) kan ligeledes forårsage bivirkninger, der tilskrives reaktive omdannelsesprodukter. NSAID'erne tæller bl.a. meget anvendte lægemidler som Aspirin®, Magnyl®, Idotyl® og Ibuprofen®. Hos enkelte patienter har man set meget alvorlige allergiske anfald, som i værste fald kan medføre døden. Det er sandsynliggjort, at det er omdannelsesprodukter af lægemiddelstofferne, som resulterede i giftvirkningen. De lægemidler, som gav anledning til de meget alvorlige bivirkninger, er i dag trukket ud af markedet.

Mange NSAID'er indeholder carboxylsyregrupper, der i leveren ofte påsættes glucuronsyre. Resultatet er, at der dannes et produkt, som kaldes et acylglucuronid. Acylglucuronider kan i modsætning til lægemiddelstoffet reagere med proteiner i plasma. Herved dannes der modificerede plasmaproteiner, som af immunforsvaret anses for at være fremmedlegemer. Derfor går immunforsvaret til angreb på fremmedlegemet med en allergisk reaktion til følge.

Lægemiddel-modificerede proteiner er ikke kun fundet i plasma. Efter indgift af andre NSAID'er har man i nyrerne og leveren fundet proteiner, hvortil der var bundet lægemiddelstoffer. I leveren er de proteiner, som fremmer udskillelsen af nedbrydningsprodukter af lægemiddelstoffer, særligt udsatte, og man har kædet dette sammen med forekomst af leverskader.

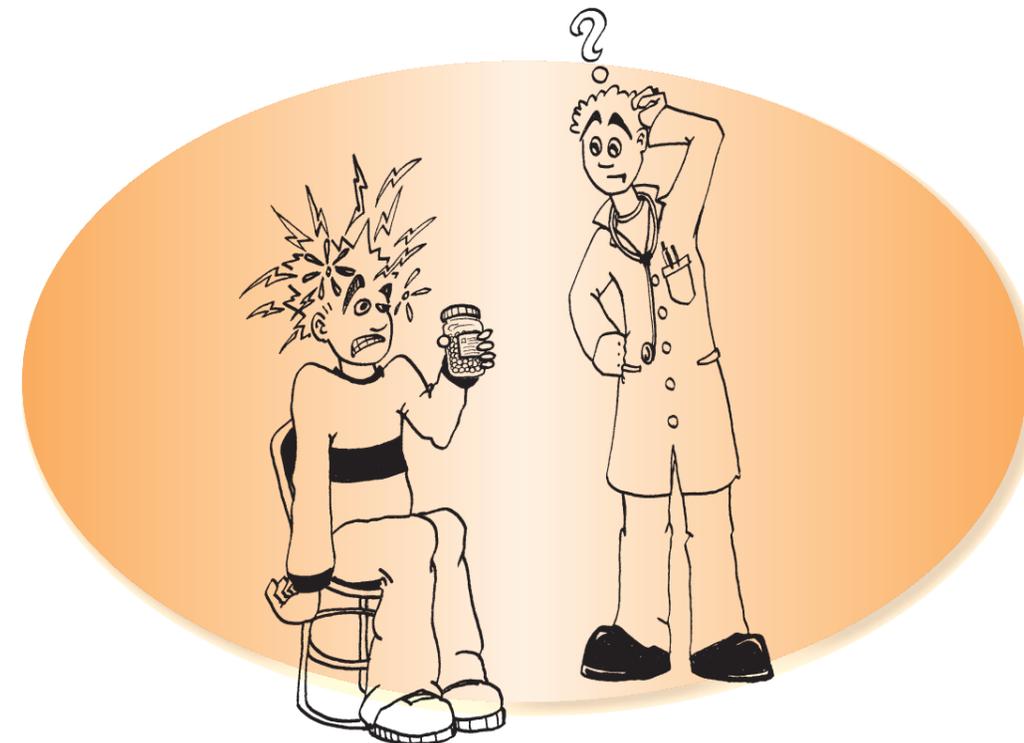
Ind i de biokemiske kredsløb

Reaktiviteten af acylglucuronider er i dag veldokumenteret, men at lægemiddelstoffer kan omdannes til reaktive nedbrydningsprodukter, er stadig et interessant og et relativt uudforsket område.

I øjeblikket undersøger vi reaktiviteten af andre omdannelsesprodukter af NSAID'er, der indeholder carboxylsyregrupper. Disse lægemiddelstoffer omdannes ikke kun til acylglucuronider, men kan også påsættes coenzym A. Herved opstår der et omdannelsesprodukt, som anses for at være mere reaktivt end acylglucuroniderne. Derfor kan man frygte, at coenzym A forbindelser med lægemiddelstoffer kan fremprovokere en reaktion med proteiner og andre biomolekyler og dermed være årsag til bivirkninger.

Coenzym A forbindelser spiller bl.a. en vigtig rolle i fedtstofskiftet i forbindelse med syntese og nedbrydning af fedtsyrer. For lægemiddelstoffer, som indeholder en carboxylsyregruppe har det vist sig, at kroppens enzymer kan forveksle dem med fedtsyrer - dvs. at visse lægemiddelstoffer kan indgå i de samme biokemiske veje som fedtsyrer.

Dette har resulteret i, at man har set, at NSAID'et ibuprofen kan indbygges i fedtstoffer i cellerne. Igen en



Ill. Mette Langebæk

uheldig konsekvens af, at lægemiddelstoffer indgår i uønskede biokemiske processer i kroppen, i stedet for blot at blive inaktiveret og udskilt. Den kliniske betydning af dette fænomen er dog endnu ukendt.

Analytisk kemi som værktøj

I vores forskning har vi brugt NSAID'et naproxen som modelstof. Vi har syntetiseret coenzym A forbindelsen med naproxen og har undersøgt stoffets reaktivitet over for proteinet albumin, som findes i plasma.

Binding har vist sig at foregå i en væsentlig højere grad end for acylglucuronidet af naproxen, hvilket må tilskrives den højere kemiske reaktivitet for coenzym A forbindelser. Endvidere ses en høj reaktivitet overfor glutathion, som findes i leveren, og som normalt reagerer med reaktive molekyler for at beskytte organismen.

For at kunne vurdere de kemiske egenskaber af forskellige omdannelsesprodukter af lægemiddelstoffer er det interessant at sammenligne, hvor og hvordan de bindes til proteiner, samt i hvor høj grad de bindes. Derfor er vi i øjeblikket i færd med at identificere bindingsstederne på albumin for såvel acylglucuronid som for coenzym A forbindelsen af naproxen.

Med de sædvanlige analytiske kemiske teknikker er det svært at håndtere store proteiner. Derfor spalter vi proteinet med et enzym, hvorved der fremkommer ca. 70-80 proteinfragmenter, som kaldes peptider. Opgaven er herefter at adskille peptiderne, identificere de peptider, hvorpå der er bundet lægemiddelstof, og karakterisere disse peptider. Til slut kan puslespillet lægges ved at indpasse peptiderne i den lange proteinsekvens, før bindingsstedet endelig kan fastlægges. Peptiderne adskilles ved hjælp af kromatografi, identificeres med fluorescensdetektion og karakteriseres ved hjælp af massespektrometri.

Leverceller og dyreforsøg

Forsøgene med omdannelsesprodukterne af naproxen er udført med albumin som modelprotein under omstændigheder, der i en vis udstrækning minder om biologiske forhold. Eksperimenterne giver os en baggrundsviden om omdannelsesprodukternes kemiske reaktivitet, men forsøgene kan ikke stå alene. Der er behov for, at resultaterne sammenholdes med forhold, der ligner forholdene i den menneskelige organisme mest muligt.

Derfor påbegynder vi nu forsøg i forskellige biologiske systemer, hvor omdannelsesprodukterne dannes i leverceller eller i levende rotter, som indgives lægemiddelstoffet. Leverceller kan udtages fra forsøgsdyr uden at miste funktionen og er dermed i stand til at danne stofskifteprodukter af lægemidler. Derpå består analysearbejdet i at isolere proteiner fra begge typer forsøg og analysere for tilstedeværelsen af proteiner, som er modificeret af omdannelsesprodukter af lægemidler.

Samtidigt opsamles rotternes urin, som skal undersøges for eventuelle forbindelser, der muligvis kan sammenholdes med en uønsket situation i leveren. Dette giver muligheden for at kunne finde eventuelle biomarkører for dannelsen af modificerede proteiner.

Fremtidsvisionen

Fremtidsvisionen er at opnå så megen viden om omdannelsesprodukternes binding til proteiner, at man på skrivebordet eller ved hurtige laboratorieforsøg kan udtale sig om lægemiddelstoffers potentielle risiko for at medføre bivirkninger hos mennesker.

Dette kan være af betydning i tidlige stadier i lægemiddeludviklingen, da man sagtens kan forestille sig to lægemiddelstoffer med samme effektivitet mod en given sygdom, men med forskellige bivirkningsprofiler. I en sådan situation vil det være gavnligt at kunne forudsige, hvilke af de to lægemiddelstoffers omdannelsesprodukter, der vil give anledning til den laveste grad af modificerede proteiner og dermed laveste frekvens af bivirkninger.



Cand.pharm. Jørgen Olsen er ph.d.-studerende ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk kemi.



Ph.d. Inga Bjørnsdottir er kemiker ved Novo Nordisk (drug metabolism).



Ph.d. Jette Tjørnelund er lektor ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk kemi.



Dr.pharm. Steen Honoré Hansen er professor ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk kemi.

Kontrol af lægemidler for feberfremkaldende stoffer

Ved kontrol af lægemidler benyttes forsøgsdyr til at undersøge, om lægemidlerne indeholder feberfremkaldende stoffer. Forsøg med dyr er kostbare og besværlige, og af etiske årsager er det ønskeligt at begrænse brugen af forsøgsdyr. På Institut for Farmakologi udvikles en ny kontrolmetode baseret på humane celler i kultur.

Af Lise Moesby, Lene Tommerup,
Erik Wind Hansen og Jens Dencker Christensen

Pyrogener er stoffer fra bl.a. bakterier, svampe og virus, som fremkalder feber ved indgift i blodbanen på mennesker og højerestående dyr. Da det kan få alvorlige konsekvenser, hvis pyrogener indsprøjtes i blodet, er det vigtigt at sikre, at lægemidler ikke indeholder feberfremkaldende stoffer.

I dag undersøges lægemidlers indhold af pyrogener ved forsøg med kaniner, fordi kaniners følsomhed overfor pyrogener ligner menneskets. Princippet i kontrollen er, at lægemidlet indsprøjtes i kaninens blod, hvorefter man registrerer, om injektionen medfører en temperaturstigning. Et alternativ er at bruge opløste blodlegemer fra krabbearten dolkhale. Når dolkhalens blodlegemer udsættes for pyrogener, stivner opløsningen. Denne test har dog begrænsninger, fordi den kun er følsom overfor pyrogener fra gram-negative bakterier og derfor ikke kan detektere pyrogener fra gram-positive bakterier, svampe og virus. Med andre ord er dolkhaltesten ikke det ideelle alternativ til kanintesten.

Bakterier kan groft inddeles i to grupper: gram-positive og gram-negative. Inddelingen er baseret på opbygningen af bakteriernes cellevæg. Der har igennem en årrække været fokuseret meget på gram-negative bakteriers pyrogene egenskaber, hvor feberen forårsages af et sukkerholdigt giftstof, et lipopolysaccharid.

Derimod er de gram-positive bakteriers pyrogene egenskaber kun undersøgt i ringe omfang. Typiske gram-positive bakterier er *Staphylococcus aureus* og *Bacillus subtilis*. Et af de feberfremkaldende giftstoffer, som gram-positive bakterier har i deres cellevæg, er lipoteichoinsyre. Det er lange molekyler, som er forankret i bakteriens cellemembran, og som stritter ud fra bakterien som små antenner.

Årsag til feber

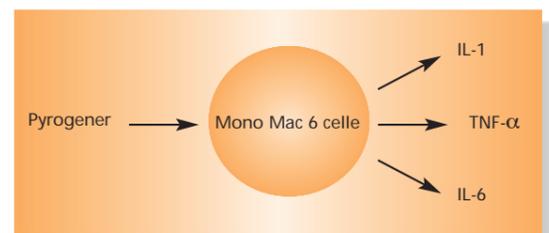
Når et menneske får pyrogener i blodet, påvirkes de hvide blodlegemer, makrofager og monocytter, til at udskille nogle signalstoffer, som kaldes cytokiner. Cytokiner regulerer blandt andet immunforsvaret i forbindelse med infektion og sårheling.

Cytokinerne transporteres via blodet til centralnervesystemet, hvor de direkte eller indirekte påvirker det temperaturregulerende center i hjernen til at øge legemstemperaturen, så man får feber. Monocytternes udskillelse af cytokiner, når de udsættes for pyrogener, danner grundlaget for den alternative pyrogentest, som vi arbejder med.

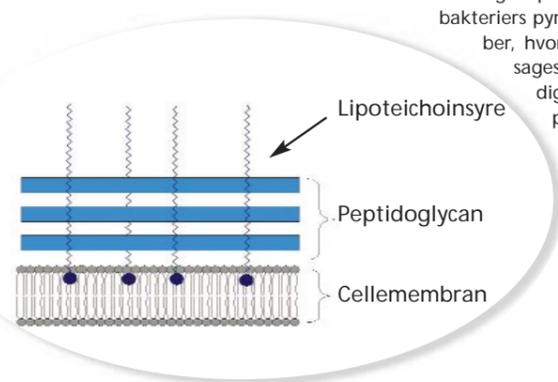
Man kan isolere monocytter fra frisk humant blod og bruge dem til at teste lægemidler for deres indhold af pyrogener. De friskisolerede monocytter vil, ligesom i blodet, udskille cytokiner, hvis der er pyrogener til stede. Der er dog praktiske og etiske problemer ved at bruge blod fra mennesker til forsøg bl.a. på grund af smittefare.

Derfor anvender vi en human cellelinie af monocytter, som hedder Mono Mac 6. Cellerne dyrkes ved 37 °C i en passende atmosfære af ilt og kuldioxid, i et næringsmedie, som indeholder alle de stoffer, som er nødvendige for cellernes funktion og vækst.

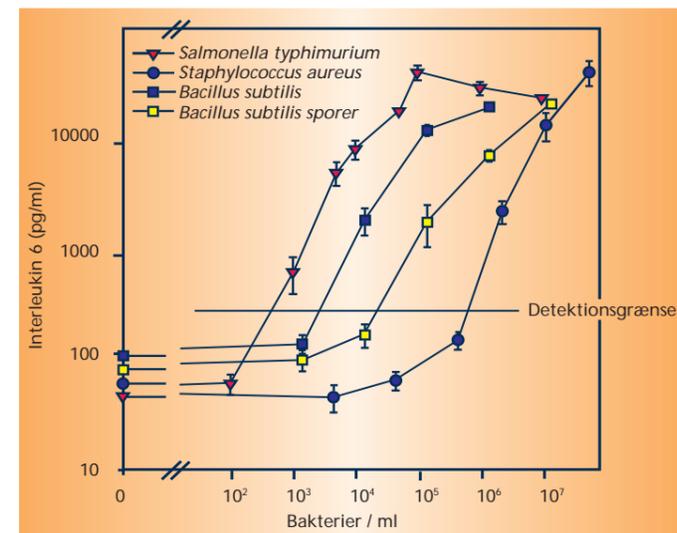
Monocytterne får frisk næringsmedie to gange om ugen, og på den måde kan cellerne leve i flere måneder. Fordelen ved at arbejde med en cellelinie er, at den kan leve gennem længere tid under disse kunstige forhold. Til sammenligning vil monocytter isoleret fra frisk blod kun kunne overleve



Når Mono Mac 6 celler udsættes for pyrogener, udskiller de cytokiner: interleukin 1 (IL-1), tumor nekrose faktor α (TNF- α) og interleukin 6 (IL-6). Vores test er baseret på udskillelse af interleukin 6.



Skitse af en gram-positiv bakteries cellevæg. Væggen består inderst af en cellemembran, som er omgivet af et tykt lag af peptidoglycan. Lipoteichoinsyre, som kan fremkalde feber, er forankret i cellemembranen og stikker ud gennem peptidoglycanlaget.



Stimulering af Mono Mac 6 celler med pyrogener i form af mikroorganismer: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* bakterier og sporer, samt den gram-negative bakterie *Salmonella typhimurium*. Detektionsgrænsen for de forskellige bakterier er indikeret med den vandrette streg.

nogle få dage. En anden fordel ved brug af cellelinier er, at de kan opbevares i fryseren, indtil de skal bruges. Der er altså hverken behov for forsøgsdyr eller bloddonorer.

Når Mono Mac 6 celler udsættes for pyrogener, vil de, ligesom monocytter fra blodet, udskille en række cytokiner såsom tumor nekrose faktor α , interleukin 1 og interleukin 6. Vi har valgt at basere vores metode på måling af udskilt interleukin 6.

Brug af celletesten

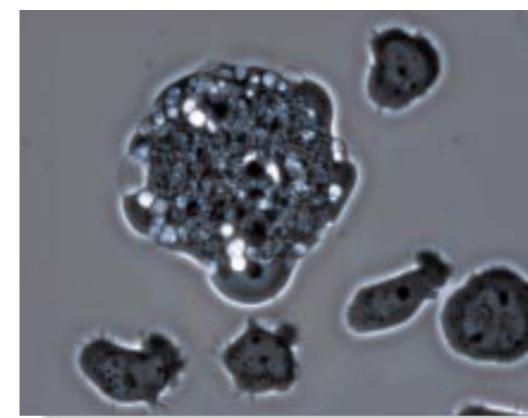
Når et lægemiddel skal undersøges for indhold af pyrogener, dyrkes Mono Mac 6 cellerne i nærvær af lægemidlet. Hvis lægemidlet indeholder feberfremkaldende stoffer, kan det måles ved, at cellerne udskiller cytokinet interleukin 6. Jo større mængde af pyrogener, der findes i lægemidlet, jo større bliver udskillelsen af cytokiner. Derfor er celletesten meget anvendelig til at måle mængden af pyrogener i et lægemiddel.

