

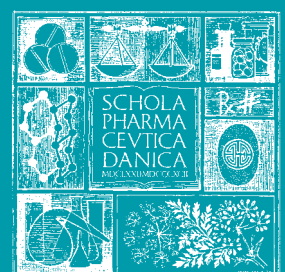
LÆGEMIDDELFORSKNING

2001

DANMARKS

FARMACEUTISKE

HØJSKOLE



Fra svampegift til potentielt lægemiddel med ny virkning

Muscimol fra rød fluesvamp forårsager de alvorlige psykiske forstyrrelser, som kan optræde hos mennesker, der har indtaget den tørrede svamp. I et mangeårigt projekt har vi tæmmet giftstoffet til forbindelsen THIP, som i kliniske forsøg viser en helt ny farmakologisk profil, som kan føre til udvikling af nye sovemidler og smertestillende lægemidler.

Af Povl Krogsgaard-Larsen og Lotte Brehm

Den røde fluesvamp, *Amanita muscaria*, danner flere strukturelt særegne stoffer, hvoraf nogle påvirker det perifere nervesystem, mens andre udøver deres effekt på centralnervesystemet, dvs. hjernen og rygmarven. Stofferne kan forgifte både mennesker og dyr, og denne toksicitet afspejler, at stofferne påvirker vitale fysiologiske mekanismer.



Smuk, men farlig - den røde fluesvamp, *Amanita muscaria*. Når den tørrede svamp indtages i større mængder kan indholdsstofferne forårsage dødbringende uregelmæssigheder i hjertefunktionen og alvorlige psykotiske forstyrrelser.

De mest kendte af fluesvampens gifte er muscarin og muscimol. Muscarin aktiverer de muscarine receptorer, som bl.a. forekommer i hjertemuskulaturen, hvilket er årsag til den dødbringende effekt ved indtagelse af større mængder af den tørrede fluesvamp.

I modsætning til muscarin trænger muscimol gennem blod-hjerne-barrieren og aktiverer GABA-receptorerne på hjernens nerveceller meget kraftigt. GABA er hjernens vigtigste hæmmende signalstof. De alvorlige psykiske forstyrrelser, som ses hos mennesker, der indtager den tørrede fluesvamp, skyldes primært muscimols effekt på GABA-systemet.

Denne artikel beskriver et mangeårigt projekt, hvor vi har tæmmet giften muscimol til det lovende lægemiddelstof THIP, som i kliniske forsøg viser en helt ny farmakologisk profil.

Muscimol som modelstof

Muscimol har som nævnt en kraftig stimulerende effekt på hjernens GABA-receptorer. Muscimols aktivering af receptorerne er væsentlig stærkere end GABA's egen, og toksiciteten skyldes sandsynligvis, at muscimol bindes for kraftigt til GABA-receptorerne og dermed på en måde sætter dem ud af spillet. Toksiciteten kan også til dels skyldes, at muscimol bliver omdannet til andre giftige forbindelser af enzymer i hjernen og i øvrigt påvirker andre funktioner i GABA-signalsystemet.

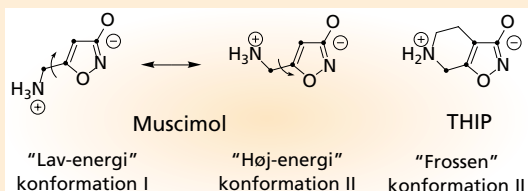
Ikke desto mindre er muscimol et interessant medicinalkemisk modelstof for udvikling af lægemidler til behandling af sygdomme, som skyldes ubalance i GABA-systemet, og som muligvis kan afhjælpes gennem påvirkning af GABA-receptorerne. Spørgsmålet var fra starten, om vi kunne tæmme effekten af muscimol og omdanne dette særegne stof til et lægemiddel med en ønsket og kontrolleret virkning.

I den første fase af projektet opstillede vi en hypotese vedrørende muscimols kraftige stimulerende virkning på GABA-receptorerne. Hypotesen blev fremsat på et tidspunkt, hvor vi intet vidste om GABA-receptorernes struktur og funktion. Muscimol har på grund af det indbyggede ringsystem en langt mere fastlåst struktur end GABA; kun molekylets sidekæde kan drejes. Muscimol kan indtage to konformationer, som i følge hypotesen muliggør en trinvis binding, hvorved stoffet tilpasser sig receptoren. Først bindes muscimol til receptoren, hvorefter der sker en konformationsændring fra den relativt stabile konformation I til den mindre favorable konformation II. Efter bindingen til receptoren forestillede vi os, at muscimolmolekylet med hjælp fra receptoren igen ville ændre konformation henimod den mere stabile konformation I, og at den herved frigjorte energi var tilstrækkelig til at aktivere receptoren.

For at underbygge denne hypotese blev stoffet THIP syntetiseret som modelstof. I THIP er muscimol fastlåst i den ufavorable konformation II.

Indhold

FRA GIFT TIL LÆGEMIDDELSTOF

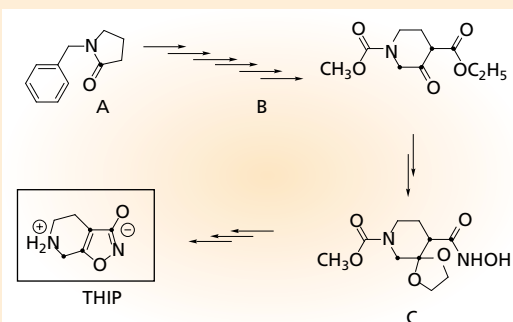


Figuren viser to konformationer af giftstoffet muscimol, I og II, samt strukturen af det potentielle lægemiddelstof THIP. Alle tre stoffer binder sig til GABA-receptorer på hjernens nerveceller.

Muscimol aktiverer GABA-receptorer 100 procent og skifter muligvis mellem de to konformationer under bindingen til receptoren. THIP aktiverer GABA-receptorer langt mere skånsomt. Stoffet er en såkaldt partiel GABA-agonist. THIP er således en tæmmet udgave af muscimol – et potentielt og lovende lægemiddelstof.

SYNTESE AF THIP

Fremstillingen af THIP sker gennem en syntese med mange trin, som er skitseret i figuren. Strategien har været at opbygge 6-ringen i THIP og derefter at opbygge funktionelle grupper på ringen, hvilket muliggjorde tilbygningen af 5-ringen. Som vist indeholder udgangsstoffet A kun et af de kulstofatomer, der kommer til at indgå i GABA-delen af THIP. Gennem seks syntesetrin omdannes A til B, som nu indeholder alle de fire kulstofatomer, som kommer til at udgøre GABA-delen i mål molekylet. Gennem to yderligere trin omdannes grupper på ringen af B til grupper på C, som muliggør cyklisering til den bicykliske ringstruktur. Det kræver 3 syntesetrin at omdanne C til THIP.



1. **Fra svampegift til potentielt lægemiddel med ny virkning** 2-5
Af Povl Krogsgaard-Larsen og Lotte Brehm
2. **Nyt lægemiddel forbedrer søvnen** 6-7
Af Martin Mortensen, Jan Kehler, Povl Krogsgaard-Larsen og Bjarke Ebert
3. **Forbedret test af nye lægemidler mod malaria** 8-9
Af Jette Christensen, Dan Stærk, Hanne L. Ziegler, Majid Sairafianpour og Jerzy W. Jaroszewski
4. **Skræddersyede lægemidler til individuelle genomer** 10-11
Af Claus Møldrup
5. **Stofskiftesygdomme - fra gen til terapi** 12-13
Af Trine Meldgaard Lund, Ernst Christensen, Arne Schousboe og Allan Meldgaard Lund
6. **Håb om bedre behandling af brystkræft** 14-15
Af Martin Wenckens, Per Vedsø, Mikael Begtrup og Palle Jakobsen
7. **Proteiner som lægemidler** 16-17
Af Susanne Sønderkær, Lars Lindgaard Hansen, James Flink, Sven Frøkjær
8. **Fra krampefremkaldende til krampestillende effekt** 18-19
Af Ulf Madsen, Tine B. Stensbøl, Hans Bräuner-Osborne og Connie Sánchez
9. **Et bud på fremtidens lægemidler mod epilepsi** 20-21
Af Rasmus P. Clausen, Orla M. Larsson, Jeremy Greenwood og Povl Krogsgaard-Larsen
10. **Fokus på hjernens støtteceller** 22-23
Af Helle S. Waagepetersen, Orla M. Larsson og Arne Schousboe
11. **Genvej til hjernen via næsen** 24-25
Af Morten Aavad Bagger og Erik Bechgaard
12. **Ind gennem tarmens lymfesystem** 26-27
Af René Holm, Anette Müllertz og Henning Gjelstrup Kristensen
13. **Computeren er medicinalindustriens krystalkugle** 28-29
Af Jan Høst, Flemming Steen Jørgensen, Inge Thøger Christensen, Lars Hovgaard og Sven Frøkjær
14. **E-screening af lægemidler** 30-31
Af Flemming Steen Jørgensen, Jørgen Bonefeld Kristensen og Inge Thøger Christensen
15. **Optagelse af nye vacciner i kroppens immunceller** 32-33
Af Camilla Foged, Birger Brodin og Sven Frøkjær
16. **DNA-vaccine mod salmonella** 34-35
Af Jesper Drøgemüller, Peter Thyngesen, Erik Riise og Jan Engberg
17. **Højfølsomme mikroteknikker til analyse af blod og urin** 36-37
Af Lars Bendahl, Bente Gammelgaard, Ole Jøns, Ole Farver og Steen Honoré Hansen
18. **Farmaceutisk omsorg på apotekerne** 38-39
Af Charlotte Rossing, Ebba Holme Hansen og Janine Marie Morgall

Fra svampegift til potentielt lægemiddel med ny virkning

FLUESVAMPENS GIFTSTOFFER

De vigtigste farmakologisk aktive indholdsstoffer i den røde fluesvamp er muscarin, ibotensyre og muscimol. I den øverste figur illustreres den strukturelle lighed mellem ibotensyre og muscimol og hjernens signalstof glutaminsyre og GABA.

Stoffet muscarin er i stand til at aktivere den undergruppe af receptorer for signalstoffet acetylcholin, der betegnes muscarine receptorer. Muscarin indeholder en permanent positiv ladning. Stoffet kan derfor ikke trænge gennem den fedtholdige blod-hjerne-barriere, som adskiller blodbanen fra hjernevævet. Muscarin aktiverer derfor kun de muscarine receptorer i det periferes nervesystem, bl.a. i hjertemuskulaturen. Det er pri-

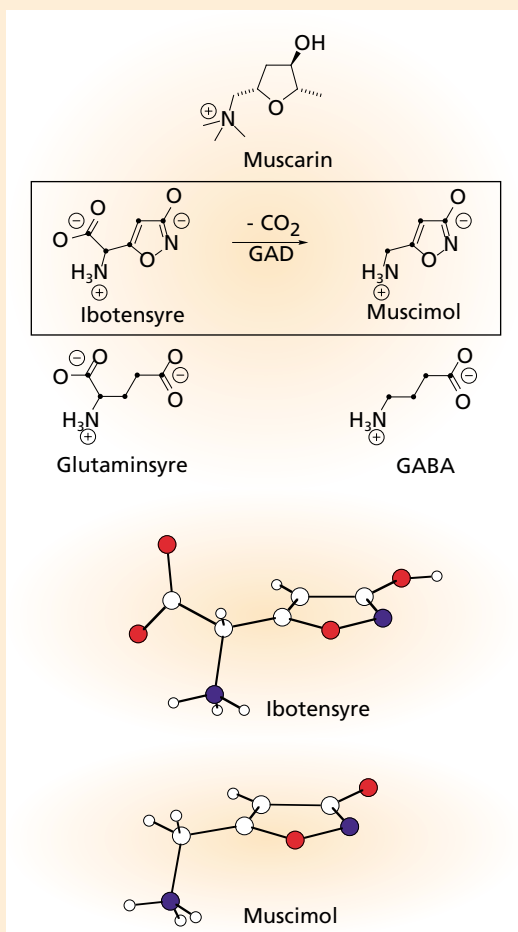
mært denne effekt, der ligger til grund for alvorlige forgiftninger, eventuelt med dødeligt forløb efter indtagelse af større mængder af tørret fluesvamp.

Fluesvampen biosyntetiserer også aminosyren ibotensyre, som indeholder en 3-hydroxyisoxazolgruppe. Hydroxygruppen på isoxazolringen har sur karakter af omtrent samme styrke som en carboxylgruppe. Ibotensyre er således en strukturanalog af glutaminsyre med 3-hydroxyisoxazolgruppen i stedet for glutaminsyrens carboxylgruppe. Denne strukturelle lighed kan ligge til grund for, at ibotensyre er i stand til at aktivere receptorerne for signalstoffet glutaminsyre. Den tørrede fluesvamp indeholder også stoffet muscimol, som strukturelt ligner signalstoffet GABA. Svampen biosyntetiserer ikke muscimol; men under tørringsprocessen taber ibotensyre sin carboxylgruppe under fraspaltning af kuldioxid, og bliver derved til muscimol. I de områder i verden, hvor fluesvampen anvendes som rusmiddel, er det den tørrede svamp, der indtages. Effekten på centralnervesystemet skyldes primært indholdet af muscimol. De forvirringstilstande – og efter indtagelse af større mængder tørret svamp – psykotiske forstyrrelser, der karakteriserer rusen, er primært resultatet af, at muscimol meget kraftigt aktiverer hjernens receptorer for signalstoffet GABA.

Ibotensyre er toksisk over for flere lavere dyrearter bl.a. fluer. Det er næppe ibotensyren selv, der dræber fluerne, idet flere analoger af glutaminsyre, som påvirker receptorerne for glutaminsyre endnu kraftigere end ibotensyre, ikke er toksiske over for fluer. Alle dyrearter har receptorer for GABA, og den toksiske effekt skyldes efter al sandsynlighed, at ibotensyre i dyrene omdannes til muscimol, som påvirker GABA-receptorerne.

Fraspaltningen af carboxylgruppen i ibotensyre katalyseres af enzymet GAD, som i alle organismer katalyserer dannelsen af GABA ud fra glutaminsyre. Meget tyder altså på, at fluesvampen har fundet det hensigtsmæssigt at danne ibotensyre som transportform af muscimol som forsvar mod forskellige arter af dyr. En anden funktion af ibotensyre er i øvrigt at udgøre en strukturel komponent af svampens røde farvestof.

Strukturen af ibotensyre og muscimol er entydigt fastlagt ved røntgenkrystallografiske analyser. Strukturen af begge stoffer er enestående, og der findes ikke andre naturstoffer, som indeholder den sure 3-hydroxyisoxazol-ringstruktur. Den nederste del af figuren viser strukturen af ibotensyre og muscimol.

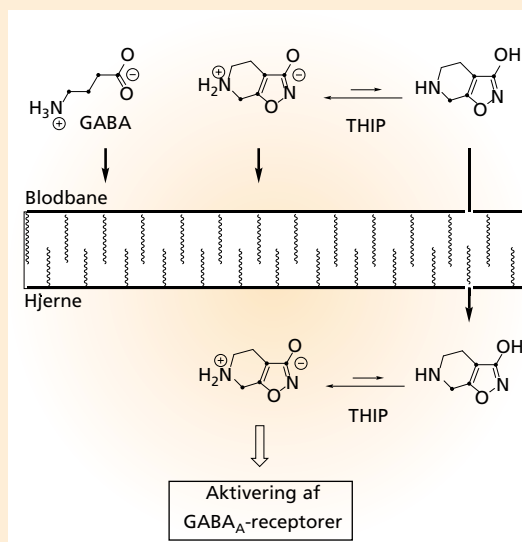


GENNEM BLOD-HJERNE-BARRIEREN

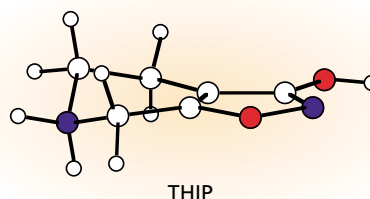
THIP, og i øvrigt også muscimol, er i modsætning til signalstoffet GABA i stand til at trænge gennem blod-hjerne-barrieren. GABA-molekylet er næsten 100 procent elektrisk ladet, og på grund af denne ladede struktur er GABA ikke i stand til at trænge gennem blod-hjerne-barrieren. Ligesom GABA er både muscimol og THIP elektrisk ladede, men for begge disse stoffer gælder det, at omkring 0,1 procent af molekylerne i vandig opløsning foreligger i uladet form.

Den uladede form kan trænge gennem blod-hjerne-barrieren. Inde i hjernevævet, på den anden side af barrieren, indstiller ligevægten sig igen med 99,9 procent af stoffet THIP i elektrisk ladet form, og det er denne form, der binder til og aktiverer GABA-receptorerne. Mere præcist er det en undergruppe af GABA-receptorer, $GABA_A$, der aktiveres af muscimol og THIP.

I modsætning til muscimol viser THIP meget ringe toksicitet i dyr og mennesker. Dette forhold skyldes muligvis i nogen grad, at aminogruppen (NH-gruppen) i THIP er indbygget i en ring og dermed beskyttet mod den enzymatiske proces, der nedbryder sidekæden i muscimol.



RØNTGENSTRUKTUR AF THIP



THIP er et nyt potentielt lægemiddel, som viser en spændende farmakologisk profil og en bemærkelsesværdig specificitet. Stoffet har kun effekt på $GABA_A$ -receptorerne. Der er syntetiseret en mangfoldighed af strukturelt beslægtede forbindelser, men ingen af dem evner at aktivere $GABA_A$ -receptorerne. THIP er således en enestående forbindelse.

THIP er et meget fastlåst molekyle. Det betyder, at den struktur af THIP, der er blevet bestemt ved en røntgenkrytallografisk analyse, må formodes at illustrere THIP i den form, der bindes til og aktiverer $GABA_A$ -receptorerne.

Første trin i analysen er at dyrke krystaller af THIP. Krystallen anbringes i en intens røntgenstråle, som spredes af atomerne i krystallen. Den spredte stråling danner et mønster, og ud fra spredningsmønstret kan man entydigt beregne den tredimensionelle atomare struktur af THIP.

able konformation II, som vi mente muscimol kunne antage i forbindelse med bindingen til GABA-receptoren. På grund af den fastlåste konformation mente vi, at THIP nok ville binde sig til receptoren, men måske ikke være i stand til at aktivere den.

Det blev vist, at THIP binder effektivt til GABA-receptoren om end ikke helt så kraftigt som muscimol. Men til vores overraskelse viste det sig, at THIP også i høj grad var i stand til at aktivere receptoren. Det betød, at den del af hypotesen, der vedrørte selve aktiveringsmekanismen, var forkert. Det kunne altså ikke alene være frigjort energi ved muscimolmolekylets ændring af konformation fra II til I, som aktiverer receptoren. Hvilken mekanisme, der aktiverer GABA-receptoren, er i dag, mange år senere, fortsat uafklaret.

Men det skulle vise sig, at vi havde fundet det helt rigtige stof, omend af den forkerte grund. Gennem flere års studier er det nu blevet klarlagt, at THIP i modsætning til muscimol specifikt stimulerer GABA-receptorer og kun dem. Og mens muscimol aktiverer receptorerne 100 procent, gør THIP det på en langt mere skånsom og afdæmpet måde.

Det var lykkedes at tæmme muscimol, og efter omfattende studier af THIP tonede konturerne af et nyt lægemiddelstof frem.

THIP i kliniske undersøgelser

Ønsker man at trænge ind på nye farmakologiske og terapeutiske områder, er det selvsagt nødvendigt med nye stoffer, der hverken kan købes eller på anden måde erhverves. De må syntetiseres, og i mange tilfælde er synteserne vanskelige og særdeles tidsrøvende. Det gælder også for THIP. Det tog mere end et år at syntetisere de første 50 mg af stoffet og yderligere adskillige måneder, før metoden var videreudviklet til at fremstille THIP i gramskala. H. Lundbeck A/S har nu stoffet i udvikling og har efter års intens forskning formået at udbygge syntesemetoden til produktion af THIP i stor skala.

Tilsammen har alle disse forhold banet vejen for kliniske forsøg med THIP. Undersøgelser i patienter har vist, at THIP besidder meget kraftig smertestillende effekt. Det skelsættende i denne sammenhæng er, at THIP's smertestillende effekt er helt uafhængig af hjernens opiatssystem – det system, der medierer morfins effekt på smerter. Vi står altså med et nyt smertestillende stof, hvis effekt ikke ledsages af morfinpræparaternes bivirkningsmønster. Dertil kommer, at det i de seneste år er blevet vist, at THIP har meget interessante effekter på søvnmekanismerne i mennesker. Det er en spændende kombination af kliniske effekter.

Det foreliggende projekt er et mangeårigt samarbejdsprojekt mellem forskere på Institut for Medicinalkemi, DFH og firmaet H. Lundbeck A/S.



Dr. pharm. Povl Krogsgaard Larsen er professor ved Institut for Medicinalkemi og rektor på DFH.



Ph.d. Lotte Brehm er lektor ved Institut for Medicinalkemi.

Nyt lægemiddel forbedrer søvnen

Forskere på Danmarks Farmaceutiske Højskole og H. Lundbeck A/S undersøger mekanismen bag en ny type sovemiddel, som forbedrer søvnens kvalitet. Dyreforsøg har vist, at stoffet hverken skaber afhængighed eller medfører abstinenser, og nye forsøg med ældre mennesker tegner lovende.

*Af Martin Mortensen, Jan Kehler,
Povl Krosgaard-Larsen og Bjarke Ebert*

Alle har prøvet at ligge søvnløse om natten og opdaget, at den næste dag ofte præges af irritation og trang til en lille lur. Men for en stor del af befolkningen er søvnløshed mere end blot en enkelt nats vend og drej i sengen - for dem er det en langvarig tilstand, der er lige så invaliderende som smerter og depression. Faktisk resulterer søvnløshed ofte i depression, og manglende søvn gør under alle omstændigheder hverdagen meget svær for den søvnløse.

Behandlingen af søvnløshed er umiddelbart simpel: Et sove-middel - så ligger man i det mindste ikke vågen. Men des-værre er søvn ikke blot en periode, hvor man ligger stille. Søvn er i høj grad hjernens frikvarter, hvor man er fri for at tænke. Når man sover godt, kører hjernen skiftevis på højtryk, mens man drømmer, og langsomt i rolige perioder med dyb søvn. Om morgenen vågner man efter en nats drømme med en hjerne, der er blevet rensat og er klar til en ny dag. Netop vekselvirkningen mellem drømme og dyb søvn er vigtigt for god søvn, så hvis samspillet hæmmes, får det konsekvenser. Hvis man vågner mange gange i løbet af natten, får hjernen ikke vekslet mellem drømmesøvn og drømmeløs søvn. Og det

Normal



Med benzodiazepin



Øverst ses et elektroencefalogram (EEG), som med blåt viser hjernens elektriske aktivitet under en del af den normale søvn. Her veksler perioder med hektisk aktivitet med rolige perioder med lav aktivitet. Nederst ses med rødt et EEG af en forsøgsperson, der har fået et traditionelt sovemiddel, et benzodiazepin. Her viser hjerneaktiviteten, at forsøgspersonen hele tiden sover dybt og mangler de hektiske perioder med drømme.

samme er tilfældet ved brug af traditionelle sovemidler. Sovemidler som Rohypnol og andre benzodiazepiner fjerner nemlig overgangene mellem de forskellige søvntilstande. Så selv om man har sovet dybt hele natten, kan man stadigvæk være søvngig og uoplagt den følgende dag; nogle føler det som om de har en mild omgang tømmermænd.

Udover dårlig søvn er der mange andre bivirkninger ved benzodiazepinerne. Den væsentligste er nok, at man allerede efter den første uge er blevet vænnet så meget til sovemidlet, at man for det første har brug for større mængder for at få sovet og for det andet kommer til at ligge søvnløs, hvis man stopper med tabletterne. Grunden er, at når vi kemisk tvinger hjernen til at sove med benzodiazepiner, slukker vi for bevidstheden ved at stimulere hjernens vigtigste hæmmende signalsystem - GABA-systemet - som dæmper nerve-cellerne aktivitet i hjernen.

Når man overaktiverer et af hjernens signalsystemer, forsøger systemet straks at mindske aktiveringen på samme måde, som når hørelsen bliver midlertidigt nedsat ved meget høj musik. GABA-systemet bliver således mindre følsomt, når man overaktiverer det. Samtidigt vil hjernens stimulerende signalsystemer begynde at blive mere aktive for at modvirke hæmningen af hjernen. Tilsammen betyder det, at ens hjerne efter nogle ugers behandling er blevet afhængig af sovemidlet. Derfor har man behov for at få mere medicin for at falde i søvn, og samtidig får man abstinenser, hvis man stopper med at bruge sovemidlet.

Det rigtige håndtag

Løsningen på disse problemer er at udvikle nye sovemidler, der i stedet for blot få hjernen til at falde i søvn også forbed-



Simulationen viser forskellige typer GABA-receptorer på overfladen af en nervecelle.

rer kvaliteten af søvnen og ikke gør hjernen afhængig. Men kan man det?

Ja, meget tyder på det! Men for at forstå mekanismen er det nødvendigt at kigge nærmere på GABA-systemet. GABA-systemet består af en mængde forskellige receptorer på hjernens nerveceller, og alle receptorerne kan aktiveres af signalstoffet GABA. Når en GABA-receptor stimuleres af GABA, medfører det, at nervecellen bliver mindre aktiv. GABA-systemet kan derfor opfattes som hjernens overordnede bremse, som forhindrer, at signalprocesserne løber løbsk. De forskellige typer af GABA-receptorer er placeret særlige steder i hjernen, således at en type findes i områder, der har betydning for søvn, mens andre er lokaliseret i de dele af hjernen, der har betydning for hukommelse, angst eller smerte. Visse typer GABA-receptorer findes næsten overalt i hjernen.

Problemet med benzodiazepinerne er, at sovemidlerne påvirker de GABA-receptorer, der findes næsten overalt i hjernen, og derfor kan det ikke undre, at der er en mængde bivirkninger forbundet med brugen af disse stoffer. Målet er derfor at udvikle stoffer, som mere specifikt kan ramme og påvirke de receptorer, der findes i de områder af hjernen, som er vigtige for søvnens kvalitet.

Det er ikke nogen nem opgave! Faktisk var det indtil for nylig stort set umuligt, fordi man ikke vidste, hvilke typer af GABA-receptorer, der er ansvarlig for søvnen. Derfor kunne man selvfølgelig ikke fremstille lægemiddelstoffer, der virker på netop den rigtige receptortype. Men nu har situationen ændret sig.

God søvn uden afhængighed

For nogle år siden opdagede professor Marike Lancel ved Max Planck Institut i Tyskland nemlig, at lægemiddelstoffet THIP, der er syntetiseret på Danmarks Farmaceutiske Højskole af professor Povl Krogsgaard-Larsen, i dyreforsøg var i stand til at forbedre dyrenes søvnkvalitet. Efterfølgende har Lancel vist, at længere tids behandling tilsyneladende heller ikke medfører de kendte problemer med faldende effekt og abstinenser hos forsøgsdyrene.

På den baggrund besluttede H. Lundbeck A/S, at THIP, som firmaet allerede i midten af 1980'erne havde undersøgt, nu skulle udvikles som en helt ny type sovemiddel under navnet gaboxadol.