Vi har vist, at Mono Mac 6 cellerne, ligesom de hvide blodlegemer i blodet, er følsomme overfor mange forskellige pyrogene stoffer og mikroorganismer. Det gælder gram-negative bakterier, gram-positive bakterier og sporer, svampe og gær. Undersøgelserne har også vist, at mikroorganismers evne til at inducere udskillelse af interleukin 6 i cellerne er forskellig, hvilket indebærer, at detektionsgrænsen afhænger af den undersøgte mikroorganisme.

Sammenlignes kaninens følsomhed overfor pyrogene stoffer med Mono Mac 6 cellernes, så kan cellerne generelt måle lavere koncentrationer af pyrogener end kaninen. Mono Mac 6 testen er derfor et realistisk alternativ til kanintesten, fordi cellerne har en følsomhed, som er sammenlignelig med kaninens, og fordi cellerne er følsomme overfor mange forskellige pyrogene stoffer.

Gram-positive bakterier

Den pyrogene egenskab er typisk knyttet til bakteriernes cellevæg, og en række bakterielle cellevægskomponenter stimulerer udskillelsen af interleukin 6. En gram-positiv bakterie, som vi i laboratoriet har undersøgt indgående, er *Bacillus subtilis*. Bakterien har den egenskab, at den kan danne sporer. En spore er en bakterie i hvilestadium og bakterien omdannes typisk til en spore i situationer, hvor der er mangel på næring. Sporen kan overleve i lang tid, og hvis der på et tidspunkt igen opstår gode vækstbetingelser, vil sporen blive til en vegetativ bakterie igen.



Makrofagcellelinien Mono Mac 6 - et nyt værktøj til måling af pyrogener.



Ph.d. Lise Moesby er lektor ved Institut for Farmakologi.



Cand.pharm. Lene Tommerup var specialestuderende ved Institut for Farmakologi i foråret 2000.



Ph.d. Erik Wind Hansen er lektor ved Institut for Farmakologi.



Ph.d. Jens Dencker Christensen er lektor ved Institut for Farmakologi.

Ny lovende teknik til forstøvning af lægemidler

En ny forstøvningsmetode har et stort potentiale til fremstilling af lægemidler. Teknikken er velegnet til at forstøve væsker til små dråber ved et luftforbrug 50 gange mindre end forbruket ved andre kendte teknikker. Det kan betyde en stor økonomisk besparelse, når forstøvning udføres ved hjælp af inaktiv gas.

Af Frederik J. Petersen, Henning G. Kristensen, Ole Wørts og Torben Schæfer

Mange nye potentielle lægemiddelstoffer er uegnede til at blive indtaget i tableform, fordi de nedbrydes i tarmene eller i blodet. Indånding af spray eller små partikler er ofte et godt alternativ, som i stigende omfang anvendes til behandling af en række sygdomme, f.eks. astma.

Væskeforstøvning er generelt et centralt element i mange farmaceutiske fremstillingsprocesser; f.eks. agglomering, spraytørring, spraykøling, mikroindkapsling og overtrækning af faste stoffer. Ved disse processer er produktets egenskaber påvirket af relativt få procesvariable, hvoraf den forstøvede væskes middeldråbestørrelse og dråbestørrelsesfordeling normalt er de to mest betydningsfulde.

I den farmaceutiske produktion ønsker man at anvende en robust forstøvningsmetode, som problemfrit forstøver væsker eller suspensioner under stressede betingelser som

høj varme, uden at væskens karakteristika ændres under forstøvningen. Det er ikke altid let at forstøve polymeropløsninger til små ensartede dråber, grundet deres viskositet. Det er især en krævende opgave at forstøve væsker ved produktion af inhalerbare partikler, der kun skal være få mikrometer store, eller ved overtrækning af krystaller og andre partikler med størrelser på under 100 mikrometer. Her er det nødvendigt, at dråbestørrelsen i sprayeren kun er 10–20 mikrometer og gerne endnu mindre.

Dysetyper

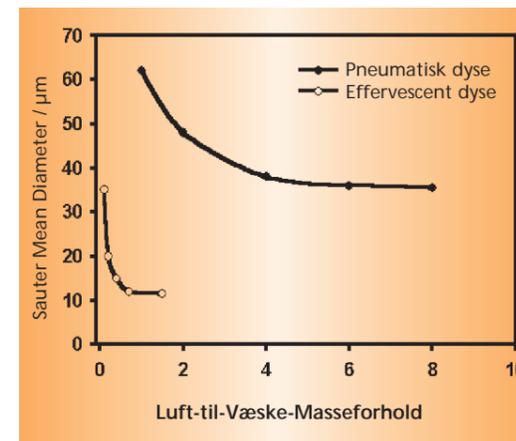
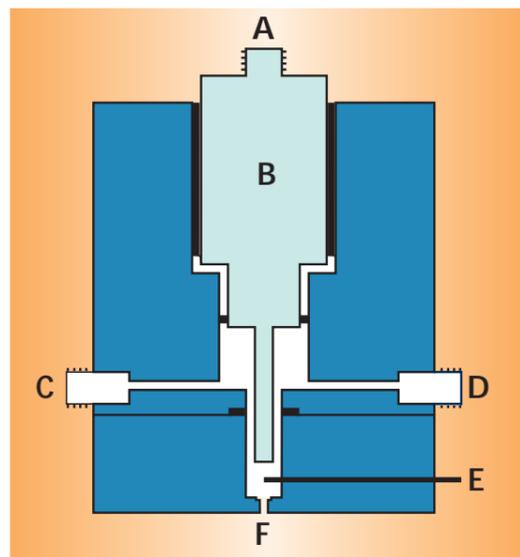
De forstøvere, som normalt anvendes i lægemiddelproduktion, kan basalt inddeles i tre typer:

- Pneumatiske forstøvere er tostof-dyser, der forstøver væsker ved hjælp af en luftstrøm omkring dyseåbningen for væsketilførelsen.
- Hydrauliske forstøvere er trykdyser, som man kender fra f.eks. olie fyr. Her opnås forstøvningen ved at presse væsken gennem et snævert hul ved hjælp af et overtryk.
- Rotationsforstøvere, hvor forstøvningen opnås ved at slynge væsken ud fra et roterende hjul.

I de fleste af de ovennævnte farmaceutiske processer anvendes pneumatiske forstøvere, fordi de producerer væskedråber af en mere ensartet størrelse end de hydrauliske forstøvere. Rotationsforstøvere benyttes især i spraytørringsprocesser. Her fordampes væsken efter forstøvningen, hvorved lægemiddelstoffet kan opsamles i form af små tørre partikler.

Den opnåelige dråbestørrelsesfordeling for en given forstøver er afhængig af forholdet mellem den mængde af henholdsvis luft og væske, der tilføres dysen, samt af væskens viskositet og overfladespænding. Generelt kræver forstøvning meget store luftmængder i form af atmosfærisk luft eller gas som f.eks. kvælstof.

Figuren viser princippet i effervescent forstøvning. Luft injiceres i dysen ved lavt tryk og dermed i en relativt lille mængde til væskestømmen, således at der opstår en intim blanding af væskebobler og luft. Når blandingen forlader dysen, ekspanderer luften på grund af trykfaldet og genererer hermed en spray eller aerosol af meget små væskedråber. A: Luftindgang. B: Luftinjektor. C: Udgang til trykmåler. D: Væskeindgang. E: Blandekammer. F: Dyseåbning.



En sammenligning mellem pneumatisk forstøvning og effervescent forstøvning. Middeldråbestørrelsen er udtrykt ved volumen-overflade diameter. Luft-til-væske-masseforholdet er forholdet mellem massen af luften, der tilføres forstøveren, og massen af væske, der forstøves.

Bobleforstøvning

En ny teknologi, som er udviklet med henblik på forstøvning af brændstof i jetmotorer og dieselmotorer, kan åbne nye muligheder for at forbedre forstøvningen af lægemiddelstoffer. Teknikken kaldes bobleforstøvning eller effervescent forstøvning. Fordelen ved metoden er, at man kan forstøve væsker meget fint med et luftforbrug, som er langt mindre end ved andre kendte forstøvningsteknikker.

Ved bobleforstøvning arbejder dysen efter tostof-princippet ligesom den pneumatiske dys, men den adskiller sig fra denne på et centralt punkt. I den effervescente dys injiceres luft ved lavt overtryk og i en relativt lille mængde til væskestømmen i dysen, således at der opstår en intim blanding af væske og luftbobler. Når blandingen af væske og luft forlader dysen, ekspanderer luften på grund af trykfaldet og genererer hermed en spray af meget små væskedråber.

De hidtidige erfaringer har vist, at man med bobleforstøvning kan fremstille sprays med dråbestørrelser svarende til de dråbestørrelser, der dannes ved pneumatisk forstøvning, men under anvendelse af en luftmængde, der er ca. 50 gange mindre. Hvis luftmængden øges, kan man ved hjælp af bobleforstøvning generere dråber, der er væsentligt mindre end de dråber, der dannes ved andre forstøvningsmetoder.

Farmaceutisk industri

De undersøgelser, vi indtil nu har udført, har især haft til formål at vurdere, hvor robust en teknik bobleforstøvning er. Resultaterne viser, at den nye dyseteknik giver små middeldråbestørrelser ved lave luft-til-væske-masseforhold, når der sammenlignes med den pneumatiske teknik. Dette er ensbetydende med, at luftforbruget er markant lavere ved bobleforstøvning, hvilket kan få stor betydning for de processer, hvor man af hensyn til produktets egenskaber eller beskyttelse mod f.eks. eksplosionsfare skal arbejde med inaktive gasser som kvælstof.

Vi har desuden fundet, at teknikken er velegnet til forstøvning af vandige opløsninger af polymerer, selv meget tyktflydende opløsninger. Dråbestørrelsen styres meget let ved kontrol af luft-væske-forholdet i dysen.

Mulighederne for at generere væskedråber i størrelsesområdet 10–20 mikrometer betyder, at teknikken har et stort potentiale for overtrækning af små faste partikler som f.eks. krystaller af lægemiddelstoffer, når forstøveren placeres i et spraytørringsanlæg. Formålet kan bl.a. være at fremstille farmaceutiske produkter med kontrolleret stofafgift. Indledende undersøgelser har vist lovende resultater af kombinationen af bobleforstøvning og spraytørring.



Her ses den effervescente dys.



Cand.pharm. Frederik J. Petersen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci.



Dr.pharm. Henning G. Kristensen er professor ved Institut for Farmaci.



Direktør, cand.pharm. Ole Wørts er adjungeret professor ved Institut for Farmaci.



Dr.pharm. Torben Schæfer er lektor ved Institut for Farmaci.

Plastblødgøringsmidler og allergiske luftvejslidelser

Allergisk astma er en af de hurtigst voksende sygdomme i vores del af verden, men det er svært at pege på en direkte årsag til denne udvikling. Nye undersøgelser viser, at nedbrydningsprodukter fra plastblødgøringsmidler, de såkaldte phthalater, er i stand til at forstærke et allergisk immunrespons i mus.

Af Søren Thor Larsen, Peter Thygesen og Gunnar Damgård Nielsen

Antallet af personer der lider af allergiske luftvejslidelser som astma og høfeber er steget voldsomt de seneste 20-30 år. I dag er der dobbelt så mange allergiske børn som for 20 år siden, og det skønnes, at 15-20 procent af de danske børn har symptomer på astma, høfeber eller andre allergiske lidelser.

Det er bemærkelsesværdigt, at stigningen primært ses i vestlige, industrialiserede lande, hvor levestandarden er høj. Af samme grund er allergi mistænkt for at være knyttet til den livsstil eller det miljø, der er karakteristisk for lande med et højt udviklingsniveau.

En del af stigningen i allergiske lidelser kan muligvis forklares ved et ændret infektionsmønster på grund af vaccination og brug af antibiotika. Desuden udsættes vi for miljøfremmede stoffer, hvoraf nogle sandsynligvis kan stimulere immunforsvaret og forstærke virkningen af allergifremkaldende stoffer; et eksempel er små partikler i dieseludstødning.

Folk i industrilande opholder sig typisk meget inden døre og bliver på den måde udsat for kemiske stoffer, som afgives fra blandt andet byggematerialer. Mange byggematerialer indeholder PVC, som kan være blødgjort med phthalater. Phthalater er det plastblødgøringsmiddel, der anvendes i størst omfang, og alene i Danmark bruger vi årligt ca. 11.000 tons. En stor del benyttes ved fremstillingen af PVC-gulve og gulvtæpper, men phthalater indgår også i mange andre produkter.

Phthalater frigøres løbende fra plastproduktet til det omgivende miljø og vil under tilstedeværelse af vand nedbrydes til monophthalater. Også den menneskelige organisme nedbryder phthalater til monophthalater, når de kommer i kontakt med en gruppe enzymer, som kaldes esteraser.

Astma hos børn

Phthalater er interessante, fordi en befolkningsundersøgelse peger på, at der er en sammenhæng mellem udsættelse for phthalater og udvikling af astma hos børn. Endvidere tyder resultater fra vores undersøgelser på, at visse monophthalater kan forstærke virkningen af allergifremkaldende stoffer og dermed øge risikoen for at få allergisk astma og høfeber.

I medicinske sammenhænge bruger man stoffer med en sådan forstærkende effekt til at forbedre virkningen af inaktiverede giftstoffer og sygdomsfremkaldende mikroorganismer i vacciner, hvor hensigten jo netop er, at kroppens immunforsvar skal aktiveres og danne antistoffer mod vaccinerne. Ved vaccination gives det forstærkende stof ofte kun én gang og sammen med det inaktiverede giftstof eller den svækkede mikroorganisme med det formål specifikt at forstærke virkningen af den pågældende vaccine.

Hvis vi derimod konstant bliver udsat for stoffer med en forstærkende virkning, er der risiko for en u hensigtsmæssig aktivering af immunforsvaret, således at kroppen begynder at danne antistoffer mod allergener som pollen og husstøvmideproteiner.

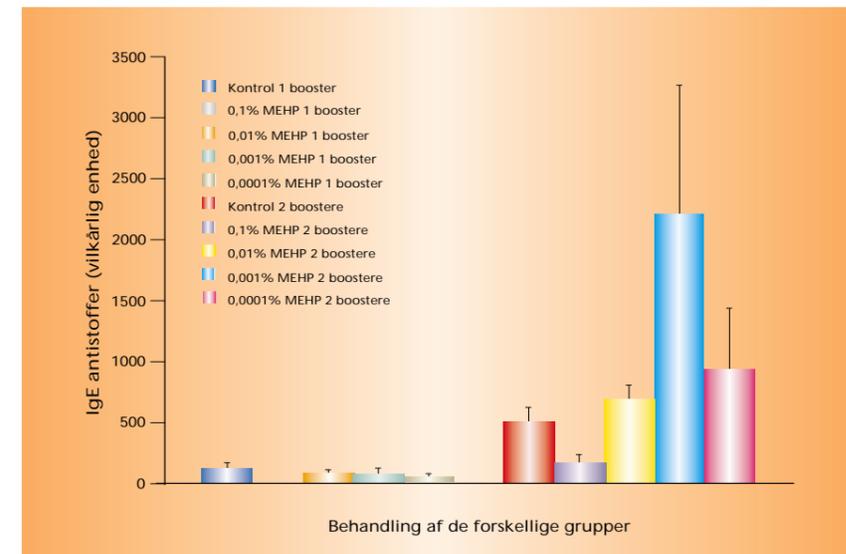
Stoffer med forstærkende effekt kan også medvirke til, at der dannes en ganske særlig type antistoffer, som kaldes IgE, og som spiller en central rolle ved allergiske sygdomme. Når IgE aktiveres af allergener, kan man opleve et allergisk anfald med røde øjne, kløen og eventuelt åndenød. Allergi overfor luftbårne allergener som pollen og husstøvmideproteiner vil ofte give sig udslag i luftvejsallergi, fordi kontakten med allergenet foregår via luftvejene.

Forstærkende stoffer

Stoffer, som forstærker virkningen af allergener og vacciner, kaldes med en fælles betegnelse for adjuvanter, og man kan klarlægge stoffers adjuvanteffekt ved hjælp af en simpel dyremodel.

Astma er en sygdom i voldsom stigning i mange industrilande, og det er især børn der rammes. Ved astmaanfald forsnævres luftvejene - dels p.g.a. sammentrækning af de muskler, der omgiver lufttrøret og dels p.g.a. øget produktion af slim. Brug af bl.a. inhalationsspray kan lindre symptomerne. (Billedet er gengivet med venlig tilladelse fra PARI GmbH, Tyskland)

Mono-2-ethylhexylphthalat (MEHP) er et nedbrydningsprodukt af plastblødgøringsmidlet di(2-ethylhexyl)phthalat. Figuren viser effekten af MEHP på dannelsen af IgE antistoffer i mus. Grupper af 10 mus har fået 1µg æggehvideprotein alene (kontrolgrupper) eller 1µg æggehvideprotein sammen med MEHP. Dyr, der har modtaget endnu en dosis æggehvideprotein, en såkaldt booster, har fået yderligere 0,1µg æggehvideprotein 10 dage efter første behandling. Grupper, der er boostet to gange, har fået 0,1µg æggehvideprotein 10 og 15 dage efter første behandling. Efter to boostere har gruppen, der er behandlet med 0,1% MEHP, en lavere antistofdannelse end kontrolgruppen, p.g.a. MEHPs giftige virkning på immunforsvarets celler. Gruppen, der er behandlet med 0,001% MEHP og boostet to gange, har en højere antistofdannelse end kontrolgruppen, hvilket tyder på en immunstimulerende effekt, som kan fremme udvikling af allergi.