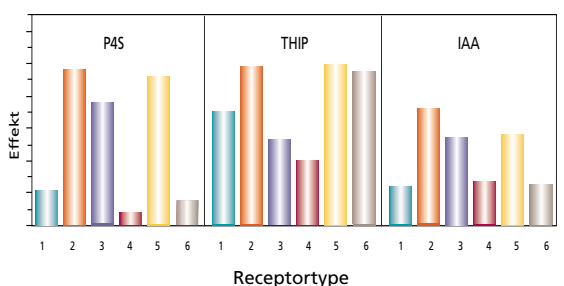
En ting er at have et nyt og spændende lægemiddel i udvikling, noget andet er at forstå virkningsmekanismen. For at opnå en dybere forståelse af, hvad det er, som bestemmer aktiviteten af stoffer som THIP har vi i et samarbejde mellem Danmarks Farmaceutiske Højskole og H. Lundbeck A/S fremstillet og undersøgt THIP-lignende stoffer, der virker på forskellige typer af GABA-receptorer.

For at kunne undersøge en enkelt type GABA-receptorer ad

gangen er det nødvendigt at klonе dem og derpå få nogle celler til at danne receptorerne. Til det formål har vi gennem de seneste år benyttet ubefrugtede æg fra en sydafrikansk frø til at danne receptorerne. Æggene fungerer som en slags syntese-fabrikker. Når man indsprøjter et gen, der koder for en receptor, i et frøæg, vil ægget i løbet af kort tid danne receptoren i sin overflade. På den måde har vi fremstillet frøæg med forskellige typer GABA-receptorer.

Derefter kan vi undersøge, hvordan forskellige lægemiddelstoffer påvirker de forskellige typer af receptorer. Vi har på denne måde karakteriseret en mængde stoffer på mange forskellige GABA-receptorer og til vores store overraskelse ser det ud til, at THIP er et helt unikt stof. THIP er nemlig det eneste stof, som aktiverer GABA-receptorer af type 4 meget stærkt. Netop denne GABA-receptor er placeret i de områder af hjernen, som man mener har betydning for søvnens kvalitet. Da THIP er det eneste stof, som virker så godt på denne receptor, mener vi, at vi er ved at forstå baggrunden for THIP's effekt på søvnen. Ingen af de stoffer, som vi eller andre har undersøgt, har nemlig den samme aktivitet på søvnen som THIP. Samspillet mellem forskellige faggrupper fra Danmarks Farmaceutiske Højskole og H. Lundbeck A/S har i denne sammenhæng været helt nødvendig for at kunne opnå en dybere viden.

Professor Lancel har for nyligt vist, at ældre mennesker med søvnbesvær sover fastere og er væsentligt mere veludhvilede når de har fået gaboxadol. Det er derfor utroligt spændende, om vi her virkelig står med en helt ny type sovemedicin, der forbedrer kvaliteten af søvnen uden de bivirkninger, som man normalt ser. Gaboxadol undersøges netop nu i klinisk fase II-studier, hvor patienter med søvnproblemer får lægemidlet. Og efter disse studier venter der flere meget omfattende undersøgelser. Der kommer derfor sikkert til at gå cirka 4 til 5 år inden THIP som lægemidlet gaboxadol kommer på markedet.



Diagrammerne viser, hvordan forskellige typer GABA-receptorer påvirkes af lægemiddelstofferne P4S og THIP samt stoffet IAA, som hjernen selv danner. THIP er det eneste af stofferne, der aktiverer receptorer af type 4 stærkt. Netop disse receptorer findes i de områder af hjernen, der har betydning for søvnen.



Cand.scient. Martin Mortensen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi.



Ph.d. Jan Kehler er medicinskemiker ved Medicinskemisk Afdeling på H. Lundbeck A/S.



Dr.pharm. Povl Krogsgaard-Larsen er professor ved Institut for Medicinskemi og rektor på DFH.



Ph.d. Bjarke Ebert er principal scientist ved Molekylærfarmakologisk Afdeling på H. Lundbeck A/S.

Forbedret test af nye lægemidler mod malaria

Malaria skyldes en parasit, som er mester i at udvikle resistens mod lægemidler. Derfor er det nødvendigt at introducere ny medicin med få års mellemrum. DFH er med i den globale indsats for at finde nye lægemidler mod sygdommen. Hvert år dør omkring to millioner mennesker af malaria, og de fleste ofre er små børn.

*Af Jette Christensen, Dan Stærk, Hanne L. Ziegler,
Majid Sairafianpour og Jerzy W. Jaroszewski*

Malaria er et af de mest alvorlige og komplekse sundhedsproblemer, som verden står overfor. Sygdommen skyldes infektion med en parasit, der invaderer menneskets røde blodlegemer. Parasitten formerer sig i en bestemt myggeart, der virker som mellemvært. Når myggen suger blod fra en smittebærer, videregives parasitten i dens spyt til en rask person ved næste stik.

Infektionen giver indledningsvis symptomer, der minder om maveinfektioner og influenza, og anfaldene kommer med bestemte intervaller. Senere i forløbet kan ubehandlet malaria medføre alvorlig blodmangel med døden til følge. Mange dødsfald skyldes også blokering af blodkar til vitale organer som hjerne, lever og nyrer.

I mange udviklingslande er malaria skyld i et enormt antal dødsfald, store udgifter til sundhedsvæsenet og mange tabte arbejdsdage. Det skønnes, at 300 millioner mennesker, hovedsageligt i Afrika, Indien, Sydøstasien og Sydamerika, har malaria. Mellem 1,5 og 2,7 millioner mennesker dør hvert år af sygdommen, og hovedparten er børn under fem år. For at sætte tingene i perspektiv, svarer det til, at syv jumbojets fyldt med børn styrter ned hver dag året rundt.

Malaria kræver således lige så mange døds ofre som f.eks. AIDS, og sygdommen er en af de største hindringer for den sociale og økonomiske udvikling i Afrika, hvor mere end 90 procent af alle malaritilfældene forekommer. Alene i år 2000 skønnes de økonomiske tab som følge af malaria at have været 29 milliarder kr.

Sygdommens geografiske udbredelse har været stigende i de senere år. Spredningen af malaria skyldes bl.a. ændret brug af landområder i de ramte lande, globale klimændringer, krige og massive flygtningestrømme til ellers ikke ramte områder. Globalisering og den stærkt forøgede rejseaktivitet medfører, at flere og flere danskere kommer i kontakt med malaria. I 1999 importerede 207 danskere malaria og på trods af, at Danmark råder over et moderne sundhedsvæsen, så dør én ud af 100 malariaramte danskere.

Problemer med behandling

En medvirkende faktor til udbredelsen af malaria er spredningen af malariparasitter, som er modstandsdygtige over for behandling med de traditionelle lægemidler mod sygdommen.

En af WHO's fire globale kontrolstrategier for malaria er således, at en tidlig diagnosticering og behandling er nødvendig for at kunne bekæmpe sygdommen.

Det betyder, at adgangen til billige og effektive lægemidler skal øges i de malariaramte områder i verden. Samtidig er det nødvendigt, at der udvikles nye og virksomme lægemidler til bekæmpelse af de resistente parasitter.

Den mest udbredte og farligste art af malariparasitten, *Plasmodium falciparum*, har i stigende grad og i større geografiske områder udviklet resistens over for klorokin, som er det hyppigst anvendte middel mod sygdommen.

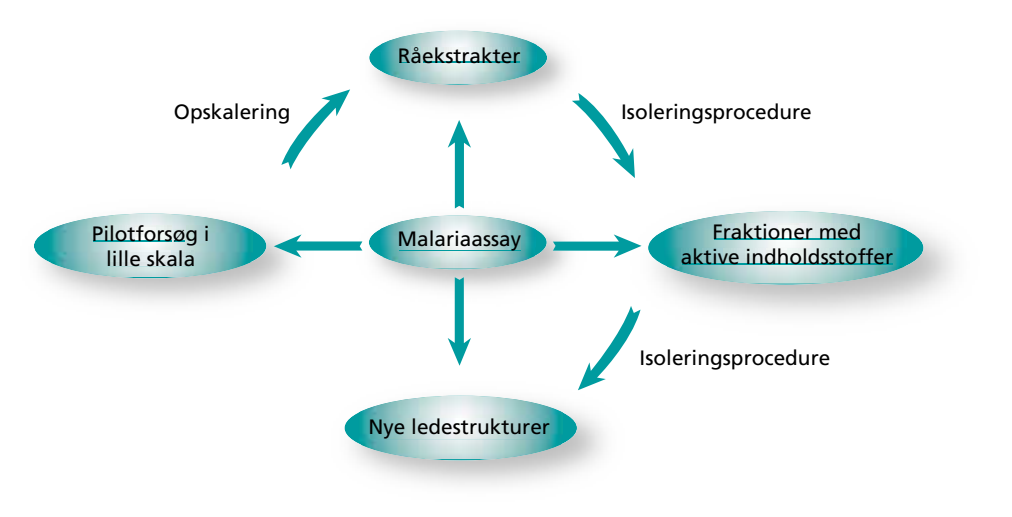
Det samme er tilfældet for lægemidler som indeholder sulfadoxin, pyrimethamin, meflokin og kinin.

Behovet for nye lægemidler mod malaria er derfor stort - specielt set i lyset af, at effektive og sikre vacciner mod sygdommen stadig har lange udsigter, ikke mindst for befolkningen i de områder, hvor epidemier er hyppige. WHO vurderer, at der er behov for et nyt lægemiddel mod malaria ca. hvert femte år. Det kræver en intensiv screening af stoffer for virkning mod malaria, hvis denne del af WHO's strategi skal lykkes.

Lægemidler fra naturen

Naturen er en rig kilde til lægemidler mod mange sygdomme, og dette er også tilfældet med malaria. Kinin fra kinabark og artemisinin fra en kinesisk malurt er eksempler på lægemidler fra naturen, som har dannet grundlag for udvikling af nye syntetiske stoffer, som på forskellig vis er bedre egnede til at bekæmpe sygdommen end naturstofferne selv.

Malaria er et særligt stort sundhedsproblem i Afrika, og børn hører til den mest udsatte gruppe.



Der er et stort behov for nye lægemidler mod malaria, fordi parasitten hurtigt bliver resistent overfor eksisterende medicin. Derfor testes et stort antal naturstoffer på DFH. Figuren viser princippet i undersøgelserne.

Man er nu på jagt efter nye ledestrukturer, der ligesom kinin og artemisin kan føre til udvikling af effektive syntetiske stoffer. En ledestruktur er et molekyle, som har en ny kemisk opbygning og ofte også en ny virkningsmekanisme. I søgen efter nye ledestrukturer kan man udnytte naturens kemiske mangfoldighed og underkaste naturens rige stoffbibliotek en farmakologisk testning.

Naturstoffkemisk gruppe har intensiveret forskningen i malaria, og har i den forbindelse implementeret en metode, som kan bruges til at teste naturstoffer for deres virkning mod malariaparasitter. Metoden anvendes til at undersøge ekstrakter af forskellige planter for på den måde at finde frem til planter med aktive indholdsstoffer.

Testen kan undersøge et meget stort antal planter for deres virkning mod malaria, og undersøgelserne kan bruges til at bestemme, hvilke planter der skal arbejdes videre med. Ligeledes kan metoden anvendes til en effektiv og rationel isolering af de aktive indholdsstoffer i planterne, fordi aktiviteten mod malaria bestemmes i hvert enkelt trin af isoleringsfasen. Derved får man en målrettet procedure for isolering og oprensning, hvilket sparer tid i forhold til tidligere metoder.

Forskning på DFH

Til trods for, at dyrkning af malariaparasitter er blevet en forholdsvis simpel opgave, råder kun få laboratorier i verden over en kontinuerlig og velfungerende biologisk test til undersøgelser af stoffers virkning mod malaria.

De testmetoder, som generelt anvendes til vurdering af stoffers virkning mod malaria, kan ofte af ukendte årsager give upålidelige og variable resultater. Metoden, som benyttes på DFH, blev oprindeligt implementeret med hjælp fra forskere fra Rigshospitalet, men forskningen på DFH har resulteret i en videreudvikling af testen. Samtidig har vi identificeret flere faldgruber, som resulterer i upræcise eller falske resultater.

Da malariaparasitten lever inde i de røde blodlegemer, er det vigtigt at vide, om stofferne er toksiske over for selve parasitten eller overfor værtscellen. Ganske vist vil ødelæggelse af de røde blodlegemer indirekte medføre parasittens død, men det er bestemt ikke ønskeligt at

ødelægge de røde blodlegemer hos patienterne. Derfor er det vigtigt at kunne vise, om nye potentielle lægemiddelstoffer alene skader parasitten.

I samarbejde med et finsk forskerhold har vi identificeret en type stoffer, der medfører falske resultater i testen, fordi de påvirker de røde blodlegemer og ikke parasitten. Det drejer sig om de såkaldte stomatocytogene amphiphile stoffer, som på en særlig måde modificerer de røde blodlegemers membraner og derved sandsynligvis påvirker kanaler i membranerne, som parasitten benytter i forbindelse med vækst og formering.

Til trods for, at dette resultat ikke i sig selv giver nye lægemiddelstoffer mod malaria, bidrager opdagelsen stærkt til at forhindre, at søgen efter nye ledestrukturer kører af sporet. Litteraturen er således fuld af beretninger om påståede antimalariastoffer, som nu alligevel ikke synes at påvirke selve parasittens biokemi.

Vore resultater medvirker således stærkt til, at søgen efter nye lægemiddelstoffer mod malariaparasitten kan foretages hurtigere og mere rationelt.

Nye lægemiddelstoffer

Den nye test har i kombination med moderne teknologi til isolering og strukturoptælling af naturstoffer resulteret i, at vi har identificeret en række nye stoffer med en høj toksicitet mod malariaparasitten. Stofferne undersøges nu nærmere for at afdække deres mulige egnethed til videre medicinsk udvikling.

Forskningen på DFH omfatter også undersøgelser af traditionel naturmedicin. Her er afsløringen af uvrksom naturmedicin, der anvendes i mange udviklingslande, lige så vigtig som fund af nye potentielle lægemiddelstoffer mod malaria.

DFH er således ved at udvikle sig til et sted, hvor forskere fra nær og fjern sender deres stoffer hen for at få dem undersøgt for virkning mod malariaparasitten. Det drejer sig både om private firmaer og om universitetslaboratorier i såvel udviklingslande som industrilande. Samtidig foregår der et omfattende samarbejde for at finde nye antiparasitære stoffer. DFH bidrager således til den globale indsats for at fremme malariaforskning på det kemoterapeutiske plan.



Ph.d. Jette Christensen er forskningsadjunkt ved Institut for Medicinsk kemi.



Ph.d. Dan Stærk er adjunkt ved Institut for Medicinsk kemi.



Cand.pharm. Hanne L. Ziegler er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinsk kemi.



Cand.pharm. Majid Sairafianpour er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinsk kemi.



Ph.d. Jerzy W. Jaroszewski er professor ved Institut for Medicinsk kemi.

Skræddersyede lægemidler til individuelle genomer

Fremtidens lægemidler vil blive skræddersyede til patienternes individuelle arveanlæg. Fordelen er bedre behandlinger og færre bivirkninger. Prisen er, at folks DNA-profiler kommer ud i det offentlige rum. Det rejser etiske spørgsmål og skaber risiko for genetisk diskrimination.

Af Claus Møldrup

Det samme lægemiddel kan virke fortrinligt på én person og være uden effekt på en anden - og måske endda medføre alvorlige bivirkninger. Årsagen er, at vi er genetisk forskellige og derfor omsætter lægemidler på forskellig vis i kroppen. Den genetiske variation i befolkningen medfører, at et lægemiddel typisk kun virker optimalt på 50-70 procent af en patientgruppe.

I de senere år er det så småt blevet muligt at skræddersy nye lægemidler til bestemte patientgrupper, og vi har endnu kun set begyndelsen. I fremtiden vil der i stigende grad blive markedsført lægemidler, som er baseret på genetiske profiler af forskellige grupper i befolkningen eller sågar designet til enkelte individer.

De nye lægemidler er baseret på farmakogenetik - læren om, hvordan vores individuelle arveanlæg påvirker kroppens evne til at omsætte lægemidler. Farmakogenetikken vil først slå igennem i lægemedelforskningen og ved udvikling af nye lægemidler. Her vil medicinalindustrien anvende DNA-profiler i kliniske forsøg, hvor ny medicin afprøves på mennesker. Ved at begynde med en genetisk screening af deltagerne vil man nemlig på forhånd kunne frasortere personer, som må forventes at reagere dårligt på lægemidlet eller få alvorlige bivirkninger af behandlingen.

Følgelig vil lægemidler, som er målrettet mod undergrupper af befolkningen, i stigende grad blive introduceret på markedet. Der er ingen tvivl om, at farmakogenetikken fremadrettet vil resultere i nye lægemidler med en bedre virkning og færre bivirkninger, og samtidig vil lægemidlerne hurtigere komme på markedet og blive billigere end i dag.

Dét må betragtes som et gode, da udvikling af lægemidler traditionelt er en dyr og langvarig proces, hvor succesraten er til at overse. Samtidig udgør bivirkninger og dårligt samspil mellem forskellig medicin en betydelig byrde for patienterne, de pårørende og for samfundsøkonomien. I USA menes bivirkninger og uheldige vekselvirkninger mellem lægemidler at være en af de hyppigste årsager til dødsfald, og der er næppe grund til at tro, at situationen er anderledes i Danmark og Europa. Der er derfor mange gode grunde til, at medicinsk praksis vil bevæge sig væk fra "one size fits all" til mere skræddersyede behandlinger - og det vil sandsynligvis ske indenfor ganske få år.

Da lægemidlerne er udviklet på baggrund af genetiske pro-

filer, vil patienterne i fremtiden blive klassificeret i forhold til deres individuelle arveanlæg, så de praktiserende læger kan udvælge et specifikt lægemiddel til en specifik patient. I praksis vil udvælgelsen foregå ved brug af en genchip, som analyseres i konsultationen via et tilhørende softwareprogram.

Nye etiske problemer

Trods de åbenbare fordele er farmakogenetikken et tveægget sværd, hvor man risikerer at erstatte én ulempe med én anden. Udviklingen vil nemlig udskifte de terapeutiske ulemper ved nutidens lægemidler med ulemper af mere etisk, social og økonomisk karakter.

Til forskel fra i dag vil læger og myndigheder kunne aflæse specifik information om en patients sygdom og genetiske profil. Lægemidlet bliver med andre ord en genetisk informationsmarkør. Håndteringen af den detaljerede genetiske information vil rejse etiske problemstillinger som hensynet til individets autonomi, herunder informeret samtykke, diskrimination og rettigheder til genetiske data.

Hidtil har disse problemstillinger været begrænset til stærkt kontrollerede screeningsundersøgelser eller til kliniske forsøg på landets universitetshospitaler overfor mindre befolkningsgrupper. I de kommende år vil farmakogenetikken udbredelse betyde, at problemstillingerne også får betydning for den primære sundhedssektor og patienterne i almindelighed.

Ud i offentligheden

Et centralt aspekt ved farmakogenetikken er, at vigtig information om vores personlige genetiske hemmeligheder automatisk bliver en del af det offentlige rum.

Når vi i dag henter receptpligtig medicin på apoteket, indberettes medicinforbruget til Lægemedelstyrelsen og sygeforsikringer. Samtidig er vi offentlige med vores medicin, når denne indtages på arbejdspladsen, i skolen eller når plejepersonale hjælper med at indgive medicinen i hjemmet. På den måde bliver offentligheden bekendt med en persons lægemiddelbrug. Men i fremtiden vil langt flere informationer blive offentligt tilgængelige.

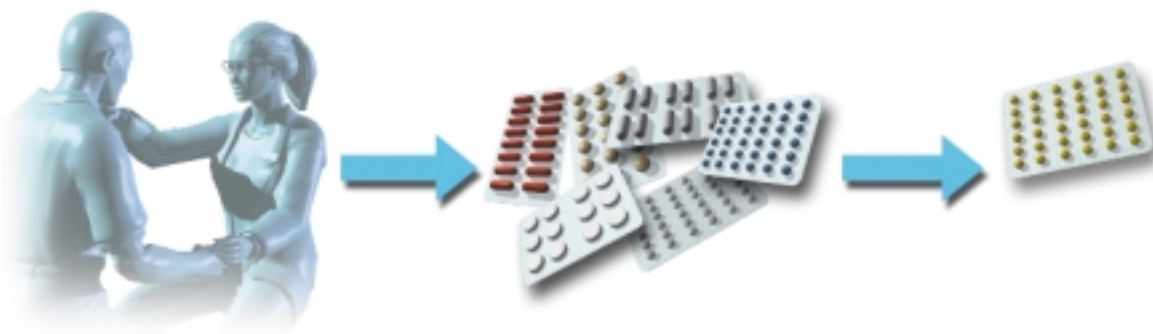
Hvor den praktiserende læge i dag har 35-40 præparater til at prøve sig frem med ved behandling af depression, vil patientens genetiske profil reducere dette antal til 1-2 præparater, som vil have maksimal effekt. På denne baggrund vil såvel direkte som indirekte informationsmodtagere ikke blot kunne opdage, at brugeren har en depression, men også kunne udlede detaljeret viden om vedkommendes genetiske profil, fordi den pågældendes arveanlæg har bestemt valget af det anvendte lægemiddel. Hvis patienten indtager flere typer lægemidler for forskellige diagnoser, vil kombinationen af denne viden kunne give informationsmodtagerne yderli-



Ph.d. Claus Møldrup er post.doc. ved Institut for Samfunds-farmaci.

1. år af post.doc.-projektet er finansieret af DFH og 2. år af Center for Evaluering og Medicinsk Teknologivurdering under Sundhedsstyrelsen.

Nutid



Fremtid



Illustration: Henning Dalhoff

Når en diagnose stilles i dag, f.eks. depression, har lægen 35-40 forskellige præparater at prøve sig frem med, indtil han eller hun – måske – finder det bedste lægemiddel til patienten. I fremtiden vil patientens genetiske profil blive aflæst af en DNA-chip ud fra en blodprøve eller en urinprøve. Ved hjælp af DNA-profilen kan lægen indsnævre antallet af lægemidler til et eller to, som vil have den maksimale effekt på den pågældende patient. Dét er en fordel for behandlingen, men lægers, myndigheders, arbejdspladser og forsikringsselskabers adgang til den genetiske information rejser en række etiske spørgsmål og skaber risiko for genetisk diskrimination.

gere specifik viden om vedkommendes genetiske disposition. Informationerne vil naturligvis kunne sammenholdes med andre oplysninger af social og økonomisk karakter, som til sammen vil kunne give en viden, som patienten måske ikke engang selv er bekendt med. I udlandet har disse emner allerede vakt stærke diskussioner i forhold til diskrimination i forsikrings spørgsmål og på arbejdsmarkedet. Dette er blot nogle få eksempler på, hvordan genetikkens indtog i lægemiddelverdenen er startskuddet til genetikkens indtog i det offentlige rum.

Hvis ikke vi som individer, sundhedssystem og samfund for-

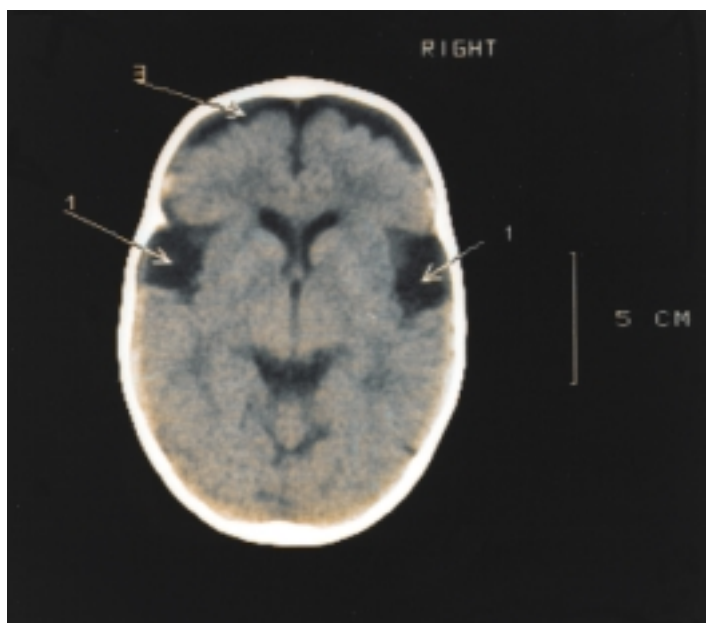
mår at uddanne og oplyse os, så vi opnår en hensigtsmæssig omgang med genetisk information, så vil generne naturligt udspille en af deres grundlæggende fristelser, nemlig lysten til at sladre. Der er således et stærkt behov for at fokusere på de etiske og samfundsmæssige aspekter af nye lægemidler, som vil blive udviklet med udgangspunkt i farmakogenetik. Især er der behov for at inddrage befolkningen og patienterne i debatten gennem deling af viden og gennem oplysning. Ellers er der risiko for, at ubegrundet frygt eller manglende viden vil forhindre udviklingen af en helt ny dimension indenfor rationel medicinsk behandling.

Stofskiftesygdomme - fra gen til terapi

Fejl i stofskiftet er årsag til over 500 kendte sygdomme. Kortlægningen af det humane genom har forbedret mulighederne for at opklare årsagerne til sygdommene og forstå deres biokemi. Udfordringen er nu at udvikle behandlingsmetoder.

Af Trine Meldgaard Lund, Ernst Christensen,
Arne Schousboe og Allan Meldgaard Lund

Mere end 500 sygdomme skyldes fejl i kroppens omsætning af forskellige stoffer, og sygdommene er ofte voldsomt invaliderende. Den første stofskiftesygdom blev beskrevet i 1902 af Archibald Garrod, som beskrev gigtsygdommen alkaptonuri, som ødelægger ledene i kroppen. Garrod postulerede, at en arvelig fejl i stofskiftet var årsag til sygdommen, og det blev senere bekræftet, at gigten forårsages af en defekt i nedbrydningen af aminosyren tyrosin. Han vidste nok, at sygdommen var arvelig, men der skulle gå næsten et århundrede, før genet for alkaptonuri blev identificeret, og de arvelige mutationer i genet blev beskrevet hos patienter med sygdommen. En effektiv behandling findes endnu ikke, men er muligvis på vej.



CT-scanning af hjernen hos et år gammelt barn med GA1. Barnet blev diagnosticeret 7 måneder gammel på grund af bevægeforstyrrelser (dystoni). Der ses den karakteristiske atrofi svarende til pandelapper og tindingelapper. Basalganglierne (putamen og nucleus caudatus) ses ikke på optagelsen, men formodes også at være beskadiget pga. tilstedeværelsen af dystoni.

Fælles for stofskiftesygdomme er, at en omsætningsvej i stofskiftet er ændret, fordi et af de involverede enzymer er defekt. Typisk skal enzymet omsætte et substrat til et produkt. Når enzymet ikke fungerer korrekt, vil substratet blive ophobet i kroppen, mens der opstår mangel på produktet. Desuden kan der via alternative reaktionsveje også dannes for meget af andre stoffer. Det er således ophobning af og mangel på bestemte stoffer, som er årsag til symptomerne ved denne gruppe af lidelser.

Forståelse af sygdomsmekanismerne har ført til, at man i dag kan behandle nogle af sygdommene med diæt, hvor de stoffer, som ophobes i kroppen, fjernes fra kosten, mens man tilsætter de stoffer, som kroppen mangler. Et eksempel er Föllings sygdom (phenylketonuri), som ubehandlet fører til dyb åndssvaghed, men hvor intelligensen er normal, hvis børn med sygdommen kommer på diæt umiddelbart efter fødslen.