Man indsprøjter en lille smule æggehvideprotein sammen med det stof, man ønsker at undersøge for adjuvanteffekt, i dette tilfælde monophthalat, under huden på en gruppe mus. En anden gruppe mus får på tilsvarende måde indsprøjet æggehvideprotein, men uden den mulige adjuvant. Begge grupper mus vil reagere ved at danne antistoffer mod det indsprøjtede æggehvideprotein. Spørgsmålet er, om den gruppe der får monophthalat, danner flere antistoffer end den gruppe, der udelukkende får æggehvideprotein. Hvis det er tilfældet, må det betyde, at monophthalat virker som en adjuvant.

Nogle adjuvanter virker hurtigt, mens andre virker bedst, når allergenet gives flere gange. For at klarlægge både hurtige og sene adjuvantegenskaber hos monophthalaterne måles produktionen af antistoffer derfor efter, at musene har fået indsprøjet æggehvideprotein en, to eller tre gange.

Der er også stor forskel på hvilken koncentration af adjuvant, der giver maksimal virkning, og det er derfor nødvendigt at teste flere forskellige koncentrationer af monophthalat. Ved høje koncentrationer af stoffet vil man ofte se en nedsat antistofproduktion, fordi stoffet vil virke giftigt på immunforsvarets celler, mens meget lave koncentrationer ikke vil have nogen særlig adjuvanteffekt.

Antistofdannelsen kan følges ved, at man tager en blodprøve fra dyret, hvorefter man måler indholdet af antistoffer.

To dyremodeller

Metoden udmærker sig ved, at man på relativ kort tid kan få afdækket adjuvanteffekten af et stort antal stoffer. Den er

således velegnet som screeningsmetode, og når det gælder stoffer, som normalt indåndes, er der mange ligheder mellem hudens og luftvejenes immunsystem.

Svagheden ved screeningsmetoden er, at den ikke afspejler den måde, man udsættes for stoffer på i virkeligheden. Derfor bør stoffer, der er blevet fundet positive med hensyn til adjuvanteffekt i injektionsmodellen, testes i endnu en dyremodel, hvor æggehvideproteinerne og teststofferne gives som en tåge af fine luftbårne partikler, en såkaldt aerosol. Når musene indånder denne aerosol, vil en del af æggehvideproteinerne aflejres i luftvejene - præcis på samme måde som når mennesker indånder pollen eller støv bestående af husstøvmideprotein.

Kemi og biologi

Vi har testet seks forskellige monophthalater i injektionsmodellen, og deres evne til at virke som adjuvanter er forskellig. Vores forløbige undersøgelser viser, at kun monophthalater med en sidekædelængde på 8-9 kulstofatomer har adjuvanteffekt, mens monophthalater med en kortere eller længere kæde ikke besidder denne effekt. Desuden er det kun monophthalater med lang kulstofsiderkæde, som har en giftig virkning på immunforsvarets celler ved højere koncentrationer.

Viden om hvordan stoffernes kemiske struktur påvirker deres biologiske effekt er af stor værdi, fordi man på den måde kan gå mere målrettet til værks, når nye kemiske stoffer skal designes. På den måde har man bedre chancer for at udvikle nye phthalater, som både er gode plastblødgøringsmidler og samtidig så lidt skadelige som muligt.

Alle monophthalater har samme kemiske grundstruktur. Forskellen ligger i kulstofsiderkæden, på figuren angivet som R. Det ses, at kun monophthalater med en sidekæde indeholdende mindst otte kulstofatomer har effekt på antistofdannelsen indenfor det testede koncentrationsområde.

Monophthalaternes grundstruktur:			
Navn	R	Adjuvant-effekt?	Giftig virkning på immunforsvarets celler?
Mono-n-butylphthalat	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	Nej	Nej
Monobenzylphthalat	-CH ₂ -Ar	Nej	Nej
Mono-n-octylphthalat	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	Ja	Ja
Mono-2-ethylhexylphthalat	-CH ₂ CH(CH ₂ CH ₃)CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	Ja	Ja
Monoisononylphthalat	-CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ C(CH ₃) ₃	Ja	Ja
Monoisodecylphthalat	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	Nej	Ja



Cand.pharm. Søren Thor Larsen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi og Arbejdsmiljøinstituttet.



Cand.pharm., ph.d. Peter Thygesen er lektor ved Institut for Farmakologi.



Dr.pharm. Gunnar Damgård Nielsen er seniorforsker på Arbejdsmiljøinstituttet.

Ind via mundslimhinden med svag strøm

Indgift af lægemiddelstoffer gennem mundslimhinden eller huden er et lovende alternativ til injektioner. En meget svag pulserende strøm kan forbedre optagelsen af lægemiddelstoffer, som ellers vanskeligt kan optages i blodet. Mængden af optaget lægemiddelstof kan styres ved strømstyrke og strømpulsfrekvens.

Af Jette Jacobsen og Margrethe Rømer Rassing

Det er nemt at indtage en tablet, men nogle lægemiddelstoffer egner sig ikke til at blive indtaget gennem munden og sunket, fordi de nedbrydes af mavesyren eller af enzymer i mavetarmkanalen eller leveren. Endvidere kan de have svært ved at passere tarmvæggen og komme ud i blodet. Der er især tale om lægemiddelstoffer som peptider og proteiner. Derfor bliver disse stoffer i dag oftest injiceret direkte i blodbanen med deraf følgende ubehag og ulemper. Det er kostbart og øger risikoen for bivirkninger.

Indgift via mundslimhinden kan være fordelagtig for nogle af disse lægemiddelstoffer. I mange år har man således behandlet hjertekramper med glycerylnitrat ved at placere en tablet under tungen eller ved at bruge en spray på mundslimhinden. Fordelen ved indgift via mundslimhinden er, at lægemiddelstoffet passerer direkte over i blodbanen og videre til virkningsstedet uden først at skulle gennem leveren.

Imidlertid er passagen af lægemiddelstoffer over mundslimhinden ofte så langsom, at dosis bliver for lav. Derfor kan absorptionsfremmende metoder være nødvendige for at opnå virksomme koncentrationer i blodet. Traditionelt

anvender man kemiske hjælpestoffer, som kan påvirke de yderste celler i slimhinden, så de bliver mere gennemtrængelige. Der kræves dog ofte en høj koncentration af hjælpestof for at opnå den ønskede effekt, og desværre kan hjælpestofferne skade cellerne ved høje koncentrationer.

Strøm i stedet for kemi

Iontoforese er en fysisk metode til at fremme passage af lægemiddelstoffer over biologiske barrierer som hud og slimhinde. Princippet er, at en meget svag pulserende strøm sendes igennem f.eks. en slimhinde, hvorved et lægemiddelstof kan drives igennem barrieren og over i blodbanen. Man kan således opnå en lokal effekt eller eventuelt en systemisk effekt i hele kroppen.

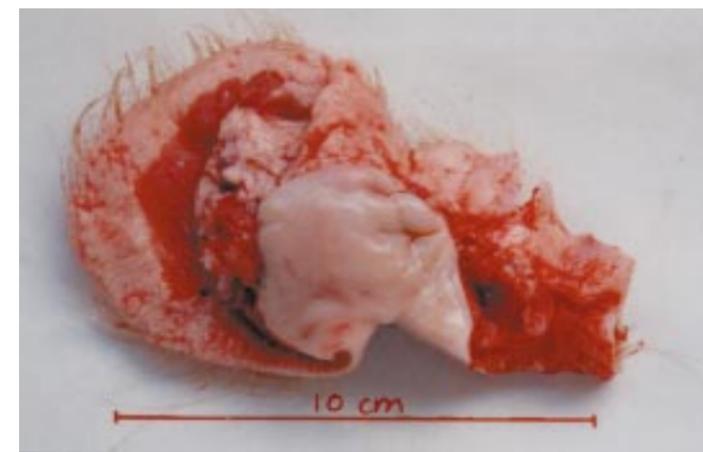
Metoden anvendes i dag til indgift af lægemiddelstof via huden. Der er markedsført et produkt i udlandet til lokalbedøvelse af hud forud for en injektion. Desuden kan cystisk fibrose diagnosticeres ved indgift af pilocarpin, der optages gennem huden ved hjælp af iontoforese.

Iontoforese er især velegnet til indgift af positivt eller negativt ladede lægemiddelstoffer, som normalt har sværere ved at passere slimhinden end neutrale molekyler. Metoden er non-invasiv, idet mundslimhinden eller huden kan påvirkes udefra, uden at man behøver at stikke igennem med en kanyl.

Udvikling og afprøvning af absorptionsfremmende metoder forudsætter, at man råder over en egnet laboriemodel til at studere disse forhold. På Institut for Farmaci er der netop udviklet en laboriemodel til bestemmelse af, hvor hurtigt et lægemiddelstof passerer igennem en kindslimhinde under anvendelse af iontoforese som absorptionsfremmende middel.

Det optimale ville være at anvende kindslimhinder fra frivillige raske forsøgspersoner, men dette er ikke muligt af etiske og praktiske grunde. I stedet benyttes kindslimhinder fra svin, fordi svinets kindslimhinder strukturemæssigt minder meget om menneskets. Kinderne hentes på et slagteri for konsumgrise, så der bruges ikke egentlige forsøgsdyr til arbejdet. Vævsstykkerne kan bevare deres passageegenskaber i op til 10 timer efter, at de er udtaget fra grisen.

Skitse af laboriemodellen til bestemmelse af lægemiddelstoffers passagehastighed over slimhinder. I forsøgene placeres kindslimhinder fra svin med ydersiden opad i donorkammeret, som indeholder en søvelektrode og en opløsning med det ønskede lægemiddelstof. Arealet, hvor lægemiddelstoffet passerer, er 1.8 cm^2 . Til forudbestemte tider udtages der prøver fra receptorkammeret, som simulerer blodkredsløbet. Sølvkloridelektroden i referencekammeret sikrer, at det elektriske kredsløb er sluttet. En impulsgenerator leverer en meget svag pulserende strøm på 0.1 til 0.4 mA/cm^2 .



Billedet viser en kindslimhinde fra svin, som anvendes til eksperimenterne. Kinderne hentes på et svineslagteri, så der bruges ikke egentlige forsøgsdyr til arbejdet. (Foto: Hanne Mørck Nielsen)

Ny laboriemodel

Den nye laboriemodel efterligner situationen i levende dyr eller mennesker. Her placeres en aktiv elektrode med lægemiddelstof på kindslimhinden, og en anden elektrode placeres et vilkårligt sted på kroppen, f.eks. på overarmen. Dermed etableres et elektrisk kredsløb der giver en øget spændingsforskel mellem slimhindens yderside og inderside.

Såfremt lægemiddelstoffet er positivt ladet anbringes en opløsning af stoffet under den positive elektrode, som frastøder stoffet, og via spændingsforskellen mellem ydersiden og indersiden af slimhinden fremmes passagen af lægemiddelstoffet over slimhinden. Tilsvarende placeres et negativt ladet lægemiddelstof under den negative elektrode.

Kindslimhinden er en fedtholdig barriere, hvilket indebærer, at vandopløselige lægemiddelstoffer har svært ved at passere. Derfor er modellen og iontoforeseprincippet studeret med et lille, vandopløseligt lægemiddelstof, som er positivt ladet ved blodets pH på 7.4. Der blev anvendt lægemiddelstoffet atenolol, som bruges til behandling af bl.a. forhøjet blodtryk og hjertelidelser. Forsøgene viste, at iontoforese er velegnet til at fremme og kontrollere hastigheden for passage over kindslimhinden.

En øget strømstyrke øger hastigheden af passagen over slimhinden. Hastigheden stiger direkte proportionalt med strømstyrken i intervallet 0.1 til 0.4 mA/cm^2 . Den anvendte strømstyrke er meget lav, og selvfølgelig kan strømstyrken ikke ukritisk øges.

Der sås en øget passagehastighed for en øget pulsvarighed af strømmen; man taler om puls/pauseforholdet, hvor puls angiver den procentvise tid, hvor strømmen er tilsluttet, mens pause angiver den procentvise tid, hvor strømmen er slået fra. Det højest anvendte puls/pauseforhold på 90/10 (4.5 msek/0.5 msek) og strømstyrken 0.4 mA/cm^2 resulterede i en ca. 110 gange højere passagehastighed sammenlignet med passiv passage uden brug af iontoforese.

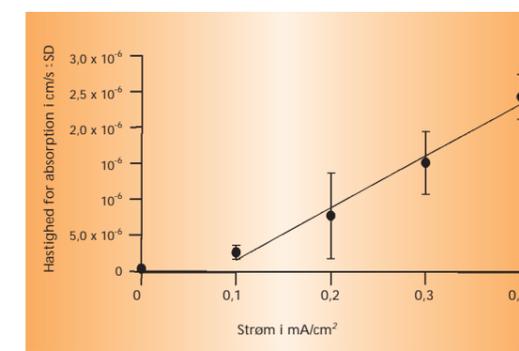
Udvikling af lægemidler

Laboriemodellen er bedst egnet til studier af et lægemiddelstof eller en farmaceutisk formulering i de indledende faser ved udvikling af et nyt lægemiddel. Det er efterfølgende nødvendigt at kontrollere virkningen af et nyt lægemiddel på levende dyr, inden det afprøves på mennesker i kontrolrede kliniske forsøg.

Ud fra de opnåede resultater vurderer vi, at iontoforese er en lovende metode til at fremme passage af lægemiddelstof over kindslimhinden og til samtidig at kunne styre koncentrationen af lægemiddelstof i blodbanen.

Ved at indgive en mindre mængde lægemiddelstof i forhold til indtagelse af en tablet mindskes risikoen for bivirkninger. Iontoforese er især attraktivt til at fremme optagelsen af elektrisk ladede lægemiddelstoffer, som har svært ved at passere slimhinder eller hud. Man undgår injektioner, og patienten kan selv tage sin medicin uden hjælp fra sundhedspersonale. Det vil også være muligt at efterligne en pulserende døgnrytme f.eks. af hormoner i blodbanen. Det kunne gøres ved et plaster på huden, som er programmeret til at afgive varierende mængder lægemiddelstof over et døgn eller en uge - f.eks. til forebyggelse af knogleskørhed hos midaldrende kvinder. Indgift af lægemiddelstoffer via kindslimhinden vil ligeledes kunne give en hurtig lindring af gennembrudssmerter i en kronisk smertebehandling.

Det er dog nødvendigt med yderligere undersøgelser for endeligt at kunne afgøre egnetheden af iontoforese; herunder er det vigtigt at afprøve, om de påtænkte farmaceutiske formuleringer er elektrisk og biologisk stabile.



Hastighed for absorption af atenolol over svinekindslimhinder som funktion af passiv behandling eller strømbehandling.



Ph.d. Jette Jacobsen er lektor ved Institut for Farmaci.



Ph.d. Margrethe Rømer Rassing er lektor ved Institut for Farmaci.

Ind gennem tarmcellerne via naturlige optagemekanismer

Den humane peptidtransportør, hPepT1, er et membrantransportprotein, der transporterer små peptider fra tarm-lumen ind i tarmcellerne. Denne transportvej kan udnyttes til at øge optagelsen af lægemiddelstoffer.

Af Birger Brodin, Carsten Uhd Nielsen, Bente Steffansen og Sven Frøkjær

Menneskets tyndtarm indeholder transportmolekyler, som optager stoffer, der dannes efter nedbrydningen af føden i fordøjelseskanaalen. Et af disse transportmolekyler er den humane peptidtransportør, hPepT1.

Oprindeligt mente man, at alt protein først skulle nedbrydes til aminosyrer, før det kunne transporteres gennem tarmvæggen. Men nyere forskning har vist, at op til 50 procent af fødens indhold af proteiner optages i form af peptidkæder på to eller tre aminosyrers længde. Optagelsen sker ved hjælp af hPepT1, der sidder i tyndtarmscellernes membraner på den side af cellerne, som vender ind mod tarmen. Transportøren sender peptiderne ind i tarmvæggens celler.

Når peptiderne er kommet ind i cellerne, nedbrydes en stor del af dem til aminosyrer, som transporteres ud i blodet via aminosyretransportører i den cellemembran, der vender ud mod blodbanen. Peptider eller peptidlignende stoffer, der ikke bliver angrebet af enzymer i tarmcellerne, vil blive transporteret ud i blodet via en peptidtransportør i den membran, der vender ud mod blodbanen (Fig. 1). Denne transportør er endnu ikke klonet og karakteriseret.

Tarmcellernes evne til at transportere peptider og peptidlignende stoffer fra tarm-lumen over i blodbanen kan udnyttes til at øge optagelse af lægemiddelstoffer, der ellers ikke ville blive absorberet gennem tarmvæggen. Dette kan ske, enten ved at koble lægemiddelstoffet til et peptid, eller ved at modificere lægemiddelstoffet så det får en peptidlignende struktur.

Kendskabet til hvorledes peptider transporteres gennem cellerne, og hvorledes denne transport reguleres er dog endnu ganske sparsomt. Formålet med projektgruppens arbejde er derfor at øge vor viden om tyndtarmens peptidtransportmekanismer for, på længere sigt, at muliggøre design af peptidlignende lægemiddelstoffer, der kan optages gennem transportsystemet.

Stort potentiale

Peptidtransportøren hPepT1 har vist sig at være relativt specifik. Mange transportmolekyler transporterer kun et enkelt eller ganske få typer af stoffer. Peptidtransportøren, derimod, er i stand til at transportere et meget stort antal forskelligartede substrater. Eksempelvis transporteres stort set alle testede naturlige peptider, som består af to eller tre aminosyrer.