Enzymdefekterne bag stofskiftesygdommene er forårsaget af mutationer i det gen, der koder for det pågældende enzym. De sidste årtiers kortlægning af det humane genom har givet os en betydelig forståelse af sygdommenes molekylære baggrund. Samtidig har kendskabet til menneskets samlede arvmasse forbedret mulighederne for at identificere de børn, som har en stofskiftesygdom. Udfordringen i de næste årtier er at bruge denne viden til at udvikle effektive behandlingsformer, som rækker videre end den nuværende behandling af symptomerne.

En alvorlig sygdom

Med dette for øje har vi undersøgt en stofskiftesygdom, som kaldes glutarsyreuri type 1 (GA1). Historien er den samme: De biokemiske ændringer, enzymdefekten og gendefekten er kendt, men den egentlige årsag til sygdommen er ukendt, og behandlingen er derfor kun symptomatisk.

Ved fødslen ser børn med sygdommen umiddelbart raske ud, selv om de kan være lidt slappe, lidt irritable og lidt svære at give mad. Flere af børnene har imidlertid store hoveder, og en CT/MR-scanning af hjernen kan allerede på det tidspunkt vise atrofi, især i pande- og tindingelapperne.

Et år gamle har tre ud af fire børn oplevet en akut krise med svær hjernepåvirkning og været i en grad af koma. Krisen efterlader børnene med udtalte forstyrrelser i deres evne til at bevæge sig. Efterhånden optræder der også spasticitet, og en del af børnene bliver mentalt retarderede. På tidspunktet for den akutte krise viser CT/MR-scanning ødelæggelser dybt inde i hjernen. Disse påvirkninger af hjernen ligner dem, vi ser ved andre neurodegenerative sygdomme, hvor nervecellerne i hjernen henfalder og dør.

GA1 skyldes, at enzymet glutaryl-CoA dehydrogenase ikke fungerer normalt. Hos flere børn med sygdommen har vi tidligere fundet mutationer i det gen, der koder for enzymet.

Glutaryl-CoA dehydrogenase er et af nøgleenzymene i nedbrydningen af aminosyrerne lysin, hydroxylysin og tryptofan. Ved nedsat eller manglende funktion af enzymet ophobes stofskifteprodukterne glutarsyre, trans-glutakonsyre og 3-OH-glutarsyre i kroppen, hvilket formodes at forårsage sygdommens symptomer. Præcist hvordan vides ikke.

Sygdomsbilledet kan pege på både en direkte toksisk effekt og en energimangel i lighed med det billede, vi ser for visse neurodegenerative sygdomme, hvor signalstoffet glutaminsyre overstimulerer nervecellerne i hjernen. Energimanglen kan skyldes, at der opstår skader på cellernes kraftværker, mitokondrierne. Ser man på symptomerne, er der også flere ligheder med de neurodegenerative sygdomme.

På denne baggrund ønskede vi at undersøge, om ophobningen af de tre stofskifteprodukter aktiverer nervecellernes receptorer for glutaminsyre og dermed forårsager en celledød, der kan forklare ødelæggelserne i hjernen. Hvis dette er tilfældet, vil en medicinsk behandling, som blokerer receptorerne for glutaminsyre, muligvis kunne forhindre nervecelledøden.

Forgiftning af nerveceller

I vore forsøg bruger vi kulturer af nerveceller fra mus. I mod-sætning til andre celletyper deler modne nerveceller sig normalt ikke. Men hvis man udtager nerveceller fra musefoster på det rette tidspunkt i deres udvikling, kan man få nerveceller i kultur til at danne et netværk af udløbere, præcis som i den intakte hjerne.

I kulturen såvel som i hjernen foregår kommunikationen mellem nervecellerne via signalstoffer som glutaminsyre. Nervecellerne har flere typer receptorer for glutaminsyre, hvoraf en kaldes NMDA-receptoren. En overstimulering af NMDA-receptorerne forårsager celledød.

Vi kan måle på cellernes overlevelse i kultur ved en test, hvor et gult farvestof tilsættes til kulturerne. Levende celler med intakte mitokondrier er i stand til at omsætte det gule farvestof til et blåt farvestof. Ved at måle på denne omdannelse får vi et mål for cellernes energiomsætning og dermed for deres levedygtighed. Hvis man overstimulerer NMDA-receptorerne og dernæst måler på nervecellernes omdannelse af gult farvestof til blåt, kan man se, at omsætningen falder. Det viser, at mitokondrierne er ødelagt, og at cellerne er mindre levedygtige.

Vi har testet de tre stofskifteprodukter glutarsyre, trans-glutakonsyre og 3-OH-glutarsyre og fundet, at alle tre stoffer slår en del af cellerne ihjel ved blot et døgn behandling i kulturerne. Til sammenligning er patienterne konstant udsat for forhøjede koncentrationer af disse stoffer.

Næste spørgsmål er så, om effekten af stofferne skyldes overstimulering af NMDA-receptorerne eller andre mekanismer. Ved at forbehandle cellerne med et stof, som selektivt blo-

kerer NMDA-receptorerne kan man forhindre celledød, som skyldes overstimulering af NMDA-receptorerne.

I en serie af forsøg, hvor vi først har forbehandlet cellerne med det blokerende stof og dernæst udsat dem for hvert af de tre stoffer, som ophobes i sygdommen, forhindres celledøden. Det er derfor sandsynligt, at de tre stofskifteprodukter overstimulerer nerveceller via NMDA-receptorerne. Den skade, der ses i hjernen hos patienterne, kan således forklares ved denne overstimulering.

Fremtidig behandling

Resultaterne danner basis for at udvikle nye strategier for behandling af GA1 udover den nuværende behandling, som består af en diæt. Behandlingen kunne inkludere blokade af NMDA-receptorerne.

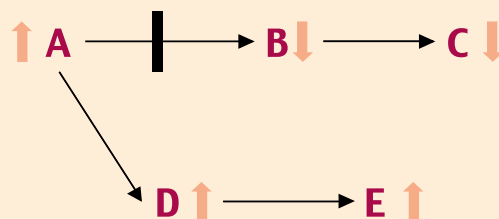
Fremtidige studier må afklare effekten af en sådan behandling. Her kan man bl.a. anvende de såkaldte knockout dyr, hvor der er slukket for et bestemt gen. Hvis genet for enzymet glutaryl-CoA dehydrogenase mangler i et forsøgsdyr, vil vi have en god sygdomsmodel for GA1.

Det er en klar udfordring i den post-genome æra at forbedre behandlingen af GA1 børn og børn med andre stofskiftesygdomme, specielt fordi let tilgængelig screening af nyfødte snart vil muliggøre en tidlig behandling.

STOFSKIFTESYGDOMME

Stofskiftesygdomme skyldes fejl i en omsætningsvej i stofskiftet, og fejlene opstår, fordi et enzym ikke fungerer korrekt. Tegningen viser en skematisk fremstilling af en omsætningsvej. Det defekte enzym, symboliseret ved den sorte blok, skal normalt omsætte substratet A til produktet B, som videre omsættes til produktet C. Når enzymet ikke fungerer korrekt, opstår der mangel på stofferne B og C, mens der sker en ophobning af substratet A og en stigning i nedbrydningsprodukterne D og E via alternative reaktionsveje.

Effekt af enzyummangel på stofomsætningen



Ph.d. Trine Meldgaard Lund er lektor ved Institut for Farmakologi.



Civilingeniør Ernst Christensen er laboratorieleder ved Klinisk Genetisk Afdeling, Rigshospitalet.



Dr.scient. Arne Schousboe er professor ved Institut for Farmakologi.



Pædiater Allan Meldgaard Lund er 1. reservelæge ved Klinisk Genetisk Afdeling, Rigshospitalet.

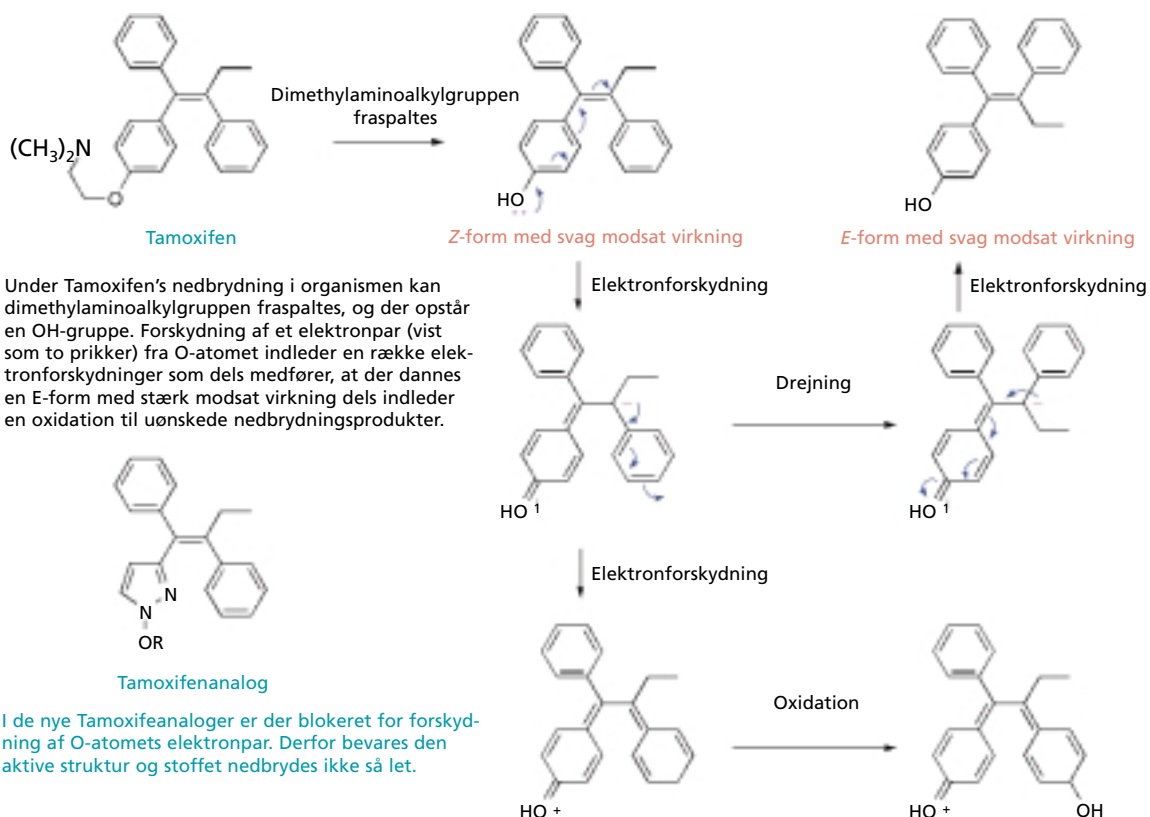
Håb om bedre behandling af brystkræft

De lægemidler, som i dag anvendes til behandling af brystkræft, nedbrydes for hurtigt i kroppen. En serie nye lægemiddelstoffer er mere stabile og vil derfor sandsynligvis virke i længere tid. Flere af stofferne hæmmer væksten af kræftceller mere end de almindeligt benyttede lægemidler.

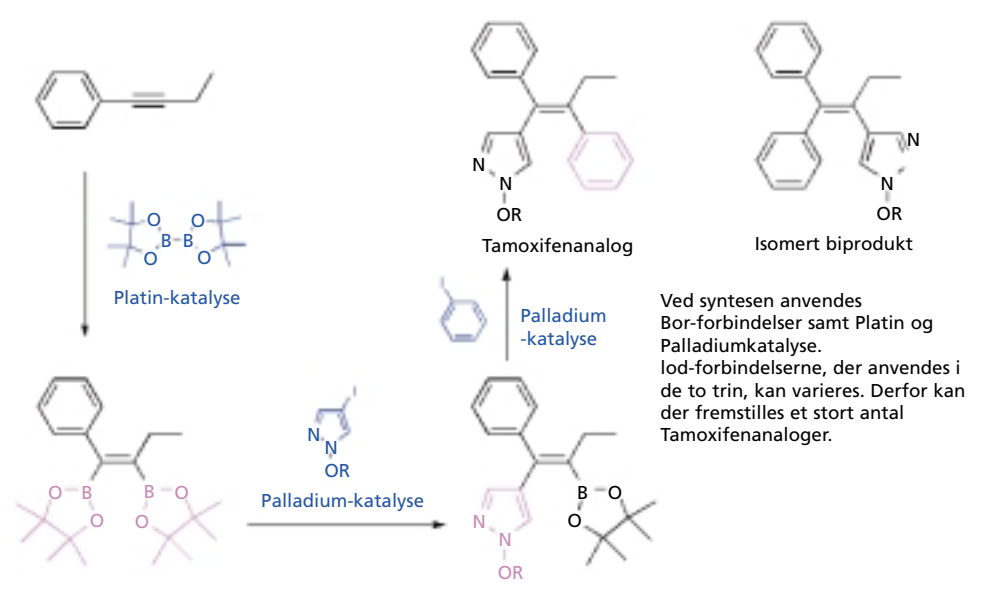
Af Martin Wenckens, Per Vedsø, Mikael Begtrup og Palle Jakobsen

Omkring hver tiende kvinde bliver ramt af en eller anden form for brystkræft. For dem kan en medicinsk behandling have fordele, hvis den er effektiv og uden bivirkninger. I dag bruger lægerne bl.a. præparatet Tamoxifen til behandling af brystkræft. Tamoxifen er et syntetisk hormon, der har

antiøstrogen effekt på kræftceller. Stoffet virker ved at fortrænge det kvindelige kønshormon østrogen fra en bestemt receptor, som findes i et meget større antal på kræftceller end på raske celler. Når østrogen er bundet til receptoren, danner cellen nye proteiner. Når Tamoxifen binder sig til receptoren, ændrer den struktur og produktionen af proteiner går i stå. Det resulterer i, at kræftcellen ikke kan danne de proteiner, den har brug for, og til sidst dør den. Desværre nedbrydes Tamoxifen ret hurtigt i kroppen af et enzym, hvorved virkningen ophører. Samtidig medfører nogle af nedbrydningsprodukterne bivirkninger, som sandsynligvis skyldes, at stofferne virker som østrogen. Andre af Tamoxifens bivirkninger kan skyldes, at lægemidlet også påvirker sunde celler og således ikke virker selektivt nok. I et projektsamarbejde mellem Novo-Nordisk Health Care



Tamoxifen er et af de mest almindeligt anvendte lægemidler til behandling af brystkræft. De nye analoger til stoffet er mere stabile end Tamoxifen, hvorfor de sandsynligvis virker i længere tid i kroppen.



Figuren viser princippet i den fleksible, trinvis syntese af analoger til Tamoxifen.

Discovery A/S og Syntesegruppen på DFH har vi forsøgt at forbedre Tamoxifen ved at ændre på stoffets struktur.

Nye Tamoxifen analoger

En af nedbrydningsvejene for Tamoxifen i kroppen starter med, at en bestemt kemisk gruppe spaltes af lægemidlet. Herved får nedbrydningsproduktet en fri fenolgruppe, som giver stoffet en svag østrogen virkning i stedet for den ønskede antiøstrogene effekt, som Tamoxifen normalt besidder. Fenolgruppen fremmer yderligere kemiske ændringer af nedbrydningsproduktet, så det får en kraftig østrogen effekt og altså virker stik modsat Tamoxifen selv.

Samtidig accelererer den frie fenolgruppe også den enzymatiske nedbrydning af Tamoxifen i organismen. Nedbrydningen sker ved oxidation, hvilket både kan inaktivere Tamoxifen og øge stoffets vandopløselighed, så det hurtigere udskilles fra kroppen.

Syntesegruppen på DFH har udviklet en række analoger til Tamoxifen, hvor fenolgruppen er erstattet med en såkaldt N-hydroxyazol. Denne kemiske gruppe opfører sig på mange måder som fenolgruppen, men den er mere stabil. Derfor bevarer stofferne deres aktive kemiske struktur, og samtidig nedbrydes de ikke så hurtigt ved oxidation. Erstatning af fenolgruppen i Tamoxifen med en N-hydroxyazol kan således give en Tamoxifen-analog, hvor den ønskede antiøstrogene virkning bevares i længere tid, og hvor der ikke dannes nedbrydningsprodukter, som virker stik modsat af lægemiddelsstoffet.

Vi har designet en fleksibel syntesevej, hvor et fælles udgangsstof kan bruges til fremstilling af et stort antal forskellige analoger af Tamoxifen.

Biologiske målinger

Tamoxifen virker ved at binde sig til en receptor, som normalt påvirkes af østrogen, og som kaldes ER α . Når østrogen aktiverer receptoren, binder den sig til cellens DNA. Herved tænder receptoren for nogle gener, som så danner nye proteiner i cellen. I kræftceller, hvor celledelingen foregår hurtigt, er der mange aktive ER α -receptorer. Når Tamoxifen binder sig til en ER α -receptor, ændrer den struktur og kan ikke længere binde sig til DNA. Resultatet er, at kræftcellen ikke kan producere de proteiner, den har brug for, og til sidst dør den. Et lægemiddels binding til ER α -receptoren testes ved først at lade radioaktivt mærket østrogen binde sig til receptoren. Derefter tilsættes lægemiddelsstoffet, som nu vil prøve at erstatte østrogen på receptoren. Efter et stykke tid måler man, hvor meget radioaktivt mærket østrogen, der har forladt ER α -receptorerne. Målingerne viser, hvor godt teststoffet binder sig til receptoren sammenlignet med østrogen. Man kan også undersøge et lægemiddels virkning direkte på kræftceller, som dyrkes i kultur. Her tilsættes stoffet over en periode, hvorpå man måler, hvor meget det har hæmmet cellevæksten.

Forsøgene med receptorer viste, at nogle af de syntetiserede stoffer bandt sig til ER α -receptorerne. Disse stoffer blev så afprøvet på kræftceller, og det viste sig, at de kunne hæmme kræftcellernes vækst lige så godt, eller bedre end Tamoxifen. Samtidig er vore stoffer mere stabile og må forventes at have en længere opholdstid i organismen end Tamoxifen.

Den udviklede syntesemetode er fleksibel og vil gøre det let at fremstille et stort antal lignende stoffer med henblik på at finde den helt optimale kemiske struktur.



Cand.scient. Martin Wenckens er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Per Vedsø er research scientist ved Novo Nordisk A/S, Health Care Discovery, Måløv.



Ph.d. Mikael Begtrup er professor ved Institut for Medicinalkemi.



Cand.scient. Palle Jakobsen er forskningskemiker ved Novo Nordisk A/S, Health Care Discovery, Måløv.

Proteiner som lægemidler

Proteiner har et stort potentiale som lægemidler; de er meget biologiske aktive og medfører få bivirkninger. Men proteiner er ustabile og kan blive nedbrudt under fremstillingen eller i det færdige lægemiddel. Derfor er der behov for at stabilisere proteiner, som skal bruges som lægemidler.

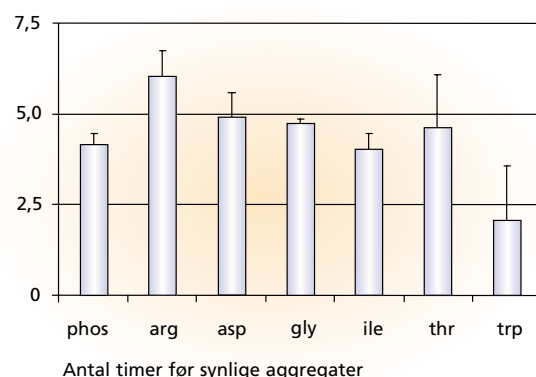
Af Susanne Sønderkær, Lars Lindgaard Hansen, James Flink og Sven Frøkjær

Mange proteiner er lovende som lægemidler, og i dag kan man fremstille proteiner i stor skala ved hjælp af genteknologi. Derfor vil mange nye protein-lægemidler blive markedsført i de kommende år.

Proteiner har flere fordele sammenlignet med almindelige lægemidler, som typisk består af små molekyler. Proteiner findes ofte naturligt i kroppen, hvor de fungerer som cellernes arbejdsheste. Som lægemidler virker proteiner meget specifikt og effektivt, hvilket sandsynligvis vil medføre færre bivirkninger for patienten end ved brug af traditionelle lægemidler.



Proteiner har en meget kompleks struktur sammenlignet med almindelige lægemiddelstoffer, der består af små molekyler. Som eksempel er vist den tredimensionelle struktur af humant væksthormon. Væksthormons struktur er karakteriseret ved fire α -helix-strukturer, der tilsammen danner et bundt.



Tilsætning af forskellige aminosyrer kan påvirke den fysiske stabilitet af væksthormon. Hvis en aminosyre stabiliserer væksthormon, går der længere tid, før væksthormon danner aggregater. Af de undersøgte aminosyrer, er arginin (arg) mest effektiv til at stabilisere væksthormon.

Insulin er et velkendt eksempel på et protein, der bruges som medicin til behandling af sukkersyge. Proteiner anvendes også i behandlingen af kræft (interleukin-2), AIDS (interferon) og ved væksthormonmangel (væksthormon).

Med kortlægningen af det humane genom vil vi komme til at se endnu flere proteinbaserede lægemidler, fordi det vil blive muligt at vise, at bestemte sygdomme skyldes forhøjet eller nedsat produktion af bestemte proteiner. Kroppens produktion af proteiner bestemmes nemlig af vores gener. Hvis en sygdom skyldes underproduktion af et bestemt protein, kan den således behandles med et proteinbaseret lægemiddel.

Proteiners struktur

Proteiner er meget store sammenlignet med almindelige små lægemiddelstoffer, og de har en kompleks tredimensionel facon. Proteiner er opbygget af aminosyrer, der er sat sammen som perler på en snor. Aminosyrekæden foldes først til bestemte karakteristiske strukturer (α -helix og β -sheet), som derefter lejes yderligere. Herved dannes proteinets tredimensionelle struktur, som bestemmer dets biologiske funktion.

For at få et brugbart lægemiddel ud af et protein er vi nødt til at opretholde proteinets rumlige struktur, men desværre er proteinets form ikke særlig stabil og nedbrydes let. Konsekvensen af en sådan nedbrydning kan være tab af virkning eller i værste fald immunologiske reaktioner, som medfører bivirkninger for patienten.

Proteiner nedbrydes ofte ved en mekanisme, der kaldes aggregering, hvor flere proteiner går sammen og danner et



FTIR-spektrofotometeret. I dette projekt anvendes udstyret til undersøgelse af proteiners rumlige struktur. Der findes også mange andre anvendelsesmuligheder, eksempelvis kontrol af råvarekvalitet.

stort kompleks. Det kan medføre, at proteinet inaktiveres eller forårsager bivirkninger hos patienten. Ved formulering af proteiner til lægemidler ønsker vi derfor ikke, at vort protein aggregerer. Tværtimod gælder det om at sørge for, at proteinet forbliver på sin naturlige form.

Naturen har selv opfundet en måde til stabilisering af proteiner, nemlig ophobning af visse små molekyler i de celler, hvor proteiner oplagres. Disse stoffer stabiliserer sandsynligvis proteinerne ved at gøre deres struktur så kompakt som overhovedet muligt, hvilket skaber de bedst mulige betingelser for proteiners stabilitet.

Ved fremstilling af lægemidler, som indeholder proteiner er der risiko for, at proteinerne kan blive nedbrudt under såvel formulering som produktion og oprensning. For at opnå et godt slutprodukt er det nødvendigt at forstå den fysiske og kemiske ustabilitet af proteiner, samt hvordan nedbrydningen påvirkes af formulering og opbevaringsbetingelser.

I dette projekt fokuserer vi især på den fysiske stabilitet af terapeutisk aktive proteiner med henblik på at forstå, hvordan proteiner nedbrydes og stabiliseres ved hjælp af forskellige farmaceutiske hjælpestoffer. Et andet mål er at undersøge, hvorvidt det er muligt at forudsige holdbarheden af et givet protein i en vandig opløsning ved hjælp af en eller flere analytiske teknikker.

Da dannelse af uønskede proteinkomplekser menes at foregå ud fra delvist udfoldede proteiner, må det forventes, at den størst mulige fysiske stabilitet kan opnås i formuleringer, hvor proteinernes struktur er meget kompakt.

Formulering af proteiner

Ved formulering af proteiner bruger man mange forskellige hjælpestoffer for at opnå en stabil formulering. Hjælpestoffer er stoffer uden selvstændig terapeutisk effekt, der tilsættes til lægemidlet; et eksempel er mannitol.

Selvom man i mange år har arbejdet med formulering af proteiner, tilsættes mange hjælpestoffer stadig på basis af erfaringer og ikke ud fra en generel og tilbundsående viden. Årsagen er, at hver enkelt protein er unikt og kræver helt specielle forhold for at bevare sin aktivitet.

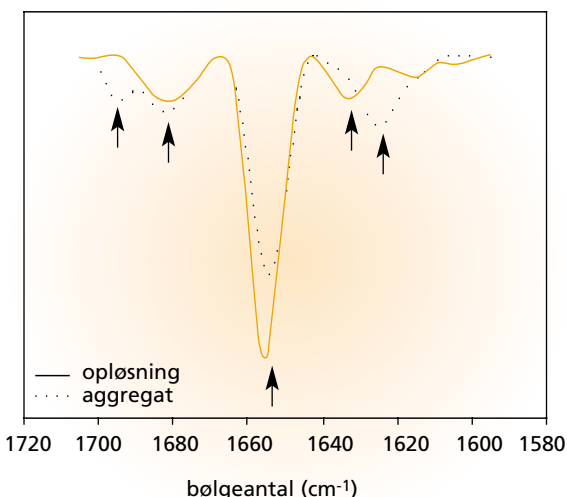
En karakterisering af, hvordan forskellige typer af hjælpestoffer stabiliserer proteiner, vil givetvis kunne gøre det farmaceutiske formuleringsarbejde hurtigere, bedre og billigere. Vi har derfor valgt at se på, hvordan forskellige hjælpestoffer påvirker stabiliteten af udvalgte terapeutisk aktive proteiner.

Et af vore mål er at undersøge effekten af aminosyrer i farmaceutisk relevante koncentrationer på proteiners fysiske stabilitet. Som testsæt har vi valgt seks ud af de 20 naturligt forekommende aminosyrer, og som modelproteiner udvalgte vi væksthormon og insulin.

Effekten af aminosyrerne på et proteins stabilitet undersøges ved at omryste proteinet i en opløsning i kombination med de forskellige aminosyrer. Ved omrytningen dannes der en grænseflade mellem luften og proteinopløsningen, hvilket kan bevirke en delvis udfoldning af proteinerne og dermed mulighed for dannelse af aggregater. Testen gør det muligt at identificere de aminosyrer, som kan stabilisere proteinerne, men forsøgene fortæller ikke, hvilken mekanisme der er ansvarlig for stabiliseringen.

Den rumlige struktur af proteinerne i opløsning og i aggregater kan undersøges ved hjælp af infrarød spektroskopi. Metoden udnytter, at forskellige strukturer i proteinerne absorberer infrarødt lys ved forskellige bølglængder. Ved spektroskopien er det således muligt at få en ide om, hvilke strukturer, der er involveret i dannelsen af aggregater.