Efterfølgende har det vist sig, at en række lægemiddelstoffer, hvis transportvej fra tyndtarmen ind i blodbanen ikke var kendt, da lægemidlerne oprindeligt blev taget i brug, også transporteres via peptidtransportøren. Dette gælder for en række antibiotika, anticancermedlet bestatin og visse blodtrykssænkende midler. Fælles for disse lægemiddelstoffer er, at de alle har en peptidlignende struktur.

Peptidtransportørens evne til at optage peptider og peptidlignende lægemiddelstoffer rummer således et stort potentiale i farmaceutisk sammenhæng.

Vor viden om tyndtarmens transportegenskaber for peptider er dog endnu mangelfuld. hPepT1 blev klonet i 1994-96, først fra rotter og kaniner og senere fra mennesket. Vi kender således gensekvensen og kan også forudsige strukturen af det membranprotein, som hPepT1 består af. Der mangler dog information om, hvorledes transportmekanismen reguleres, hvilke typer stoffer der kan transporteres, og hvilke stoffer der afvises af transportøren.

Endelig mangler man som nævnt at karakterisere den transportør, der står for transporten af peptider og peptidlignende stoffer fra tarmcellerne og ud i blodet. Det har derfor været målet med projektet at undersøge hvorledes forskellige peptider transporteres gennem tarmcellerne for derigennem at få oplysninger om transportvejen og de forskellige parametre, der er bestemmende for transporten.

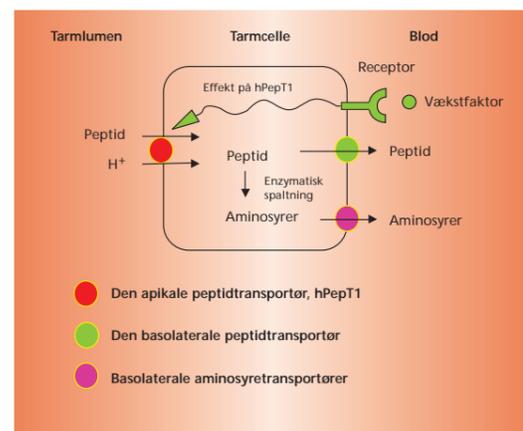


Fig. 1: Transportvejen for peptider og peptidlignende lægemiddelstoffer gennem cellerne i tarmvæggen. Peptiderne kommer ind i cellerne via den humane peptidtransportør hPepT1, og sendes ud i blodet via en peptidtransportør, som endnu ikke er karakteriseret.

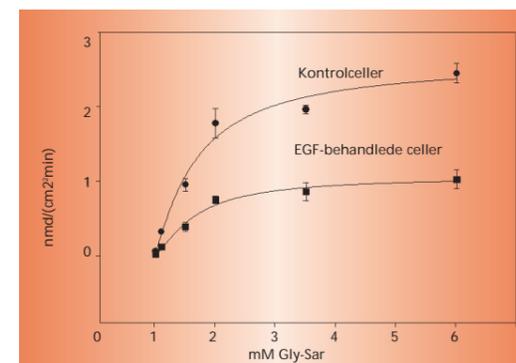


Fig. 2: Cellulær optagelse af peptidet glycylysarcosine (Gly-Sar) via peptidtransportøren. Figuren viser optagelsen af peptid som funktion af koncentrationen af Gly-Sar på den apikale side af monolaget. Figuren viser to kurver, en hvor cellerne er ubehandlede, og en hvor cellerne har været behandlet med epidermal vækstfaktor, EGF. Det ses tydeligt, at denne vækstfaktor sænker transportaktiviteten.

Regulering af transporten

I løbet af projektperioden har vi videreudviklet en række metoder. Vi har optimeret transportforsøg og optagsforsøg, således at vi med stor nøjagtighed kan karakterisere vigtige parametre for transport af lægemiddelstoffer ind i og gennem tarmcellerne.

Vi har karakteriseret den humane peptidtransportør, hPepT1, ved hjælp af molekylærbiologiske metoder, hvor vi har målt aktiviteten af det gen, som danner transportøren; det er sket ved at bestemme mængden af de genetiske sendebud, mRNA, der koder for hPepT1. Desuden har vi målt mængden af hPepT1 protein, som er tilstede i cellen. Ved sådanne målinger kan vi nøje følge ændringer i antallet af hPepT1 molekyler i cellerne efter forskellige påvirkninger. Ved hjælp af antistoffer rettet mod peptidtransportøren og ved hjælp af laserkonfokalmikroskopi har vi visualiseret, hvor i cellen denne peptidtransportør befinder sig (Fig. 3).

Overordnet har de forskellige typer forsøg vist, at ydre stimuli kan regulere optaget af stoffer gennem peptidtransportvejen. Vi har vist, at vækstfaktorer og hormoner regulerer optagsprocessen ved at stimulere specifikke receptorer, der sidder på den del af tarmcellernes membran, der vender ud mod blodbanen. Eksempelvis øger insulin peptidtransporten, mens epidermal vækstfaktor (EGF), sænker transporten (Fig 2). Ligeledes har vi vist, at visse peptider er i stand til at øge optagsprocessen, når de tilsættes på den side af cellerne, der normalt vender ind mod tarmen.

Hvorledes reguleringen foregår, er ikke afklaret og er i øjeblikket genstand for undersøgelser i vort laboratorium. Disse resultater er vigtige for at kunne klarlægge det samspil af faktorer, der finder sted, når lægemiddelstoffer bliver optaget gennem tarmvæggen via peptidtransportsystemet.

Forsøgene har hovedsageligt været udført på celler fra cellelinien Caco-2, som funktionelt ligner tyndtarmsceller. Cellelinien stammer oprindeligt fra en kræftsvulst i tyktarmen.

Caco-2-cellerne er udødelige og kan således dyrkes i det uendelige i laboratoriet, men de er derfor også forskellige fra cellerne i normalt væv. Resultater opnået med sådanne celler skal derfor tolkes med forsigtighed.

Vi arbejder nu med at gentage forsøgene med tyndtarmsvæv fra svin for således at sandsynliggøre, at resultaterne kan reproducere på naturligt væv.

Langtrækkende perspektiver

Projektets perspektiver er langtrækkende. En stor del af nye potentielle lægemiddelstoffer er peptider eller peptidlignende. Ligeledes kan visse lægemiddelstoffer, der normalt ikke ville krydse tarmvæggen, kobles til dipeptider. Herved dannes et prodrug, som kan optages via peptidtransportøren og senere spaltes til lægemiddelstof og dipeptid i tarmcellerne eller blodbanen.

De store fremskridt inden for molekylærbiologien har medført, at man har identificeret en række molekyler, der sandsynligvis er peptidtransportører. Carsten Uhd Nielsen fra projektgruppen har på et ophold hos en af USA's førende eksperter indenfor området, professor Wolfgang Sadeé fra University of California i San Francisco, undersøgt nye typer transportører i andre væv. Kendskab til, hvor sådanne transportører befinder sig, vil på længere sigt bidrage til at målrette behandlinger med peptidbaserede lægemiddelstoffer mod netop disse væv.

Vor viden om, hvordan lægemiddeltransport via peptidtransportører finder sted, og om hvilke fysiologiske forhold, der spiller ind i transportprocessen, vil således både kunne danne grundlag for et rationelt design af lægemiddelstoffer med større biotilgængelighed og dermed også større terapeutisk effektivitet og på længere sigt muliggøre målrettet behandling mod sygdomme i bestemte væv.

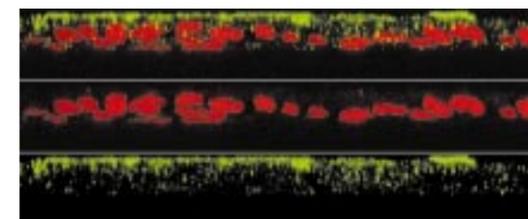


Fig. 3: Konfokalt optisk snit ned gennem et monolag af Caco-2 celler. Den grønne farve stammer fra et antistof rettet mod peptidtransportøren, hPepT1. Den røde farve stammer fra cellekernerne, der er mærket med propidiumiodid. Det ses, at denne peptidtransportør hovedsageligt er lokaliseret i og umiddelbart under den apikale membran, som vender ind mod tarmen.



Ph.d. Birger Brodin er forskningslektor ved Institut for Farmaci.



Cand.pharm. Carsten Uhd Nielsen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci.



Ph.d. Bente Steffansen er lektor ved Institut for Farmaci.



Ph.d. Sven Frøkjær er professor ved Institut for Farmaci.

Membranforankring og peptiders terapeutiske effekt

Nogle peptider som f.eks. insulin og desmopressin, virker mere effektivt, når en kulbrintekæde kobles på molekylet. Det skyldes bl.a. en øget stabilitet i blodet, men en anden mulig årsag er, at kæden fremmer peptidets evne til at forankre sig i cellemembraner. Modelstudier kan give svar på spørgsmålet.

Af Tina Bjeldskov Pedersen, Sven Frøkjær, Ole G. Mouritsen og Kent Jørgensen

Peptider har et stort potentiale som lægemiddelstoffer, men desværre er de samtidig ustabile i blodet. Derfor er det ofte nødvendigt at modificere peptider for at opnå en forbedret terapeutisk effekt. Det kan bl.a. gøres ved at koble en kulbrintekæde på peptidet.

Kæden kaldes for en acylkæde, og nye undersøgelser viser, at acyleringen kan forlænge peptidets halveringstid i plasma markant. Årsagen er endnu ikke fuldt klarlagt, men meget tyder på, at acylerede peptider bindes til plasma-proteiner. Derved opnås en slags depoteffekt, fordi det acylerede peptid frigives over længere tid fra plasma-proteinerne.

Insulin, der anvendes til behandling af sukkersyge, og desmopressin, der hæmmer vandladning, er eksempler på peptider, som er blevet acyleret for at opnå terapeutiske fordele. I dyreforsøg har de acylerede udgaver vist sig at være mere effektive end de naturligt forekommende peptider. Det potentiale, som acylerede peptider har som lægemiddel-

stoffer, er forholdsvis uudnyttet, og der ligger et stort arbejde foran os med at afklare, hvad der egentlig sker, når de indgives i kroppen og vekselvirker med kroppens celler.

At acylering øger levetiden af peptider i blodet er næppe den eneste forklaring på, at acyleringen i nogle tilfælde forbedrer den terapeutiske virkning. En anden mulig virkningsmekanisme er, at acyleringen kan fremme peptidets evne til at forankre sig i cellemembranen.

Der findes mange naturligt forekommende membranproteiner, som er acylerede, og acyleringen menes at være naturens måde at sikre en membranforankring, som er nødvendig for den videre signalvej i cellemembranen. Desuden besidder membranproteiner ofte områder med positivt ladede aminosyrer, som kan bindes elektrostatisk til negativt ladede lipider i cellemembranen. Man mener således, at både acylkæden og områderne med ladede aminosyrer har betydning for forankringen og vekselvirkningen mellem membranproteiner og cellemembranen.

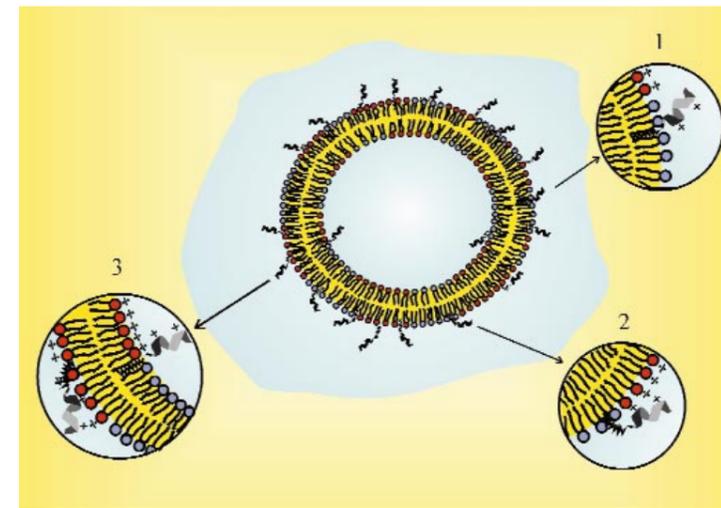
Forsøg med liposomer

Liposomer er kugleformede lipidaggregater, som afhængig af deres komposition besidder forskellige egenskaber. Liposomer er opbygget af lipider, som er vandopløselige i den ene ende og fedtopløselige i den anden. Liposomernes membran er opbygget af to lipidlag, som vender de vandopløselige hoveder udad og de fedtopløselige haler indad. Fedtopløselige stoffer vil derfor placere sig inde mellem lipidernes haler og vandopløselige stoffer vil placere sig enten på indersiden eller ydersiden af membranen. Hermed kan man anvende liposomer som målrettede transportører af lægemiddelstoffer.

Imidlertid har liposomer også en anden interessant egenskab. Liposomernes membran ligner cellemembraner, og derfor anvendes liposomer ofte som modelsystemer for cellemembraner.

For at klarlægge nogle af de grundlæggende spørgsmål omkring acylerede peptiders vekselvirkning med membraner har vi brugt liposomer som modelsystemer. Her undersøger vi, hvordan acylerede peptider påvirker liposommembranen, og hvilken effekt membranforankringen har på peptidets rumlige struktur.

For at få svar på ovenstående spørgsmål har vi fremstillet tre peptider, som er opbygget af de samme 10 aminosyrer - forskellen består i længden af acylkæden, som består af henholdsvis 2, 8 og 14 kulstofatomer. Peptiderne er positivt ladet, idet de indeholder den basiske aminosyre, histidin. Ved at undersøge de tre peptiders binding til liposomer håber vi at kunne svare på, om bindingen til membranen fortrinsvis sker på grund af acylkæden, eller på grund af elektrostatisk tiltrækning mellem det positivt ladede peptid og de negativt ladede lipider i liposomets membran.



Model af hvordan peptider kan bindes til liposomer. Forskellige scenarier er anført. 1) Peptidets acylkæde kan bore sig ned mellem lipiderne i liposomet. 2) Peptidet kan lægge sig på overfladen af liposomet. 3) Peptidet kan penetrere lipidmembranen og befinde sig på indersiden af liposomet.

Fluorescensspektroskopi

Peptiderne indeholder den fluorescerende aminosyre tryptofan, og derfor er det muligt at undersøge bindingen til liposomerne ved hjælp af fluorescensspektroskopi. Her belyses peptiderne, hvilket får tryptofan til at udsende fluorescerende lys. Intensiteten og bølglængden af dette lys afhænger af det fysiske-kemiske miljø, som omgiver peptidet.

Når et peptid befinder sig i en vandig opløsning, er lysudsendelsen svag, men intensiteten stiger, når der tilsættes liposomer til opløsningen. Desuden ændres den bølglængde, som hovedparten af lyset udsendes ved, fra 350 nanometer til 340 nanometer. Denne ændring i fluorescensintensitet og flytningen af emissionsmaximum indikerer, at peptidet binder sig til liposomet. Ændringen skyldes, at tryptofans mikroomgivelser skifter fra at være polære, når peptidet befinder sig i vand, til at være mere apolære, når peptidet binder sig til lipidmembranen.

En anden metode til at bestemme bindingen af peptider til liposomer er fluorescens-energioverførsel. Denne teknik kræver to fluorescerende molekyler. Ved at belyse peptidet med lys med en bestemt bølglængde kan tryptofan videre-sendere energien til et fluorescerende stof i liposomet, som derefter udsender lys ved en længere bølglængde end tryptofan.

Energiooverførslen kan kun finde sted hvis de to fluorescerende molekyler er i tæt kontakt, det vil sige hvis peptidet er bundet til membranen. Energioverførslen afhænger af afstanden mellem de to fluorescerende molekyler. Ved at placere fluorescerende stoffer i forskellige dybder i liposomets membran kan man få yderligere information om, hvordan peptidet bindes til lipidmembranen.

Undersøgelserne viser bl.a., at acylerede peptider kan bindes både til neutrale og delvist negativt ladede membraner, hvilket understreger acylkædens betydning for bindingen. Bindingserven stiger dog, når dele af membranen er negativt ladet, hvilket tyder på, at elektrostatisk tiltrækning ligeledes spiller en rolle for bindingen til membranen.

Binding til membranen

Der er flere mulige måder, hvorpå acylerede peptider kan binde sig til membranen. Den mest oplagte er, at peptidet indsætter acylkæden mellem lipiderne i liposomet. Hvor langt

kæden rækker ned mellem lipiderne er endnu uklart. Vi forsøger at opklare dette ved at bruge forskellige fluorescerende molekyler som sidder i forskellige dybder af membranen.

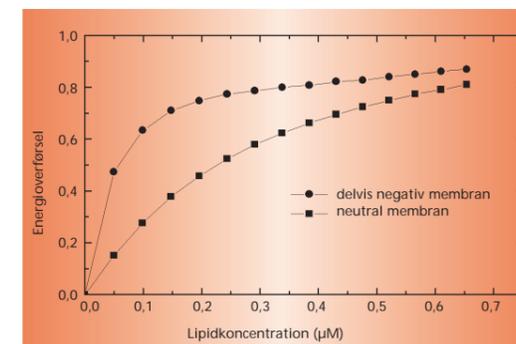
På nuværende tidspunkt kan det imidlertid ikke udelukkes, at peptidet overhovedet ikke stikker acylkæden ned i membranen. Vores første resultater viser dog, at acylkæden har en stor effekt på bindingen af peptidet til liposomet. Et tredje scenario er, at peptidet i første omgang bindes til ydersiden af membranen, og at acylkæden bevirker, at peptidet trækkes ned gennem membranen og helt ind på indersiden af liposomet.