Hvis det lykkes at opnå en basal forståelse af, hvordan proteiner stabiliseres og nedbrydes, vil medicinalindustrien kunne formulere nye proteinbaserede lægemidler på et mere rationelt grundlag end i dag. Det vil medvirke til, at nye protein-lægemidler hurtigere vil komme gennem udviklingsprocessen fra idé til markedsføring.



Infrarød spektroskopi (FTIR) giver oplysninger om de strukturelementer, som proteinet er opbygget af, f.eks. α -helix og β -sheet. Figuren viser FTIR-spektre af væksthormon i opløsning og i aggregater. Bemærk at aggregaterne indeholder mange β -sheets, som karakteriseret ved båndene ved 1625 og 1695 cm^{-1} . Karakteristiske bånd er markeret med pile.



Cand. pharm.
Susanne Sønderkær
er ph.d.-studerende
ved Institut for
Farmaci.



Ph.d. Lars Lindgaard
Hansen er kemiker
ved Pharmexa.



Ph.d. James Flink er
specialkemiker ved
Novo Nordisk A/S.



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

Fra krampefremkaldende til krampestillende effekt

Glutaminsyre er hjernens vigtigste stimulerende signalstof, men glutaminsyre er også involveret ved kramper, f.eks. ved epilepsianfald. Det åbner mulighed for at anvende stoffer, der hæmmer glutaminsyres virkning, som nye krampestillende midler.

Af Ulf Madsen, Tine B. Stensbøl,
Hans Bräuner-Osborne og Connie Sánchez

Glutaminsyre er et af hjernens vigtigste signalstoffer, som påvirker stort set alle nerveceller i hjernen. Signalstoffet aktiverer nervecellerne ved at binde sig til receptorer på overfladen af cellerne. En tilstrækkelig stimulering af receptorerne for glutaminsyre er af afgørende betydning for, at hjernen fungerer normalt.

Imidlertid kan forhøjede koncentrationer af glutaminsyre medføre kramper og udbredt nervecelledød, hvilket blandt andet ses under og efter epileptiske anfald. Stoffer, som kan hæmme en sådan overaktivitet af glutaminsyre, er derfor af interesse som nye krampestillende midler til behandling af epilepsi.

Glutaminsyre påvirker et stort antal forskellige receptorer. Overordnet findes der to hovedtyper: de ionotrope receptorer og de metabotrope receptorer. De ionotrope receptorer for glutaminsyre formidler hurtige signaler til nervecellerne ved at lade elektrisk ladede atomer strømme ind i cellerne. Når de metabotrope receptorer aktiveres, påvirkes nervecellens indhold af sekundære signalstoffer, hvilket frembringer langsommere signaleffekter i nervecellerne. Såvel de ionotrope som de metabotrope receptorer er opdelt i tre undergrupper, som hver især er opdelt i et antal undertyper.

Der er tidligere blevet udviklet stoffer, som er meget effektive til at hæmme de ionotrope receptorer. I dyreforsøg har stofferne vist sig at være særdeles virksomme mod kramper, men desværre har de også haft alvorlige bivirkninger. Bivirkningerne skyldes at stofferne blokerer receptorerne for effektivt.

På grund af bivirkningerne ved blokade af de ionotrope receptorer er fokus nu flyttet til de metabotrope receptorer. Disse receptorer modulerer nervecellernes aktivitetsniveau og på grund af deres langsommere signalveje kan de repræsentere en mildere måde at påvirke glutaminsyresystemet på. Målet er at finde nye effektive stoffer, som kan påvirke de metabotrope receptorer, og bruge disse stoffer til at opklare hvilke undertyper af receptorerne, som er vigtige i forbindelse med epilepsikramper. På den baggrund kan det blive muligt at skræddersy lægemidler, som kun påvirker netop de rigtige receptorer, og som derfor ikke vil medføre alvorlige bivirkninger.

Naturstof som ledetråd

I jagten på midler med hæmmende effekt på glutaminsyre-receptorerne har stoffet ibotensyre spillet en afgørende rolle for forskningen i den neuromedicinsk kemiske gruppe på Institut for Medicinsk kemi. Ibotensyre er et naturstof fra rød fluesvamp, og fluesvampens giftighed skyldes blandt andet indholdet af ibotensyre.

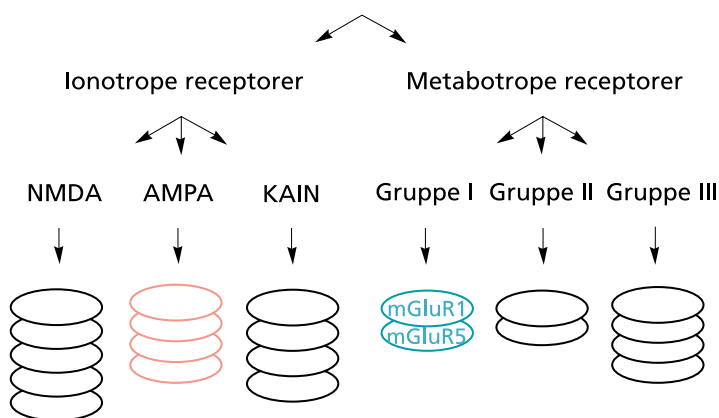
Ibotensyre har potent stimulerende effekt på flere typer glutaminsyre-receptorer, både blandt de ionotrope og de metabotrope receptorer. Ibotensyre er et molekyle, som indeholder en femleddet ringstruktur, og vi har brugt ringen som ledetråd ved syntesen af en række nye forbindelser, hvor den er blevet udstyret med sidekæder af forskellig længde.

Disse stoffer har vist sig at have meget forskellige effekter på de forskellige typer af receptorer for glutaminsyre, og stoffer med selektiv virkning på såvel de tre ionotrope som på de tre metabotrope receptorgrupper er blevet udviklet med ibotensyre som modelstof.

Stoffet homoibotensyre (HIBO) har stimulerende effekt på en af de ionotrope receptorer, men har også vist sig at kunne hæmme de metabotrope receptorer i Gruppe I. Da vi kun ønsker den ene af virkningerne, nemlig hæmningen af de metabotrope receptorer, har vi fremstillet en række nye stoffer ud fra HIBO.

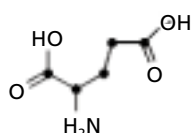
På den måde fandt vi frem til stofferne Hexyl-HIBO og Heptyl-

Glutaminsyre-receptorer

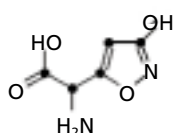


Skematisk oversigt over hjernens glutaminsyre-receptorer.

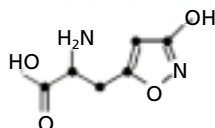
Klassifikationen omfatter de to hovedtyper, ionotrope og metabotrope receptorer, der hver især er opdelt i tre undergrupper, som yderligere er opdelt i et antal undertyper. Af de i alt 23 undertyper er for overskuelighedens skyld kun angivet navne på de to Gruppe I undertyper, som er relevante for dette projekt.



Glutaminsyre



Ibotensyre



HIBO

Kemisk struktur for signalstoffet glutaminsyre fra hjernen, naturstoffet ibotensyre fra den røde fluesvamp og for den syntetiske analog homoibotensyre (HIBO).

HIBO, som slet ikke aktiverede de ionotrope receptorer, men som fortsat er i stand til at hæmme de metabotrope receptorer.

Modvirker kramper i mus

De fremstillede HIBO-analoger hæmmer metabotrope receptorer i Gruppe I, som består af to undertyper. Receptorerne kaldes mGluR1 og mGluR5. Det viste sig, at Hexyl-HIBO havde en hæmmende effekt på mGluR1 og mGluR5, hvorimod

Heptyl-HIBO primært virkede på mGluR1.

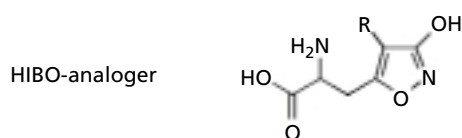
Forbindelserne blev dernæst testet på mus i en krampemodel. Hexyl-HIBO udviste her en krampestillende effekt overfor AIMDA-inducerede kramper. Heptyl-HIBO havde ingen krampestillende effekt.

Forsøgene viser, at den krampestillende effekt af Hexyl-HIBO formentlig skyldes virkningen på mGluR5, hvorimod den selektive effekt af Heptyl-HIBO på mGluR1 er uden virkning

overfor de inducerede kramper.

De gennemførte dyreforsøg blev udført på mus dels ved indgift i blodbanen, dels ved direkte indsprøjtning i hjernen. Kun ved den direkte indgift i hjernen blev de beskrevne effekter opnået. Forsøgene tyder derfor på, at de undersøgte forbindelser ikke kan trænge over blod-hjerne-barrieren og dermed komme fra blodet og ind i hjernen. En anden mulig forklaring kan være, at stofferne nedbrydes i blodet eller i leveren, inden de kan passere blod-hjerne-barrieren.

Den fortsatte forskning er derfor koncentreret om nye forbindelser med den ønskede hæmmende effekt på de metabotrope receptorer i Gruppe I, herunder udvikling af stoffer med selektiv effekt på mGluR5. Vi satser især på at udvikle HIBO-analoger med sidekæder, som kan forbedre stoffernes evne til at trænge over blod-hjerne-barrieren og samtidig forhindre nedbrydning af stofferne i blodbanen og leveren.



Stof	R	Aktivitet
Butyl-HIBO	<chem>CCCC</chem>	AMPA receptor stimulation Gruppe I hæmmende effekt Krampefremkaldende effekt
Pentyl-HIBO	<chem>CCCCC</chem>	Svag AMPA receptor stimulation Gruppe I hæmmende effekt
Hexyl-HIBO	<chem>CCCCCC</chem>	Gruppe I hæmmende effekt Krampestillende effekt
Heptyl-HIBO	<chem>CCCCCCC</chem>	Gruppe I hæmmende effekt (kun på mGluR1)
Octyl-HIBO	<chem>CCCCCCCC</chem>	Inaktiv

Kemisk struktur af fem HIBO-analoger indeholdende uforgrenede sidekæder (R) med 4-8 kulstofatomer. Stoffernes biologiske aktivitet er angivet til højre.



Ph.d. Ulf Madsen er lektor ved Institut for Medicinalkemi.



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



Ph.d. Hans Bräuner-Osborne er forskningslektor ved Institut for Medicinalkemi.



Dr.pharm. Connie Sánchez er afdelingsleder ved Farmakologisk Forskning, H. Lundbeck A/S.

Et bud på fremtidens lægemidler mod epilepsi

I nogle former for epilepsi har patienterne mangel på det hæmmende signalstof, GABA, i hjernen. Derfor er det et problem, at hjernens hjælpeceller tilintetgør signalstoffet, så det ikke kan genbruges. Nu er der håb om at designe lægemiddelstoffer, som selektivt blokerer for gliacellernes optagelse af GABA.

Af Rasmus P. Clausen, Orla M. Larsson, Jeremy Greenwood og Povl Krosgaard-Larsen

Hjernen består af et kompliceret netværk af celler der kommunikerer med hinanden ved udsendelse og modtagelse af signalstoffer. De primære signalstoffer er glutaminsyre og gamma-amino-smørsyre (GABA).

Glutaminsyre overfører stimulerende signaler, som øger modtagercellernes aktivitet, mens GABA overfører hæmmende signaler, som dæmper modtagercellernes aktivitet. Hjernens normale funktion er bestemt af en hårfin balance mellem de stimulerende og hæmmende signaler.

Det er vigtigt for et velfungerende signalsystem, at signaler hurtigt kan bringes til ophør igen. En konstant stimulering af hjernecellerne fører nemlig til celledød, som det ses i Parkinsons syge og Alzheimers syge. Derfor råder hjernen over mekanismer til at kontrollere signaler mellem nervecellerne, så de ikke overstimuleres.

En nervecelle, der udsender et bestemt signalstof, er således i stand til at opsuge overskydende signalstof fra synapseområdet, hvor kommunikationen mellem to nerveceller finder sted. Samtidig findes der hjælpeceller i hjernen, kaldet gliaceller, som ligeledes kan fjerne signalstoffet fra synapsen. Det sker ved hjælp af transportører i cellemembranerne, som pumper signalstoffet ind i cellerne.

Forskellen er, at nervecellen genbruger signalstoffet, mens gliacellerne nedbryder det. Denne forskel kan vise sig at være væsentlig for udviklingen af nye lægemidler.

Mangel på GABA

I nogle typer af epilepsi er der mangel på det hæmmende signalstof GABA i patienternes hjerner. Når GABA's modpart glutaminsyre fortsætter med at stimulere nervecellerne, opstår der epileptiske krampeanfald, fordi der ikke er tilstrækkeligt med GABA til at dæmpe nervecellernes aktivitet og holde den nede på et passende niveau.

Der kan være flere forklaringer på den nedsatte virkning af GABA hos disse patienter. For det første kan nervecellernes lagre af GABA være udtømte, og for det andet kan de receptorer, der påvirkes af GABA, have nedsat følsomhed. En tredje årsag kan være nedsat aktivitet af det enzym, som producerer GABA i hjernen.

Problemet kan tænkes løst på flere måder. Man kan forsøge at stimulere selve produktionen af GABA, eller man kan gøre

GABA-receptorerne mere følsomme overfor signalstoffet. Desuden findes der endnu en mulighed, som bruges i et af de nyere lægemidler mod epilepsi, Tiagabine.

Dette præparat, som markedsføres af Novo Nordisk, blokerer de transportører på nervecellerne og gliacellerne, som pumper GABA ind i cellerne. Resultatet er, at GABA bliver længe i synapseområdet, og de hæmmende signaler forlænges. Det skaber en bedre balance i signalsystemerne, og patienten undgår de epileptiske anfald.

Tiagabine er udviklet på grundlag af nipecotinsyre, som for flere år siden blev opdaget på DFH af den medicinskemiske forskningsgruppe. Gruppen viste, at denne aminosyre meget effektivt blokerer transporten af GABA ind i nerveceller og gliaceller. Opdagelsen var et gennembrud i udforskningen af hjernens GABA-system.