Peptidets rumlige struktur

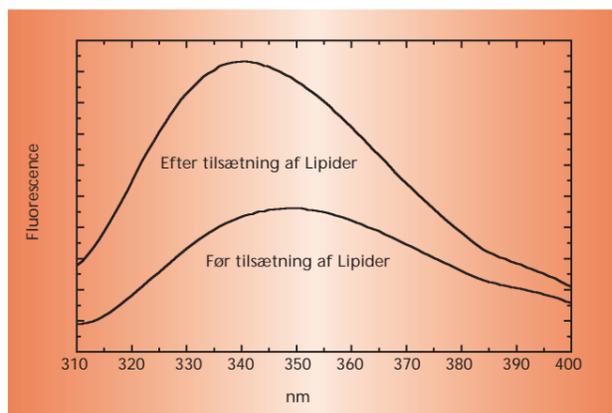
For at opnå yderligere viden om, hvordan peptiderne påvirkes ved binding til liposomer, har vi blandt andet anvendt infrarød spektroskopi (FTIR), som giver oplysninger om peptidets rumlige struktur.

Peptidet kan antage flere rumlige konformationer, som absorberer forskellige bølglængder af infrarødt lys. Ved at optage spektre af peptidet i henholdsvis vandig opløsning og sammen med liposomer, kan man undersøge, om peptidets rumlige struktur ændres ved membranforankringen.

Ved at sammenstykke data fra de forskellige teknikker er det muligt at få indsigt i, hvordan peptidet og liposomet gensidigt påvirker hinanden - og dermed også at lære noget grundlæggende om, hvad der sker med peptiderne, når de indgives i kroppen og kommer i kontakt med kroppens egne membraner.



En metode til at bestemme bindingen af et peptid til membranen er fluorescens-energioverførsel. Her er vist energioverførslen som funktion af lipidkoncentrationen. Jo højere energioverførsel, jo tættere er liposomet og peptidet på hinanden. Af figuren ses det, at peptidet har en højere affinitet til den delvist negativt ladede membran.



Ved et emissionspektrum måles fluorescensintensiteten som funktion af bølglængden. Her er vist et emissionspektrum for et acyleret peptid i vandig opløsning samt et emissionspektrum for et acyleret peptid ved tilstedeværelse af liposomer. Forskellen på de to spektre indikerer, at peptidet bindes til liposomets membran.



Cand.pharm. Tina Bjeldskov Pedersen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci.



Ph.d. Sven Frøkjær er professor ved Institut for Farmaci.



Dr.scient. Ole G. Mouritsen er professor ved Institut for Kemi, Danmarks Tekniske Universitet.



Ph.d. Kent Jørgensen er lektor ved Institut for Farmaci.

Ny nøgle til behandling af skizofreni?

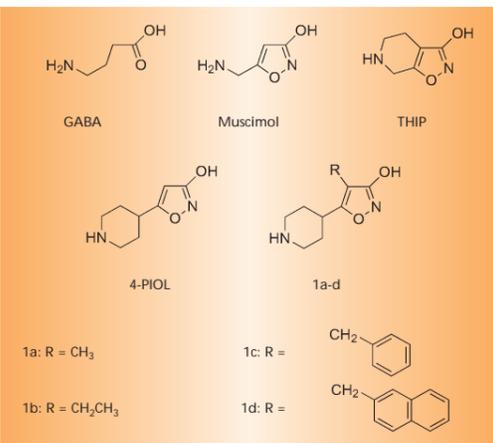
I dag behandles skizofreni med medicin, som hæmmer det signalsystem i hjernen, hvor dopamin benyttes som signalstof. Men lægemidlerne kan medføre bivirkninger, og der er brug for alternative angrebepunkter. GABA-signalsystemet er en terapeutisk mulighed.

Af Bente Frølund, Uffe Kristiansen, Tine Bryan Stensbøl og Povl Krogsgaard-Larsen

Hjernen er organismens kontrol- og kommunikationssystem, og den består af et kompliceret netværk af nerveceller. Nervcellerne kommunikerer ved hjælp af elektriske impulser, der bevæger sig gennem cellerne, og via signalstoffer, som cellerne udveksler med hinanden. Nervcellerne adskilles af en snæver kløft, og her bringer signalstofferne besked fra afsenderen videre til modtageren ved at binde sig til receptorer på modtagercellens overflade.

Da nervcellernes kommunikation er essentiel for, at organismen kan fungere på en koordineret og kontrolleret måde, er systemet meget fint afbalanceret, og ganske små forandringer kan ødelægge balancen. Adskillige sygdomme i hjernen skyldes ubalance i nervcellernes signalsystemer.

Et vigtigt redskab til at opklare, hvorfor der opstår ubalance i nervcellernes kommunikation, er modelstoffer, som selektivt vekselvirker med de involverede signalsystemer. Sådanne stoffer kan give os oplysninger om, hvordan den enkelte receptor er opbygget, hvor receptorerne er placeret, og hvilke funktioner de har i sygdomsprocesserne. I sidste ende kan undersøgelserne føre til udvikling af lægemidler, som kan forebygge, behandle eller helbrede de pågældende sygdomme.



Små strukturelle ændringer forandrer virkningen. Øverst tv. ses strukturen af signalstoffet GABA. I midten ses strukturen af muscimol, som stimulerer GABA_A-receptorer på samme måde som signalstoffet selv, mens GABA_B- og GABA_C-receptorer stort set ikke påvirkes. Øverst th. ses strukturen af THIP, som har både stimulerende og blokerende egenskaber, hvilket også gælder 4-PIOL, som er vist nederst tv. De nye stoffer 1a-1d er fremstillet med udgangspunkt i 4-PIOL. Vore undersøgelser viser, at indføring af relativt små grupper som methyl og ethyl i den centrale ringstruktur af 4-PIOL, kun har ringe effekt på bindingsevnen til GABA_A-receptorer, hvorimod indføring af en stor gruppe som naphthylmethyl øger bindingsevnen væsentligt.

GABA-systemet som angrebepunkt

Hjernens overordnede hæmmende signalstof, som dæmper aktiviteten af nervecellerne, er gamma-aminosmørsyre (GABA). Fejlfunktioner i GABA-signalsystemet er involveret i forskellige neurologiske og psykiske sygdomme som Huntingtons syge, epilepsi, Parkinsonisme, skizofreni og søvnforstyrrelser.

Da størstedelen af hjernens nerveceller indeholder receptorer for GABA, er der mange muligheder for at forbedre defekte signalprocesser med lægemidler, som påvirker GABA-systemet. GABA udøver sin effekt via tre forskellige grupper af receptorer som kaldes GABA_A, GABA_B og GABA_C. Lægemidler med angrebepunkt i GABA_A- og GABA_B-receptorer har i mange år været anvendt til at behandle angst og søvnløshed samt spastiske patienter.

Blandt flere andre signalsystemer synes GABA_A-signalsystemet at være involveret i skizofreni. Den traditionelle behandling af skizofreni er baseret på en delvis blokering af det signalsystem, hvor dopamin benyttes som signalstof. Da behandlingen kan være forbundet med alvorlige bivirkninger, er det ønskeligt at fokusere på alternative angrebepunkter. Her synes GABA-signalsystemet at være en terapeutisk mulighed.

Flere forskningsresultater støtter hypotesen om, at øget aktivitet i GABA-systemet medvirker til at frembringe symptomerne i skizofreni. Ved at undersøge hjerner fra skizofrene patienter har man således konstateret, at antallet af GABA_A-receptorer er øget i forhold til antallet hos normale individer. Desuden kan en overaktivering af GABA_A-receptorer fremkalde psykose hos normale mennesker og forstærke de psykotiske symptomer hos patienter, der lider af skizofreni. Derfor er det muligt, at en delvis blokering af GABA-systemet kan påvirke sygdomstilstanden i gunstig retning.

Blokering uden kramper

GABA blev anerkendt som et signalstof i hjernen for over 50 år siden, men alligevel har man meget begrænset viden om, hvordan GABA_A-receptoren ser ud. Ved at designe modelstoffer og undersøge i hvilken grad de bliver genkendt af receptoren, kan man få et indtryk af receptorens opbygning og dermed fastslå, hvilke strukturelle krav der skal opfyldes for at designe stoffer, som påvirker receptoren.

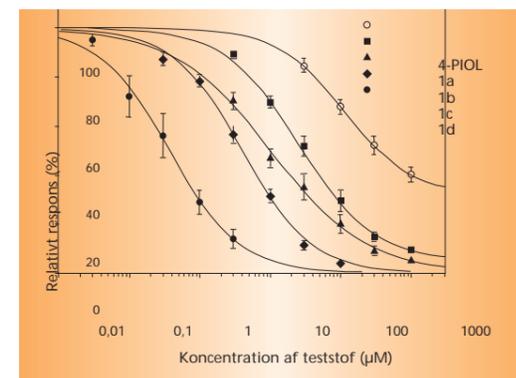
Neuromedicinalgruppen ved Institut for Medicinalkemi på DFH har gennem flere år udviklet stoffer, som vekselvirker med GABA_A-receptoren. Med udgangspunkt i naturstoffet muscimol, isoleret fra rød fluesvamp, er en lang række

stoffer blevet designet og syntetiseret. Muscimol stimulerer GABA-systemet på samme måde som signalstoffet selv, men i modsætning til GABA aktiverer muscimol stort set kun GABA_A-receptorerne, mens GABA_B- og GABA_C-receptorerne stort set ikke påvirkes. Imidlertid har muscimol vist sig at være giftigt, og stoffet nedbrydes hurtigt i den menneskelige organisme.

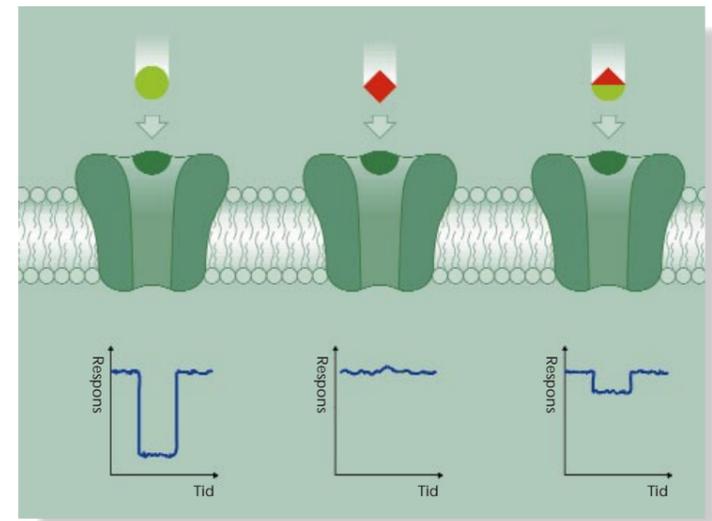
En total blokering af hjernens hæmmende signalsystem vil efter alt at dømme føre til alvorlige muskelkramper. Derfor er vor interesse specielt rettet mod stoffer, som i modsætning til muscimol kun aktiverer receptoren til et niveau, som er væsentlig lavere end 100 procent. Ved at anvende sådanne delvist aktiverende stoffer kan man opnå en begrænset receptorblokering og samtidig bibeholde en passende GABA-aktivitet, så man undgår at fremkalde muskelkramper.

For at et stof kan aktivere og blokere en receptor på samme tid, skal stoffet kunne binde sig effektivt til receptoren, men kun aktivere den i begrænset omfang. Stoffer med disse egenskaber kan være potentielle lægemidler til behandling af skizofreni.

Ud fra muscimol er stofferne THIP og 4-PIOL fremstillet, og har begge vist sig at have både aktiverende og blokerende egenskaber. THIP aktiverer receptorerne næsten lige så effektivt som GABA, mens 4-PIOL stimulerer GABA_A receptorerne i mindre grad. I kliniske forsøg har THIP vist en smertestillende og en søvndyssende effekt. Virkningen af 4-PIOL er relativt svag i forhold til både muscimol og THIP, og desuden har 4-PIOL svært ved at trænge gennem blod-hjerne-barrieren.



Isoguvacin stimulerer nervecellernes GABA_A-receptorer 100 procent. Alle de testede stoffer 1a-1d reducerer isoguvacins effekt på en koncentrationsafhængig måde. Jo lavere koncentration af teststof, der er nødvendig for at reducere responset fra isoguvacin, jo mere potent er stoffet som hæmmer af GABA_A-receptorerne.



Skematisk model af en GABA_A-receptor, hvor en fuld agonist (rød) aktiverer receptoren 100 procent, en antagonist (grøn) blokerer receptoren 100 procent, mens en partiel agonist (rød-grøn) aktiverer receptoren delvist og samtidig blokerer for GABA.

Da en terapeutiske effekt er betinget af, at stoffet når frem til hjernen og påvirker nervecellernes receptorer, har virkningens styrke og biotilgængeligheden stor betydning for den terapeutiske anvendelighed af stoffet. En øget effekt kræver, at stoffet binder sig stærkere til receptoren, mens biotilgængeligheden - her evnen til at trænge ind i hjernen - i høj grad afhænger af stoffernes vandopløselighed og fedtopløselighed. Øget fedtopløselighed vil forbedre stoffernes evne til at trænge ind i hjernen.

Nye stoffer – nye egenskaber

Med udgangspunkt i strukturen af 4-PIOL har vi forsøgt at optimere stoffets egenskaber. I den centrale ringstruktur i 4-PIOL har vi indført forskellige kemiske grupper med forskellige størrelser, og jo større de kemiske grupper er, jo mere øges stoffets fedtopløselighed. Disse strukturelle ændringer vil give information om, hvor meget plads der er i receptoren, og kan ydermere skabe ekstra vekselvirkning med receptoren, der vil føre til øget binding.

Den biologiske effekt af de fremstillede stoffer er blevet undersøgt ved hjælp af receptorbinding på væv, som er isoleret fra rottehjerner. Her tester man, om stofferne binder til GABA_A-receptorer. Resultaterne viser, at indføring af relativt små grupper, som methyl og ethyl i den centrale ringstruktur af 4-PIOL kun har ringe effekt på bindingsevnen, hvorimod indføring af en stor gruppe som naphthylmethyl øger bindingsevnen væsentligt.

Vi har også anvendt et andet testsystem, hvor stoffernes evne til enten at aktivere og blokere GABA_A-receptorerne kan måles. Resultaterne viser, at stoffer med mindre grupper er i stand til at aktivere og blokere receptoren på samme tid. Derimod hindrer større grupper aktivering af GABA_A-receptoren. Især forbindelsen med naphthylmethyl var særdeles effektiv til at blokere receptorerne.

Med de fremstillede stoffer har vi opnået en væsentlig forbedret binding til receptoren og samtidig øget sandsynligheden for, at stofferne kan transporteres over blod-hjerne-barrieren. Selv om modelstofferne ikke umiddelbart kan anvendes medicinsk, har de stor interesse som udgangspunkt for design af lægemidler. Desuden har resultaterne af det beskrevne projekt givet værdifuld information om receptorens opbygning, og de fremstillede stoffer skal nu anvendes til yderligere karakterisering af receptorens sammensætning og funktion.



Ph.d. Bente Frølund er lektor ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Uffe Kristiansen er lektor ved Institut for Farmakologi.



Ph.d. Trine Bryan Stensbøl er forskningsadjunkt ved Institut for Medicinalkemi.



Dr.pharm. Povl Krogsgaard-Larsen er professor ved Institut for Medicinalkemi.

Hjernens cannabislignende stoffer modvirker ner vedød

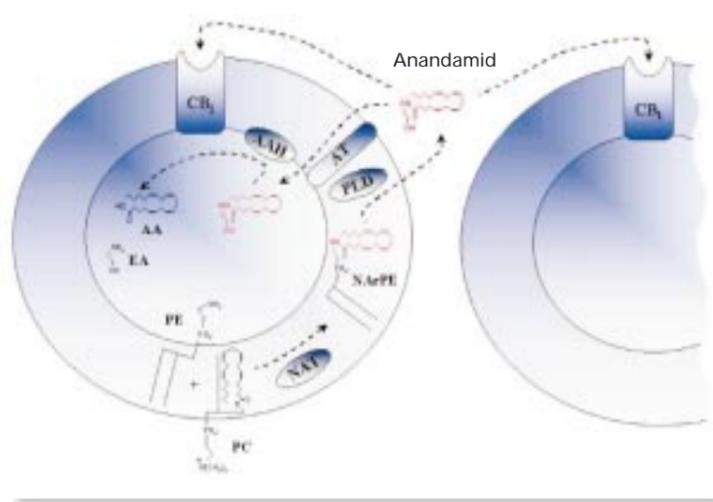
Hjernen har et stort antal receptorer, der aktiveres af det psykoaktive stof i hash, og hjernen danner selv lignende stoffer, som kan modvirke nervecelledød som følge af overbelastning. Denne effekt kan måske udnyttes til behandling af neurodegenerative sygdomme, bl.a. Parkinsons sygdom.

Af Henrik H. Hansen, Steen Honoré Hansen og Harald S. Hansen

Planten *Cannabis sativa*, hvorfra hash og marihuana produceres, er i årtusinder blevet anvendt som lægemiddel, især på grund af plantens mentalt og fysisk afslappende effekt. Men mekanismen for plantestoffernes indvirkning på processerne i hjernen blev først opdaget for 12 år siden.

Cannabisplantens bioaktive stoffer, især Δ^9 -tetrahydrocannabinol, påvirker hjernen via aktivering af specifikke receptorer på nervecellernes overflader, kaldet cannabinoide receptorer, som findes i meget stort antal næsten overalt i hjernen. Ligesom hjernen rummer et system af morfinlignende signalstoffer, endorfiner, der virker via opioide receptorer, så har man fundet signalstoffer i hjernen, der stimulerer cannabinoide receptorer.

Signalstofferne kaldes endocannabinoide, og der er hidtil identificeret to forskellige typer i hjernen, anandamid og 2-arachidonoyl-glycerol. Deres frisætning finder sted ved enzymatisk spaltning af forstadier i hjernecellernes membra-



ner, og denne proces kan formentlig stimuleres af andre signalstoffer i hjernen, f.eks. glutaminsyre.

Endocannabinoide aktivering af hjernens cannabinoide receptorer medfører en dæmpende effekt på mange basale hjernecellefunktioner. Nyere forskning har vist, at de cannabinoide receptorer er placeret således, at de kan dæmpe signaltransmissionen mellem hjerneceller.

Dæmper hjerneaktivitet

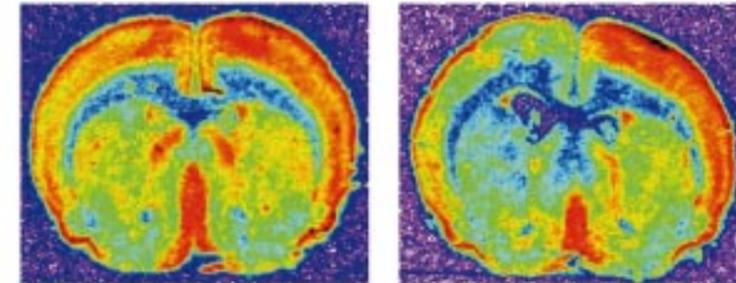
Evnen til at dæmpe hjerneaktivitet er interessant fra et farmakologisk synspunkt. Skadelig overaktivering af nerveceller optræder nemlig i relation til flere uhelbredelige, neurodegenerative sygdomme. Farmakologisk stimulering af de cannabinoide receptorer kan derfor rumme en ny nøgle til at modvirke sygdomsprocesserne.

Overaktiveringen skyldes især, at nervecellerne udsender forøgede mængder af det stimulerende signalstof, glutaminsyre. Herved overstimuleres forskellige typer nerveceller, og ved vedvarende overstimulering går cellerne til grunde.

Ved anvendelse af dyrkede hjerneceller udsat for skadelige påvirkninger har man opdaget, at døende hjerneceller har en forøget evne til at danne endocannabinoide og deres forstadier. Her har det vist sig, at tilsætning af syntetiske endocannabinoide til cellekulturene reducerer omfanget af celledøden, formentlig ved at dæmpe aktiviteten i glutaminsyre-signalsystemet. Dette nyopdagede fænomen tolkes som en mekanisme, som ved lokal beskadigelse af nerveceller kan opretholde forøget aktivitet af cannabinoide receptorer i nabocellerne, hvilket modvirker spredning af celledøden.

En central del af forskningen i cannabinoide receptorer og endocannabinoide er derfor rettet mod sygdomsprocesser i hjernen, der medfører stort og uopretteligt tab af hjerneceller, hvilket er karakteristisk for de neurodegenerative sygdomme. Det er således muligt, at forskningen vil kunne pege på nye terapeutiske principper i behandlingen af bl.a. Parkinsons og Huntingtons sygdomme.

Forstadiet til endocannabinoide anandamid, NArPE, dannes i nervecellernes cellemembran. Det sker ved overførsel af arachidonsyre-enheden af phosphatidylcholin (PC) til phosphatidylethanolamin (PE), en reaktion der katalyseres af enzymet N-acyltransferase (NAT). NArPE nedbrydes herefter vha. enzymet phospholipase D (PLD), hvorefter anandamid frisættes til cellens omgivelser. Anandamid kan aktivere cellens egne og nærliggende nervecellers cannabinoide receptorer (CB1) ved at binde sig til receptorerne. Anandamid genoptages af cellerne ved hjælp af en anandamid transportør (AT). Herefter inaktiveres anandamid ved enzymatisk nedbrydning til arachidonsyre (AA) og ethanolamin (EA), en proces der katalyseres af enzymet anandamid amidohydrolase (AAH).



KONTROL

NMDA

Mængden af de cannabinoide receptorer i hjernesnit kan måles indirekte ved at bestemme aktiviteten af genet, som koder for dannelsen af receptorerne. Målingen udføres ved at måle på genproduktet, messenger-RNA. Billedet til venstre viser et snit fra en normal rottehjerne. Til højre ses et hjernesnit fra en rotte, der har modtaget en direkte injektion af NMDA i venstre hjernehalvdel, hvilket medfører ner vedød, fordi nervecellernes receptorer for signalstoffet glutaminsyre overstimuleres. Den venstre hjernehalvdel udviser et stort tab af messenger-RNA, især i hjernebarken og det omgivende væv. En tilsvarende effekt er observeret for de cannabinoide receptorer i hjernen efter injektion af NMDA.

Det cannabinoide system

Der er imidlertid behov for eksperimentelle studier, som kan afklare, hvordan hjernens produktion af endocannabinoide og funktionen af de cannabinoide receptorer påvirkes af neurodegenerative sygdomsprocesser.

I samarbejde med en forskergruppe i Berlin har vi derfor anvendt dyremodeller for hjernecelledød for at belyse, hvilken neurodegenerativ sygdomsproces, der spiller størst rolle for aktiveringen af det endocannabinoide system i den levende hjerne.

Vi anvendte unge rotter, fordi de i højere grad end voksne rotter er følsomme overfor neurodegenerative påvirkninger. Den neurodegenerative effekt fremkaldes ved injektion af stoffet NMDA (N-methyl-D-asparaginsyre), som aktiverer nervecellernes receptorer for glutaminsyre, hvilket fører til overstimulation af nervecellerne, eller med stoffet MK-801, som blokerer receptorerne med det resultat, at nervecellerne understimuleres. I begge tilfælde forstyrres nervecellernes normale aktivitetsniveau, hvilket medfører, at hjerneceller i sensitive hjerneområder går til grunde.

Ydermere undersøgte vi, hvordan det endocannabinoide system påvirkes i forbindelse med kraftig hjernerystelse, fordi følgevirkningerne af hjernerystelse i unge rotter har fællestræk med en kombineret effekt af NMDA og MK-801.

Specifik celledødsproces

Endocannabinoide dannes som følge af enzymatisk omdannelse af deres forstadiestoffer. Da endocannabinoide koncentration i hjerneceller primært bestemmes af koncentrationen af forstadiestofferne, er det vigtigt at bestemme mængde af disse stoffer i hjernen.

Vi har udviklet en meget følsom analysemetode til bestemmelse af anandamids forstadiestof, NArPE, som findes i ekstremt lave koncentrationer i hjernevæv. Denne analysemetode er baseret på en avanceret udgave af massespektrometri. Teknikken bruges til at bestemme mængden af et bestemt stof i en vævsprøve ved at programmere massespektrometret til at analysere for stoffets præcise molekyle-

vægt. NArPE kan bestemmes med stor nøjagtighed i oprensede hjernevævsprøver i kvantiteter, der udgør mindre end ét nanogram.

Vi analyserede tilstedeværelsen af NArPE i vævsprøver fra hjernebarken, og det viste sig, at kun NMDA og hjernerystelse forøgede koncentrationen af NArPE. Især overstimulation af receptorerne for glutaminsyre ved hjælp af NMDA forårsagede en uhyre kraftig stigning i niveauet af NArPE i hjernebarken.

Man ved, at NMDA forårsager omfangsrig spredning af hjernecelledød i unge rotter som følge af en mekanisme, der betegnes som nekrotisk - en betændelseslignende reaktion, hvorunder cellemembranen går i stykker, og nervecellen dør. På den baggrund antager vi, at især nekrotiske celledødsprocesser stimulerer aktiviteten af det enzym, der danner det endocannabinoide forstadiestof, NArPE.

I samarbejde med en forskergruppe i USA er vi nu i færd med at undersøge vævsprøverne for indholdet af de cannabinoide signalstoffer anandamid og 2-arachidonoyl-glycerol.

Tab af cannabinoide receptorer

Vi har også undersøgt, hvorledes niveauet af cannabinoide receptorer påvirkes af NMDA. Dette studie udførtes i samarbejde med en forskergruppe i Madrid under ledelse af Dr. Javier Fernández-Ruiz. Resultaterne viser, at hjernecelledød medfører et kraftigt tab af cannabinoide receptorer i en lang række hjernestrukturer, men især i hjernebarken og omkringliggende hjerneområder.

Vi kan derfor konkludere, at der ved beskadigelse af hjerneceller mistes cannabinoide receptorer i bestemte områder af hjernen, men at der i de samme områder akkumuleres endocannabinoide forstadiestoffer. Det er muligt, at denne effekt på den endocannabinoide syntesevej begrænser celledøden i hjernen ved at forøge aktiviteten af de tilbageværende cannabinoide receptorer. Derfor undersøger vi nu, om anvendelse af syntetiske cannabinoide signalstoffer kan forhindre udbredelsen af hjernecelledød i de beskadigede hjerneområder.



Cand.pharm. Henrik H. Hansen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi.



Dr.pharm. Steen Honoré Hansen er professor ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Dr.scient. Harald S. Hansen er docent ved Institut for Farmakologi.

Øget forståelse af vigtig receptor i hjernen

Signalstoffet glutaminsyre spiller en central rolle for nervedøden i flere neurodegenerative sygdomme, og derfor er der stor farmaceutisk interesse i nervecellernes receptorer for stoffet. Vi har kortlagt, hvordan glutaminsyre binder sig til en receptor og har kastet lys over, hvordan receptoren fungerer.

Af Anders A. Jensen og Hans Bräuner Osborne

En receptor er et protein i cellemembranen, som oversætter et ydre signal til forandringer i cellens biokemiske processer. Hjernens nerveceller rummer adskillige receptorer, som aktiveres af forskellige signalstoffer, som formidler nervecellernes indbyrdes kommunikation. Når et signalstof bindes til receptoren, videregiver receptoren signalet til cellens indre.

Et af de mest udbredte signalstoffer i hjernen og centralnervesystemet er det stimulerende signalstof glutaminsyre. Glutaminsyre udøver sin effekt via to typer af receptorer; de ionotrope og de metabotrope receptorer. De metabotrope receptorer tilhører en stor familie af receptorer, der alle formidler deres effekt gennem de såkaldte G-proteiner, som udgør omstillingsbordet til cellens interne biokemiske maskineri.

Der har længe været stor interesse for de metabotrope glutaminsyre-receptorer, da de er interessante mål i behandlingen af en række neurologiske og psykiatriske lidelser. De mest anerkendte terapeutiske mål for stoffer, der virker på disse receptorer, er behandlingen af sygdomme som epilepsi, iskæmi og flere neurodegenerative lidelser, hvoriblandt Alzheimers sygdom er den mest kendte. Samtidig tyder adskillige undersøgelser på, at lidelser som angst, skizofreni og visse former for smerte med succes vil kunne behandles med stoffer, som målrettes mod de metabotrope receptorer for glutaminsyre.

Man har klonet otte forskellige metabotrope receptorer for glutaminsyre, kaldet mGluR1-8. Stimulation af hver af disse otte receptorer medfører forskellige påvirkninger af de interne processer i cellen. Derfor er egenskaberne af de stoffer, der binder til den enkelte receptor vigtige set fra en terapeutisk synsvinkel.

I flere neurodegenerative og psykiske sygdomme er koncentrationen af glutaminsyre forhøjet i hjernen, hvilket fører til overstimulering af nervecellerne, som beskadiges eller dør. Når glutaminsyre binder sig til mGluR1 og mGluR5 øges cellens aktivitetsniveau, og derfor er man interesseret i stoffer, der hæmmer eller blokerer signalet gennem disse receptorer. Når glutaminsyre binder sig til de resterende seks receptorer, dæmpes cellens aktivitetsniveau. Derfor ønsker man her lægemiddelstoffer, der stimulerer disse receptorer.

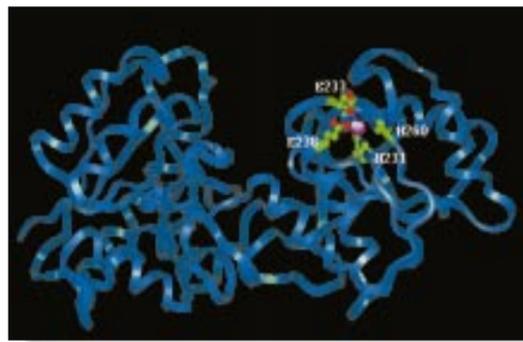
En computermodel testes

Som alle andre G-protein-koblede receptorer besidder de metabotrope receptorer for glutaminsyre en kæde, som gennemskærer cellemembranen syv gange. Derimod adskiller mGlu-receptorerne sig markant fra de øvrige receptorer ved at have en usædvanligt stor del af receptoren på ydersiden af membranen.

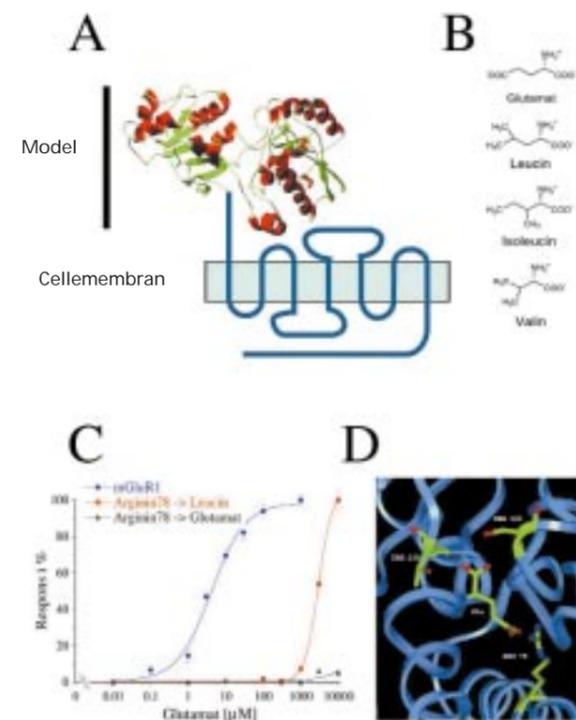
For godt syv år siden opdagede forskere hos Novo Nordisk og firmaets datterselskab ZymoGenetics, at aminosyresekvensen af den ydre del af receptoren minder om en familie af proteiner, som findes i bakterier. Denne opdagelse skulle hurtigt vise sig at blive en milepæl i udforskningen af de metabotrope receptorer for glutaminsyre. Strukturen af et af disse bakterieproteiner var nemlig tidligere blevet bestemt ved hjælp af røntgenkristallografi, og på baggrund af denne krystalstruktur konstruerede ZymoGenetics og Novo Nordisk en computermodel af den ydre del af mGluR1. I følge modellen består den ydre del af receptoren af to domæner, der sammen danner en kløft.

Det er kendt fra bakterieproteinet, at forskellige aminosyrer bindes nede i kløften til det ene af disse to domæner. Glutaminsyre er ligeledes en aminosyre, og man går ud fra, at den ydre del af mGluR1 eksisterer i to former; en åben, inaktiveret form og en lukket, aktiveret form, hvortil glutaminsyre er bundet efter samme princip som i bakterieproteinet.

Computermodeller er kun til nytte i forskning, hvis de til en rimelig grad afspejler virkeligheden. Derfor er det vigtigt



Når zink bindes til den muterede mGluR1, hæmmes signalet fra glutaminsyre gennem receptoren, og princippet vil være brugbart i design af lægemiddelstoffer. Receptorens bindingslomme indeholder to domæner, og zink bindes til det domæne, som ikke binder glutaminsyre.



Glutaminsyre-receptoren mGluR1 har en kæde, som skærer sig gennem cellemembranen syv gange samt en stor ydre del, der danner en kløft, hvori signalstoffet bindes (A). I (B) ses den kemiske struktur af glutaminsyre samt af tre andre aminosyrer, som bindes til et bakterielt protein, som strukturelt minder om mGluR1. Glutaminsyre har imidlertid en ekstra carboxylsyregruppe (tv. i strukturen). Vore forsøg viser, at denne gruppe bindes til aminosyren Arginin 78 i receptorens ydre del. Bindingsevnen falder dramatisk, når Arginin 78 muteres til leucin eller glutaminsyre (C). I (D) ses modellen af, hvordan glutaminsyre bindes til receptoren. Grunddelen kobler sig til aminosyrerne Threonin188 og Serin165, mens carboxylsyregruppen bindes til Arginin78.

at udfordre modellerne. Det gjorde ZymoGenetics og Novo Nordisk-forskerne selv i 1993 ved at demonstrere, at to specifikke aminosyrer i receptoren binder grunddelen af glutaminsyre. Det blev gjort ved at udskifte de to bindende aminosyrer i mGluR1 med andre aminosyrer.

Mutationerne af de to bindende aminosyrer, Serin165 og Threonin188, reducerede på dramatisk vis glutaminsyres evne til at binde sig til receptoren og aktivere den. Dette var den første stærke indikation af, at homologien mellem bakterieproteinet og mGluR1 ikke var tilfældig, og at den konstruerede computermodel ville blive til stor gavn for forståelsen af receptorens aktiveringsmekanismer.

Binding til receptoren

Man vidste altså nu, at grunddelen af glutaminsyre bindes til to specifikke aminosyrer i kløften på receptorens ydre del. Vort næste mål var at finde ud af, hvor den sidste funktionelle gruppe i glutaminsyre, en carboxylsyregruppe, bindes i mGluR1.

Her kunne vi ikke bruge bakterieproteinet som udgangspunkt, da de tre aminosyrer, der binder til bakterieproteinet ikke har denne carboxylsyregruppe. Imidlertid viste modellen, at en bestemt aminosyre i glutaminsyre-receptoren, Arginin78, lå i en afstand fra Serin165 og Threonin188, der muliggjorde, at glutaminsyre kunne binde sig til alle tre. Glutaminsyrens negativt ladede carboxylsyregruppe ville kunne danne en saltbro til den funktionelle gruppe af Arginin78, der er positivt ladet.

For at teste hypotesen muterede vi Arginin78 til en anden aminosyre, leucin, og konstaterede, at dette markant svækkede glutaminsyres evne til at aktivere receptoren. I en anden mutant blev Arginin78 muteret til en glutaminsyre, og det resulterede i, at receptoren blev helt ude af stand til at blive aktiveret af signalstoffet. Dette kan forklares med, at de to negativt ladede carboxylsyregrupper, der møder hinanden i bindingen i denne mutant, frastøder hinanden.

Konklusionen er, at Arginin78 i mGluR1 udgør den tredje part i bindingen af glutaminsyre, som forudsagt af computermodellen.

Et zink-bindingssted konstrueres

Hvis teorien om, at den ydre del af mGlu receptorerne findes i en åben, inaktiveret form og en lukket, aktiveret form holder stik, kan man forestille sig, at signalet gennem receptoren kan hæmmes ved at blokere for sammentrækningen af receptorens ydre del. For at undersøge om dette princip kunne udnyttes i medicinsk sammenhæng benyttede vi os af, at metalionen zink (Zn^{2+}) kan bindes til aminosyrerne histidin, cystein, asparaginsyre og glutaminsyre. Via introduktion af disse aminosyrer i bestemte positioner i forhold til hinanden i receptoren skabes der bindingssteder for zink.

Vi valgte at konstruere et bindingssted for zink i toppen af det domæne i den ydre del af mGluR1, som ikke binder glutaminsyre. Forsøgene viste, at bindingen af zink til den modsatte side af bindingsstedet for glutaminsyre hæmmer signalet gennem receptoren. Vores hypotese er, at zink-bindingen trækker strenge i dette område af receptorens ydre del sammen og derved forhindrer den sammentrækning af hele den ydre del, som er nødvendig for at glutaminsyre kan aktivere receptoren. Dette princip vil være brugbart i design af lægemiddelstoffer, som kan blokere mGluR1. Som tidligere nævnt er sådanne stoffer af stor interesse fra en terapeutisk synsvinkel.

Som det vil være fremgået, har den konstruerede computermodel af mGluR1's ydre del vist sig at være meget repræsentativ for virkeligheden, og modeller af de ydre dele af andre metabotrope receptorer er nu blevet udarbejdet ud fra samme princip. Flere forskergrupper arbejder nu intenst på at opnå en krystalstruktur af den ydre del af mGluR1 og andre af de metabotrope receptorer for glutaminsyre. En sådan struktur vil udgøre den næste milepæl i forskningen.



Cand.pharm.
Anders A. Jensen
er ph.d.-studerende
ved Institut for
Medicinskemi.



Ph.d. Hans Bräuner-
Osborne er
forskningsadjunkt
ved Institut for
Medicinskemi.

Design af lægemidler mod Alzheimers sygdom

Målet i moderne lægemiddelforskning er ofte at designe lægemidler, som påvirker flere processer i en sygdom. I håb om at udvikle lægemidler til behandling af Alzheimers sygdom, arbejder vi med et modelstof, som både har en aktiverende og en beskyttende funktion på en receptor, der spiller en central rolle i sygdommen.

Af Stine Byskov Vogensen, Tine Bryan Stensbøl, Jan Egebjerg, Karla Frydenvang, Tommy Nørskov Johansen og Povl Krogsgaard-Larsen

Den frygtede og dødeligt forløbende Alzheimers sygdom er genstand for intens forskning verden over, men på trods af en formidabel forskningsmæssig indsats er det stadig kun lykkedes at udvikle lægemidler, som i meget begrænset omfang kan forhale sygdomsforløbet og dæmpe symptomerne.

Alzheimers sygdom er en progressiv neurodegenerativ sygdom. Her er det især et system af nerveceller, der anvender acetylcholin som signalstof, som går til grunde, hvilket fører til, at patienten gradvist mister evnen til at lære og at huske. Kortlægningen af de processer, der ødelægger disse nerveceller, er langt fremme. Man har identificeret en lang række mekanismer, som uafhængigt af hinanden eller i samspil fører til, at nervecellerne dør i forbindelse med sygdommen.

Det centrale problem er at omsætte den omfattende viden til design af effektive lægemiddelstoffer. Et af de væsentlige problemer ligger i, at det i mange tilfælde er svært at finde ud af, hvad der er årsag til degenerationen af de pågældende nerveceller, og hvilke fejlfunktioner, der er forårsaget af, at cellerne bliver ødelagt.

Interessen har i flere år blandt andet været rettet mod det system af nerveceller, der overordnet driver hjernens funktion, og som anvender glutaminsyre som signalstof. Dette meget energikrævende signalsystem har en direkte eller indirekte stimulerende virkning på langt de fleste nerveceller og altså også på acetylcholin-nervecellerne. Meget tyder på, at henfaldet af acetylcholin-nerveceller blandt andet skyldes vedvarende overstimulation fra hyperaktive glutaminsyre-nerveceller. Det er henfaldet af acetylcholin-nerveceller, som ligger til grund for Alzheimerpatienternes tiltagende svækkelse og efterhånden fuldstændige tab af evne til indlæring og hukommelse.

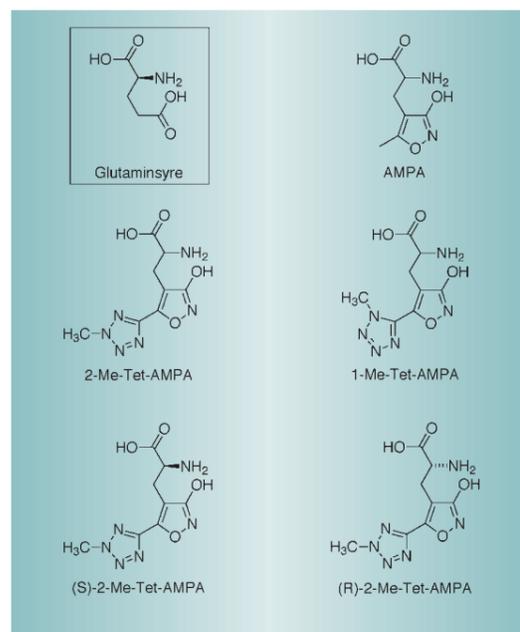
Udforskning af et paradoks

Behovet for på én gang at stimulere acetylcholin-nervecellerne og undgå, at de overstimuleres, skaber et paradoks set ud fra et behandlingssynspunkt. Ved at styrke glutaminsyre-nervecellernes evne til at stimulere de hensygnende acetylcholin-nerveceller i hjernen ville det være muligt at afhjælpe patienternes problemer med indlæring

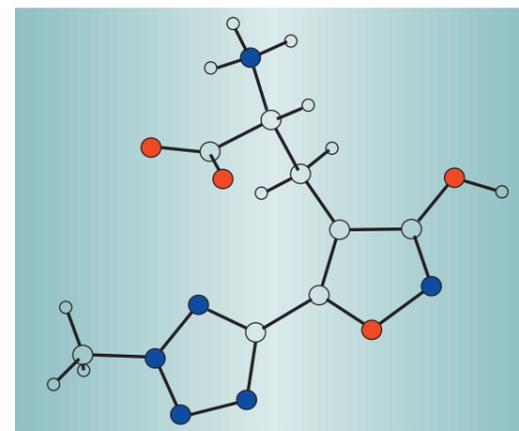
og hukommelse. Men samtidig vil det være nødvendigt at blokere de receptorer på acetylcholin-nervecellerne, som også formidler glutaminsyrens ødelæggende overstimulation af nervecellerne.

Spørgsmålet er altså, om det er muligt at designe lægemiddelstoffer, som både kan stimulere og beskytte receptorerne for glutaminsyre på de truede nerveceller, som spiller en nøglerolle i sygdommen. Det er et af de problemer, som de medicinalkemiske forskere arbejder med i forbindelse med Alzheimers sygdom.

Der findes mange forskellige receptorer i hjernen for signalstoffet glutaminsyre. En gruppe af disse receptorer betegnes AMPA-receptorer, opkaldt efter stoffet AMPA, som tidligere er blevet udviklet på Institut for Medicinalkemi ved DFH. AMPA-receptorerne findes bl.a. på acetylcholin-nerve-



I rammen ses strukturen af hjernens overordnede stimulerende signalstof glutaminsyre. Stoffet 2-Me-Tet-AMPA er et nyt modelstof, som aktiverer den undergruppe af glutaminsyre-receptorer, som betegnes AMPA-receptorer og som selektivt aktiveres af stoffet AMPA. Den nærtbeslægtede forbindelse 1-Me-Tet-AMPA er derimod inaktiv. Effekten af 2-Me-Tet-AMPA ligger i S-formen af stoffet, hvorimod (R)-2-Me-Tet-AMPA er inaktiv.



Strukturen af (R)-2-Me-Tet-AMPA bestemt ved en røntgenkrystallografisk analyse.

celler, der spiller en rolle i forbindelse med sygdomsprocesserne i Alzheimers sygdom. I samarbejde med forskere på H. Lundbeck A/S har instituttet udviklet en forbindelse 2-Me-Tet-AMPA, som uhyre effektivt aktiverer AMPA-receptorerne.

Nyt modelstof

Aktiviteten af stoffet er karakteriseret ved en høj grad af strukturel specificitet forstået på den måde, at blot en lille ændring i modelstoffets kemiske struktur betyder, at stoffet ikke længere kan aktivere AMPA-receptorerne. Dette forhold understreges af, at den strukturelt nært beslægtede forbindelse 1-Me-Tet-AMPA er inaktiv.

Ydermere spiller den rumlige opbygning af stoffet en central rolle for aktiviteten på AMPA-receptorerne. Modelstoffet findes i to spejlbilledformer, der kemisk set er ens, men som har en forskellig rumlig facon; man kan sammenligne med højre og venstre hånd. De to spejlbilledformer kaldes henholdsvis S- og R-formen. Her er det kun den spejlbilledform, der har S-konfiguration, som er i stand til at aktivere AMPA-receptorerne, medens R-formen er totalt inaktiv. Den rumlige opbygning af de to former af 2-Me-Tet-AMPA er blevet vist ved en røntgenkrystallografisk undersøgelse.

Disse forhold illustrerer tydeligt, at de terapeutiske angrebsskud skal støbes med stor præcision indenfor dette område af forskningen i lægemidler til behandling af Alzheimers sygdom.

(S)-2-Me-Tet-AMPA har en høj grad af strukturel og kemisk lighed med AMPA-receptorerens naturlige signalstof, glutaminsyre, og stoffet aktiverer tilmed AMPA-receptorerne effektivt. Men spørgsmålet er, om en sådan forbindelse samtidig kan have en beskyttende effekt på disse receptorer. Umiddelbart er svaret nej, men det har faktisk vist sig i studier på enkeltceller, at AMPA-receptorerne efterhånden bliver ufølsomme over for (S)-2-Me-Tet-AMPA ved vedvarende akti-

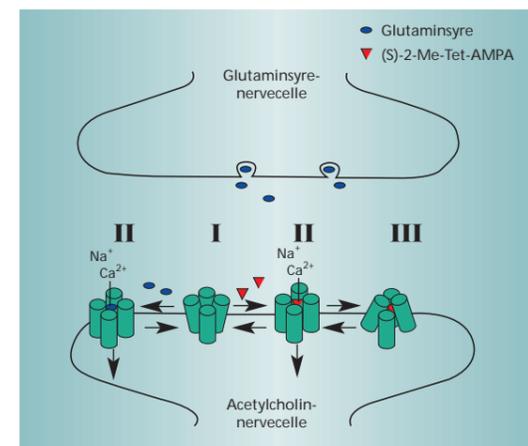
vering. Denne reaktion kaldes receptor desensibilisering, fordi receptorenes følsomhed overfor stoffet gradvist forsvinder.

I det foreliggende tilfælde er desensibiliseringen af AMPA-receptorerne så effektiv, at stoffet faktisk blokerer receptorerne, så de ikke kan aktiveres.

Dobbelt virkning

(S)-2-Me-Tet-AMPA er således et sjældent eksempel på en forbindelse, som både har en stimulerende og blokerende virkning på AMPA-receptorerne, hvor den sidstnævnte effekt skyldes desensibilisering. Stoffet er altså et modelstof for et lægemiddel, som i princippet påvirker AMPA-receptorerne på den ønskede dobbelte måde.

Man må naturligvis holde sig for øje, at disse egenskaber ved stoffet er registreret gennem undersøgelser på enkeltceller, og vi ved endnu intet om, hvordan virkningen vil være på acetylcholin-nerveceller i hjernen hos forsøgsdyr eller i Alzheimerpatienter. Men der er gjort en interessant opdagelse, og fortsat forskning vil vise, om (S)-2-Me-Tet-AMPA kan videreudvikles til et effektivt lægemiddel.



Overstimulering med signalstoffet glutaminsyre medvirker til, at acetylcholin-nerveceller henfalder og dør i Alzheimers sygdom. Figuren viser en af receptorerne for glutaminsyre, AMPA-receptoren, i en lukket, inaktiv tilstand (I). Ved binding af glutaminsyre eller (S)-2-Me-Tet-AMPA aktiveres AMPA-receptoren, hvorved receptorens ionkanal åbnes (II). Bindningen af (S)-2-Me-Tet-AMPA efterfølges af en konformationsændring af AMPA-receptoren, således at ionkanalen næsten lukkes. AMPA-receptoren desensibiliseres (III), hvilket vil sige, at receptorens følsomhed overfor (S)-2-Me-Tet-AMPA og glutaminsyre forsvinder. Som vist i figuren er konformationsændringerne reversible.



Cand.pharm. Stine Byskov Vogensen er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Tine Bryan Stensbøl er forskningsadjunkt ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Karla Frydenvang er forskningslektor ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Tommy Nørskov Johansen er lektor ved Institut for Medicinalkemi.



Dr.pharm. Povl Krogsgaard-Larsen er professor ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Jan Egebjerg er lektor ved Institut for Molekylær og Strukturel Biologi ved Århus Universitet og afdelingsleder ved afdelingen for Molekylær Genetik, H. Lundbeck A/S.

Design af lægemidler mod neurodegenerative sygdomme

Signalstoffet glutaminsyre er involveret i bl.a. Alzheimers sygdom og akutte hjerneskader. Det er nu muligt at bestemme den tredimensionelle struktur af bindingsstedet i receptorer for glutaminsyre. Det åbner vejen for en forståelse for receptorernes funktion og for målrettet design af nye lægemidler.

Af Anders Hogner, Marie-Louise Lunn, Jette Sandholm Kastrup, Ingrid Kjølner Larsen, Tommy Liljefors og Jan Egebjerg

Glutaminsyre er hjernens vigtigste stimulerende signalstof, som er involveret i mange vigtige funktioner, f.eks. indlæring og hukommelse. Men glutaminsyre er et tveægget sværd. Når koncentrationen af signalstoffet bliver for høj i hjernen, overstimuleres nervecellerne, og de går til grunde. Det sker i en række neurodegenerative sygdomme, som spænder fra den langsomt fremadskridende senilitet i Alzheimers sygdom til akutte hjerneskader, som opstår ved hjerneblødning og hjertestop.

Glutaminsyre aktiverer mange typer af receptorer, og for at beskytte hjernens nerveceller mod overstimulering er det vigtigt at udvikle lægemiddelstoffer med specifik virkning på de enkelte receptortyper.

Der er to hovedgrupper af glutaminsyre-receptorer, som kaldes ionotrope og metabotrope. De ionotrope receptorer inddeles videre i tre grupper, NMDA, AMPA og kainisyre-receptorer. For hver af disse grupper er der forskellige receptortyper alt efter, hvilke underenheder receptorerne består af. AMPA-receptorerne er et proteinkompleks i cellemembranen, bestående af fire eller fem af underenhederne GluR1-4, mens kainisyre-receptorerne er sat sammen af underenhederne GluR5-7 og KA1-2.

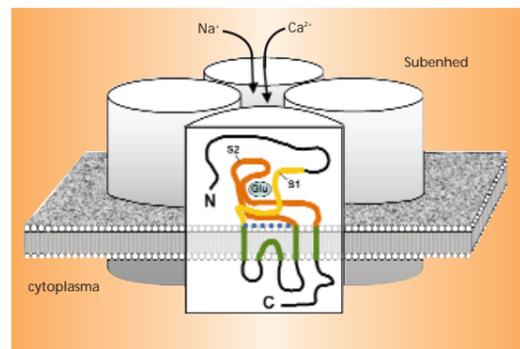
Underenhederne ligner hinanden meget med hensyn til rækkefølgen af de aminosyrer, de er opbygget af. Men alligevel har de vidt forskellige rumlige faconer. Det medfører, at der er forskel på, hvor godt de forskellige receptortyper binder stoffer, som har en stimulerende eller hæmmende virkning på receptoren.

Receptormodeller

Det er vigtigt at kunne designe lægemiddelstoffer med specifik virkning på de enkelte typer af receptorer. Det har ikke tidligere været muligt på grund af manglende viden om strukturen af de enkelte underenheder.

I den seneste tid er situationen imidlertid blevet ændret radikalt. Med genteknologi kan man nu fremstille den del af receptoren, som binder glutaminsyre og lægemiddelstoffer. Det har vist sig, at bindingslommen findes på ydersiden af cellemembranen mellem to proteinkæder, som kaldes for S1 og S2.

Ved hjælp af genteknologi er det lykkedes at klippe begge kæder af ved cellemembranen og erstatte de dele af receptoren, som går gennem membranen, med en kort peptidkæde. Derved har man opnået et mindre protein, som har bevaret sin evne til at binde signalstoffer og lægemiddelstoffer. Miniproteinet kan derfor anvendes som en model for receptoren.



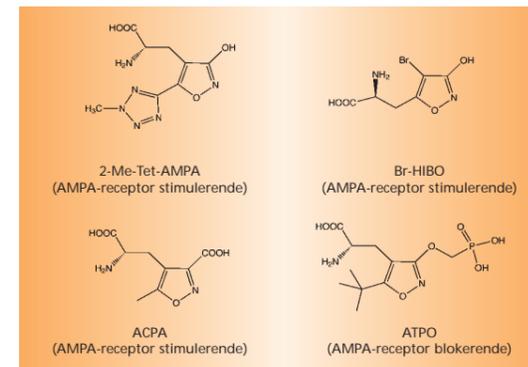
Modeltegning af en ionotrop glutaminsyre-receptor bestående af fire underenheder indlejret i cellemembranen. I den ene underenhed er vist den bindingslomme for signalstoffer, som peptidene S1 og S2 danner. Den punkterede streg illustrerer den peptidkæde, der er sat ind ved hjælp af genteknologi i stedet for de dele af underenheden, der normalt går gennem cellemembranen. På den måde er det lykkedes at fremstille en miniudgave af proteinet, som kan krystalliseres og strukturbestemmes ved røntgenkrystallografi.

Røntgenkrystallografi viser strukturen

Fordelen ved miniproteinet er, at chancen for, at proteinet er krystalliserbart, øges væsentligt. At krystallisere proteinet er en nødvendighed for at opklare proteinets tredimensionelle struktur ved hjælp af røntgenkrystallografi.

Forskere på Columbia University i New York har for nylig krystalliseret miniproteinet af AMPA-receptoren GluR2 sammen med et signalstof, som er bundet til receptoren. Derpå bestemte de strukturen af bindingslommen og det bundne signalstof ved hjælp af røntgenkrystallografi.

Her belyses krystallen med intens røntgenstråling, og strålerne spredes af atomerne i det krystalliserede protein. Resultatet er et spredningsmønster, som kan bruges til at beregne, hvilke atomer proteinet er opbygget af, og hvordan atomerne er placeret i forhold til hinanden. På den måde får man detaljerede oplysninger om proteinets tredimensionelle struktur.



I formelskemaet er vist strukturen af tre AMPA-receptor stimulerende stoffer og et AMPA-receptor blokerende stof. Alle fire forbindelser er blevet krystalliseret med AMPA-receptor miniproteinet af GluR2 med henblik på strukturbestemmelse ved hjælp af røntgenkrystallografi.

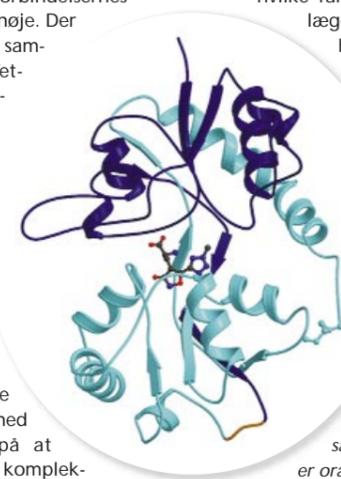
Strukturen af protein-signalstof komplekset viser, hvor i receptoren signalstoffet bindes, og giver desuden præcis viden om, hvilke aminosyrer i bindingslommen signalstoffet har kontakt til, f.eks. via brintbindinger eller saltbroer.

Binding af modelstoffer

På Institut for Medicinalkemi er det fornylig lykkedes, i samarbejde med de amerikanske forskere, at krystallisere miniproteinet af AMPA-receptoren GluR2 sammen med en række modelstoffer. Nogle af disse stoffer aktiverer receptoren og stimulerer nervecellen, mens andre af stofferne binder sig til receptoren uden at aktivere den. Sådanne stoffer kan blokere receptoren for glutaminsyre og dermed hæmme nervecellens aktivitet.

Modelstofferne er designet og syntetiseret af den medicinalkemiske gruppe på instituttet, og forbindelsernes strukturkemi og farmakologi er undersøgt nøje. Der er nu samlet røntgendata af miniproteinet sammen med tre stimulerende stoffer 2-Me-Tet-AMPA, Br-HIBO og ACPA samt for det blokerende stof ATPO. Den tredimensionelle struktur er løst for de to førstnævnte stoffer.

De strukturelle studier af de ionotrope glutaminsyre-receptorer omfatter også andre typer end AMPA-receptorerne. Et modelprotein af en af underenhederne i kainisyre-receptoren er allerede fremstillet genteknologisk, og andre er klonet og udtrykt i kolibakterier for derefter at blive isoleret, oprenset og farmakologisk karakteriseret. Også disse proteiner vil blive krystalliseret sammen med forskellige modelstoffer med henblik på at bestemme den tredimensionelle struktur af kompleksene ved hjælp af røntgenkrystallografi.



Strukturen af bindingslommen i AMPA-receptor underenheden GluR2 i kompleks med det stimulerende modelstof 2-Me-Tet-AMPA. Peptidene S1 og S2 er vist i henholdsvis lilla farve og grøn farve, mens peptidkæden, som sammenknytter S1 og S2, nederst i molekylet er orange. Modelstoffet 2-Me-Tet-AMPA ses midt i molekylet mellem S1 og S2.

Computerkemi og lægemidler

Strukturoptimering af en lang række forskellige receptor-signalstof komplekser vil give værdifuld information om stoffernes samspil med receptoren og om formen af bindingslommerne på de forskellige receptortyper.

Detaljerede viden herom er af afgørende betydning for at opklare sammenhængen mellem modelstoffernes struktur og deres biologiske funktion, dvs. evnen til at stimulere eller blokere forskellige typer af glutaminsyre-receptorer. Samtidig vil det blive muligt at opklare strukturelle forskelle mellem de forskellige receptortyper. Hermed er døren åben for strukturbaseret design af lægemiddelstoffer, hvorved nye og bedre lægemidler mod neurodegenerative sygdomme som f. eks. Alzheimers sygdom kan udvikles på et rationelt grundlag.

Den strukturelle information om glutaminsyre-receptorerne, som vi opnår ved hjælp af røntgenkrystallografi, anvendes til yderligere karakterisering af bindingslommernes egenskaber ved hjælp af computerbaserede beregningsmetoder. Et tæt samarbejde mellem grupperne, som arbejder med proteinkrystallografi og computerkemi, kan føre til identifikation af de aminosyrer, der er vigtige for bindingen af lægemiddelstoffer.

På den måde kan man klarlægge mekanismen for de enkelte receptortypers funktion, ligesom der vil blive kastet lys på detaljer omkring de enkelte lægemiddelstoffers virkemåde. En anden mulighed, som røntgenstrukturerne åbner op for, er udvikling af modeller for andre under typer af glutaminsyre-receptorer. Formålet er at uddybe forståelsen for hvilke faktorer, der er bestemmende for, at nogle lægemiddelstoffer påvirker bestemte underenheder af receptorer, men ikke andre.

Projektet er et eksempel på udpræget interdisciplinært samarbejde. Det involverer således molekylærbiologi, proteinkemi, molekylærfarmakologi, proteinkrystallografi, organisk syntese og computerkemi.



M.Sc. i kemi
Anders Hogner er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi.



Cand.pharm.
Marie-Louise Lunn er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi.



Erhvervsforsker, cand.pharm.
Jette Sandholm Kastrup er lektor ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Ingrid Kjølner Larsen er lektor ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Tommy Liljefors er professor ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Jan Egebjerg er lektor ved Institut for Molekylær og Strukturel Biologi på Århus Universitet.

Fra ilden til asken med antidepressiv medicin

Yngre kvinder, som bruger antidepressiv medicin, opfatter sig selv som stemplet af samfundet. Før behandlingen fordi de havde et psykisk problem. Under behandlingen på grund af det image de mener, at samfundet tillægger medicinen. En interviewundersøgelse viser, at opfattelsen af stempeling snarere skyldes egne forventninger, end faktiske erfaringer med negative reaktioner fra omverdenen.

Af Pia Knudsen, Ebba Holme Hansen og Janine Marie Morgall

Forbruget af nervemedicin og sovemedicin er generelt faldet i Danmark. Brugen af de nyere midler mod depression, selektive serotonin genoptagshæmmere (SSRI), er derimod vokset drastisk. Alene omsætningen af disse såkaldte "lykkepiller" i den primære sundhedssektor svarede i 1998 til, at ca. 4 procent af den danske befolkning kunne være i behandling hver dag året rundt.

I takt med den kraftige stigning i forbruget har der været en heftig debat i medierne om, hvem medicinen bør udskrives til, om konsekvenserne ved det øgede forbrug samt om bivirkningerne.

Mange af de kvindelige brugere af "lykkepillerne" undgår ofte at fortælle deres omgangskreds om deres medicinforbrug. Når de skal være sammen med andre mennesker, taler de om at "tage en maske på". (Foto: Mikael Andersson/MIRA/2maj)

Men hvad betyder medicinanvendelsen for dem, som bruger lægemidlerne? Vi har gennemført en undersøgelse for at afdække yngre kvinders opfattelser af deres forbrug af SSRI. Målet er at opnå indsigt i, hvad der er afgørende for kvinderne i deres brug af antidepressive lægemidler. En sådan viden kan fremme kommunikationen mellem bruger og sundhedsvæsen samt mellem brugerne og deres sociale netværk.

Undersøgelsen er et led i et tværfagligt europæisk forskningsprojekt, The User Perspective Project (TUPP), som gennemføres i samarbejde med WHO's europæiske kontor. Studiet er godkendt af De Videnskabetiske Komitéer for Københavns og Frederiksberg Kommuner.

Resultaterne er baseret på femten dybdegående interview med yngre kvindelige brugere af SSRI-præparater, hvoraf fire blev interviewet to gange med et interval på et halvt år. Kvinderne var mellem 18 og 34 år. Brugere, som på interviewtidspunktet var indlagt på hospital eller anden institution blev udelukket fra undersøgelsen, og det samme gjaldt kvinder, hvis anvendelse af psykofarmaka indgik i et blandingsmisbrug.

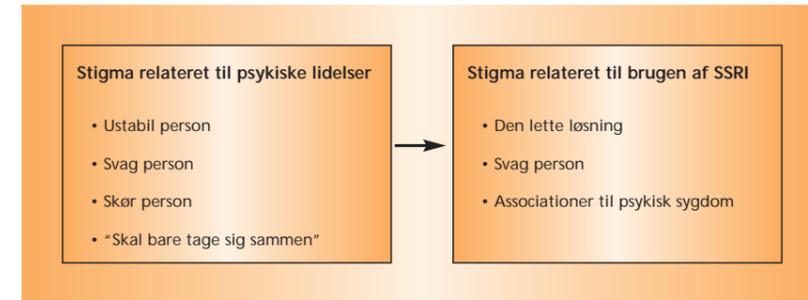
Kvinderne blev rekrutteret til undersøgelsen på apoteker i Københavns og Frederiksberg Kommuner i forbindelse med, at de indleverede deres recepter på SSRI.

Unormal og desperat

Før de interviewede kvinder kontaktede en læge, følte de, at de ikke fungerede i hverdagen. De oplevede, at de ikke var sig selv og syntes, at de opførte sig "unormalt", men forstod ikke, hvad der var galt, hvilket var meget smerteligt for dem. Når de beskrev sig selv i denne periode af deres liv, brugte de ord som "sindssyg", "skør" og "underlig".

Kvinderne forsøgte i lang tid selv at håndtere deres problemer, men symptomerne tog mere og mere over. På et tidspunkt afgjorde de, at de måtte have professionel hjælp og henvendte sig derefter til en læge, som tilbød en recept på antidepressiv medicin. For nogle af kvinderne var dette en konfliktfyldt oplevelse. Lægemidlet blev af mange af kvinderne set som et tegn på svaghed. De skammede sig, fordi de ikke kunne klare deres problemer selv. Andre fandt det svært at begynde at bruge medicin, fordi de ikke anså sig selv for at være syge. Det krævede derfor en omdefinering af deres problemer, fra at være et hverdagsproblem til at være en sygdom, før de var rede til at bruge lægemidlet. Andre var mere parate til at bruge medicinen.

Flertallet ræsonnerede dog, at lægemidlet var den sidste udvej. Mange af kvinderne beskrev sig selv som "desperate" på dette tidspunkt. Efter at have taget den antidepressive medicin i et stykke tid mærkede kvinderne en effekt. De følte nu, at de kunne begynde at fungere i deres hverdagsliv igen. De gav udtryk for en følelse af overskud, og beskrev nu sig selv som "normale" eller "at de var sig selv igen". Kvinderne anså dog ikke sig selv som raske. De kunne stadig mærke



Yngre kvinder, der bruger antidepressiv medicin (SSRI), oplever at gå fra et stigma til et andet.

symptomerne, men følte, at de nu kunne kontrollere dem.

Med undtagelse af én gik alle kvinderne i samtalerapi hos enten en psykolog eller en psykiater, samtidig med at de var i behandling med lægemidlet. Mange fandt, at medicinen spillede en vigtig rolle i terapien, da den gav dem overskud til at arbejde med deres problemer.

Føler sig afvigende

De kvindelige brugere af SSRI var bekymrede for, om deres omgivelser ville kunne forstå deres tilstand. De følte, at samfundet kæder det at have psykiske problemer sammen med at være ustabil og svag eller endnu værre, at være skør. Samtidig følte kvinderne ofte, at samfundet ikke anså deres tilstand for alvorlig, og at holdningen var, at de bare skulle tage sig sammen.

Når mennesker afviger fra samfundets normer, bliver en stempelsproces ofte sat i gang, og den som afviger påføres et stigma - de bliver, eller føler sig, dybt miskrediterede. Kvinderne vurderede, at det at have psykiske problemer er en uacceptabel tilstand i vort samfund. Man er afvigende og falder uden for normerne.

Flertallet af kvinderne fandt, at lægemidlet kun gjorde afvigelsen større. Kvinderne frygtede, at medicinforbruget ville stemple dem som værende ustabile på jobbet, uegnede som mødre eller skøre i hovedet. Mange af kvinderne følte, at samfundet satte spørgsmålstegn ved nødvendigheden i brugen af lægemidler til behandling af psykiske problemer.

I følge kvinderne er medierne en vigtig faktor i dannelsen af samfundets holdning til lægemidlet. Kvinderne tog således klart afstand fra ordet "lykkepiller". De mente, at lægemidlernes image i medierne var, at de blev udskrevet til mennesker, som bare var lidt nede, eller blev givet til svage mennesker som en let løsning. Desuden associerede navnet "lykkepille" til en tilstand af lykke, som kvinderne i denne undersøgelse ikke følte. Kvinderne gav udtryk for mangel på respekt og forståelse for deres tilstand.

At tage masken på

Kvindernes opfattelse af samfundets holdning havde stor indflydelse på, hvordan de håndterede deres situation. Inden de selv fik problemer, havde mange af kvinderne tillært sig samfundets normer omkring psykiske lidelser og brugen af psykofarmaka, og nogle af dem havde tidligere selv haft en negativ opfattelse af brugere af antidepressive lægemidler. Kvinderne havde således accepteret samfundets normer, og de forventede at blive stemplet som syge eller afvigende.

Derfor skjulte de oftest deres problemer. Mange af kvinderne nævnte, at de ikke havde energi til at være sammen med andre mennesker, hvorfor de trak sig tilbage og om muligt isolerede sig. Når de skulle være sammen med andre mennesker, talte de om at "tage en maske på".

Kun udvalgte personer i det sociale netværk kendte til kvindernes medicinforbrug. Lægemidlernes rygte som en "lykkepiller" blev ofte nævnt som en grund til ikke at fortælle andre om forbruget. Kvinderne havde svære overvejelser om, hvor meget de ønskede, at andre mennesker skulle kende til deres tilstand, fordi de ofte følte, at de skulle forklare sig eller næsten undskyldte sig, hvis de fortalte, at de brugte antidepressive lægemidler.

Fra et stigma til et andet

Det kan konkluderes, at yngre kvinder, der bruger SSRI, synes at gå fra et stigma relateret til at have psykiske problemer til et andet stigma relateret til brugen af lægemidlerne. Kvinderne håndterer denne følelse ved at skjule både de psykiske problemer og lægemiddelforbruget for de fleste i deres omgangskreds.

Dette skyldes i høj grad deres forventning om stigmatisering og frygten for de reaktioner en afsløring eventuelt ville kunne medføre. Meget få kendte til kvindernes situation, og det kan derfor konkluderes, at kvindernes følelse af stigma delvis stammer fra dem selv i kraft af den accept af samfundets normer, som har fundet sted tidligere i kvindernes tilværelse.

Frygten for omverdenen - citater fra undersøgelsen

• "Du kan godt ringe og sige, jeg er syg. Jeg har influenza og kommer ikke. Men du kan ikke ringe og sige, jeg er dybt deprimeret. Det kan folk simpelt hen ikke forstå. Man er kronisk syg, men ingen forstår det. Fordi det er ikke et brækket ben. Det er ikke en tandbyld. Folk siger bare: Tag dig sammen og kom videre." (32 år)

• "Generelt er der jo den der holdning, at det i dag er let nok at få en pille. Man kan få en pille for alt, og hvis man har det lidt skidt, og lige er ude i en krise, så æder man en lykkepille. Det vil sige, at dem der virkelig har behovet, de bliver stemplet som nogen, der giver hurtigt op og ikke kan tåle den mindste modgang, før de simpelt hen må have et eller andet kemisk at kaste i kroppen. Det er ret slemt, fordi jeg gider ikke og sidde og skulle undskyldte at jeg tager dem." (32 år)

• "Jeg har ikke fortalt mine venner det. Fordi jeg er bange for deres reaktion. Jeg har fortalt det til én, og ham snakker jeg ikke med mere. Jeg ved ikke om det har noget med det at gøre, men altså... Jamen, jeg er bange for at de tænker "hun er eddermanne en skør kugle". Så derfor har jeg valgt ikke at sige noget." (21 år)



Cand.pharm. Pia Knudsen er ph.d.-studerende ved Institut for Samfundsfarmaci.



Cand.pharm. Ebba Holme Hansen er professor ved Institut for Samfundsfarmaci.



Fil.dr. Janine Marie Morgall er lektor ved Institut for Samfundsfarmaci.