Det er imidlertid muligt at forbedre denne type lægemidler, hvis det lykkes at udvikle lægemiddelstoffer, der selektivt hindrer transport af GABA ind i gliacellerne, hvor signalstoffet nedbrydes. Transporten ind i nervecellerne er mindre problematisk, fordi nervecellerne genbruger GABA og udsender stoffet igen. Lægemidler, som specifikt blokerer gliacellernes evne til at indtage GABA, vil derfor bevare balancen mellem hæmmende og stimulerende signalstoffer. Lægemiddelstoffer, der kun rammer gliacellernes transportører, findes endnu ikke, men nye forskningsresultater på DFH har skabt håb om, at det kan lykkes at designe sådanne stoffer.

Modifikation af strukturer

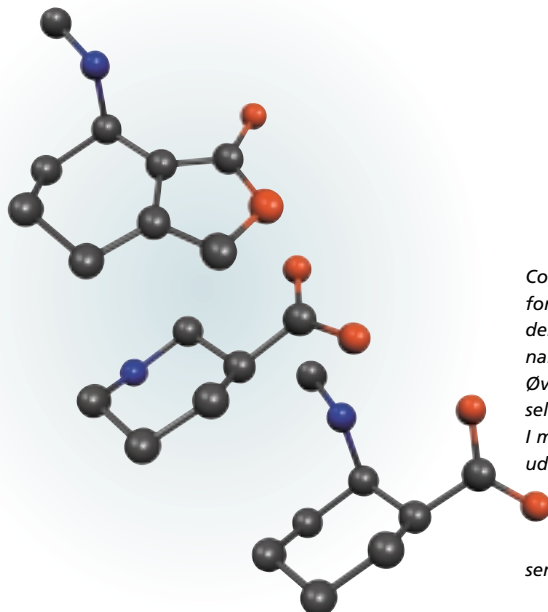
Neuromedicinalgruppen på DFH har gennem flere år beskæftiget sig med stoffer, der virker på transportørerne i nerveceller og gliaceller. Disse stoffer er udviklet ud fra GABA selv, samt ud fra muscimol, som er et af de psykoaktive stoffer i rød fluesvamp.

Ved at manipulere med molekylestrukturen er det muligt at forfine og målrette virkningen af de naturlige stoffer.

GABA-molekylerne har dels en positivt ladet gruppe og dels en negativt ladet gruppe. De tiltrækkes af kemiske grupper med modsat ladning på transportører og receptorer. Det er på den måde, at signalstoffet kan binde sig til transportøren eller receptoren og derved blive genkendt. Muscimol har ladede grupper, der ligner GABA's, hvilket sætter stoffet i stand til at efterligne GABA og påvirke dele af hjernens signalsystem.

Denne mulighed har vi udnyttet ved modificering af muscimol til stofferne THIP og THPO. THIP virker selektivt på receptorerne, mens THPO selektivt rammer transportørerne. Man har på den måde opspaltet muscimols virkning og fået et redskab til at skelne disse to dele af GABA-systemet.

Virkningen af THPO førte til, at nipecotinsyre blev undersøgt,



Computermodeller er vigtige i jagten på den rigtige struktur for udviklingen af en ny type lægemiddelstoffer mod epilepsi, der selektivt kan hindre gliaceller i at optage og nedbryde signalstoffet GABA.

Øverst ses N-Me-exo-THPO, der er det stof til dato, som mest selektivt blokerer for gliacellernes optag af GABA.

I midten ses strukturen af nipecotinsyre, der blev brugt som udgangspunkt for lægemidlet Tiagabine, der blokerer transporten af GABA ind i både nerveceller og gliaceller.

Nederst ses strukturen af et nyt stof, som overraskende viste sig at være uden virkning på de transportører, som sender GABA ind i gliacellerne.

og det viste sig som nævnt, at stoffet havde en langt kraftigere hæmmende virkning end muscimol, fordi stoffet blokerer for optagelsen af GABA i nerveceller og gliaceller. Effekten er efterfølgende blevet yderligere optimeret på Novo Nordisk til lægemidlet Tiagabine, hvis centrale del er nipecotinsyre.

Ved at ændre naturens egne stoffer kan man altså udvikle stoffer, der selektivt rammer transportørerne. Nu forsøger vi ved tilsvarende strukturelle ændringer at designe stoffer, der kun blokerer gliacellernes transportører uden at påvirke transportørerne i nervecellerne.

Gliaselektive stoffer.

THPO viste sig at foretrække gliacellernes transportører frem for nervecellernes, om end denne selektivitet var svag. Årsagen til selektiviteten har vi siden forsøgt at indkredse ved at lave lignende stoffer.

På den måde er det lykkedes at designe stoffet N-Me-exo-THPO, der viste sig at være ikke blot et mere aktivt, men også langt mere selektivt overfor gliacellernes transportører. Denne vigtige opdagelse har vist, at det er muligt at differentiere effektivt mellem transportørerne i gliaceller og nerveceller, hvilket kan få stor betydning for udvikling af lægemidler, der virker på GABA-systemet.

N-Me-exo-THPO blokerer gliacellernes transportører mere effektivt end noget andet kendt stof, men stoffet er ikke egnet som lægemiddel, da det ikke er tilstrækkeligt virksomt. Derfor arbejder vi nu med at ændre N-Me-exo-THPO med henblik på at udvikle terapeutisk anvendelige stoffer. Indsatsen har ikke båret frugt endnu, men forsøgene har givet nogle interessante resultater.

Vi har blandt andet forsøgt at optimere N-Me-exo-THPO ved at udbygge molekylet med en sidekæde fra Tiagabine, hvilket øger aktiviteten betragteligt, men desværre på bekostning af selektiviteten. Desuden har vi ændret N-Me-exo-THPO på samme måde som THPO blev ændret til nipecotinsyre. Herved fås en gruppe stoffer, som vi havde forventet ville virke på transportørerne, men som højst overraskende var inaktive.

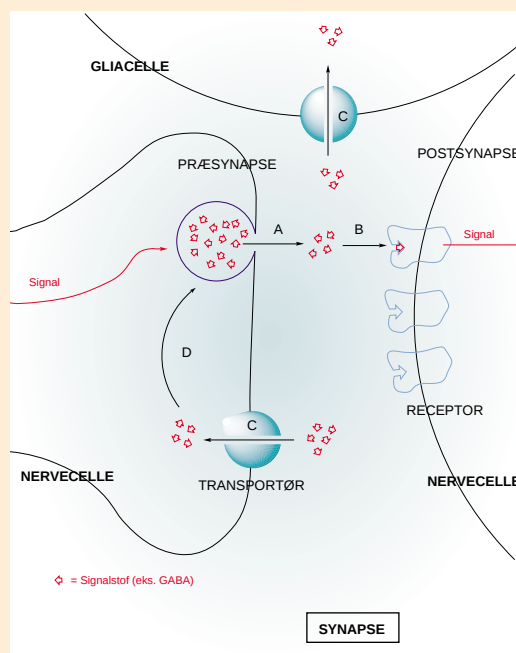
Forklaringen på stoffernes manglende aktivitet på GABA-transportørerne skal muligvis søges i stoffernes tredimensionelle struktur; det er som at stikke en forkert nøgle i en lås. Næste trin i forskningsprocessen vil blive sammenlignende analyser ved hjælp af computersimuleringer, som forhåbentlig kan afsløre, hvilke faktorer der er vigtige for at designe stoffer, som selektivt blokerer for gliacellernes transportører; svarende til den rigtige nøgle i låsen.

Vi opbygger nu en virtuel skabelon på baggrund af disse computersimuleringer, og modellen vil være et vigtigt redskab for design af nye stoffer. I dette puslespil er de uventet inaktive stoffer vigtige brikker, fordi de er med til at vise, i

hvilken retning vi kan gå for at finde de rigtige stoffer.

I de seneste måneder har vi fundet en vej til omdannelse af de inaktive stoffer til farmakologisk aktive forbindelser med en meget spændende og enestående effekt på GABA-transportørerne. Vi forfølger nu aktivt denne ny linje med det mål at bidrage til udvikling af nye lægemidler til behandling af epilepsi.

EN SPECIFIK VIRKNING



Signaler overføres fra en nervecelle til en anden ved hjælp af signalstoffer. Det sker ved, at signalstoffet frigives fra nerveenden på én nervecelle (A), hvorpå signalstoffet genkendes af den anden nervecelle ved, at det binder sig til receptorer på modtagercellens overflade (B). Overskydende signalstoffer opsuges dels af afsendercellen, hvor stofferne genbruges, dels af gliaceller, som destruerer signalstofferne.

I epilepsi opstår der mangel på hjernens vigtigste hæmmende signalstof, GABA, hvorved nervecellerne overaktiveres af det stimulerende signalstof glutaminsyre – resultatet er et epileptisk anfald. Manglen på GABA kan afhjælpes ved at hindre transport af signalstoffet ind i gliacellerne. På den måde undgår man, at GABA nedbrydes i gliacellerne.



Ph.d. Rasmus P. Clausen er forskningsadjunkt ved Institut for Medicinalkemi.



Greenwood er forskningsadjunkt ved Institut for Medicinalkemi.



Arsson er lektor ved Institut for Farmakologi.



Krogsgaard-Larsen er professor ved Institut for Medicinalkemi og rektor på DFH.

Fokus på hjernens støtteceller

Nervecellerne i hjernen er dybt afhængige af deres støtteceller, som er nødvendige for produktion og omsætning af signalstoffer. Studier af støttecellernes rolle i hjernens stofskifte kan bane vejen for nye angrebspunkter for fremtidige lægemidler mod neurologiske lidelser.

Af Helle S. Waagepetersen, Orla M. Larsson og Arne Schousboe

Nervecellerne i hjernen er omgivet af støtteceller, som kaldes astrocytter, og specielt i menneskehjernen er antallet af astrocytter flere gange højere end antallet af nerveceller. Selv om nervecellerne umiddelbart er hjernens mest betydningsfulde celler, så har de senere års forskning vist, at de er helt afhængige af astrocytterne. Uden astrocytter ville kommunikationen mellem nervecellerne gå i stå, fordi astrocytterne hjælper nervecellerne med at producere og omsætte de signalstoffer, som sørger for signalprocesserne i hjernen. Kommunikationen mellem to nerveceller sker i en spalte mellem to nerveender, synapsespalten. Når en nervecelle afsender en besked, frigiver den et signalstof, som krydser synapsespalten og aktiverer en receptor i cellemembranen på den modtagende nervecelle. Herefter påvirkes processerne inde i modtagercellen. Alt efter hvilket signalstof afsenderen

udskiller, kan signalet enten stimulere eller hæmme modtagercellens aktivitet.

Syntese af glutaminsyre

Det vigtigste stimulerende signalstof i hjernen er glutaminsyre. Efter signaloverførslen skal glutaminsyre fjernes fra synapsespalten, hvilket primært sker via optagelse i astrocytterne. I astrocytten inaktiveres glutaminsyre ved omdannelse til glutamin eller ved nedbrydning i citronsyrecyklus. Citronsyrecyklus er en ring af processer, som er centrale for cellernes energiomsætning, og som foregår i cellernes kraftværker, mitokondrierne.

Glutamin kan frisættes fra astrocytten og optages af nervecellen, der bruger glutamin til at gendanne sit signalstof glutaminsyre. Denne recirkulering er nødvendig for nervecellen, da den ikke har andre muligheder for at danne ny glutaminsyre, uden at det sker på bekostning af stoffer, der indgår i citronsyrecyklus. Dette ville være et problem for nervecellen, da den ikke kan binde CO_2 , hvilket er nødvendigt for at producere nye stoffer til citronsyrecyklus.

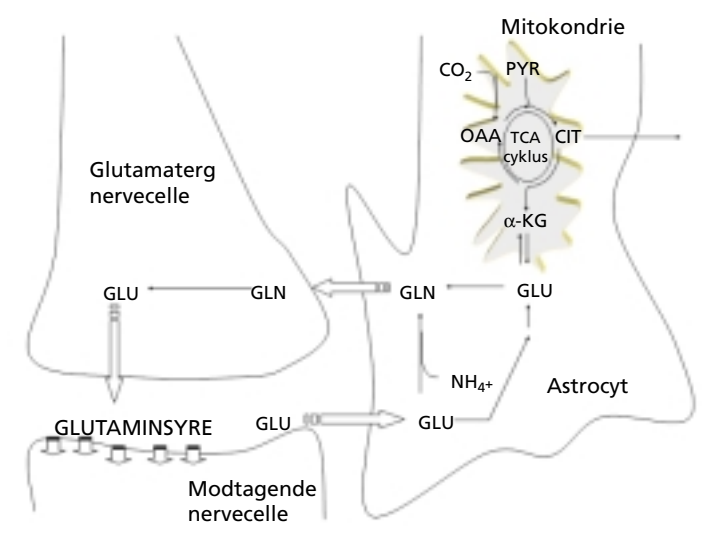
Man kan sige, at nervecellerne er handicappede i deres stofskifte og afhængige af astrocytterne, der er i stand til at binde CO_2 og fremstille nye udgangsstoffer til citronsyrecyklus.

Det er i denne sammenhæng blevet observeret, at astrocytten udskiller store mængder citrat, et stof i citronsyrecyklus. Der er også fundet relativt høje koncentrationer af citrat i væsken, der omgiver cellerne i hjernen. For at kunne udskille citrat er cellen afhængig af, at den kan binde CO_2 via en reaktion med pyruvat. Betydningen af udskillelsen af citrat er langt fra opklaret. Men man ved, at citrat kan regulere niveauet af flere typer positivt ladede ioner, som alle er vigtige i nervecellernes kommunikation, da de på forskellig vis modulerer nervecellernes receptorer, herunder de receptorer, der påvirkes af glutaminsyre.

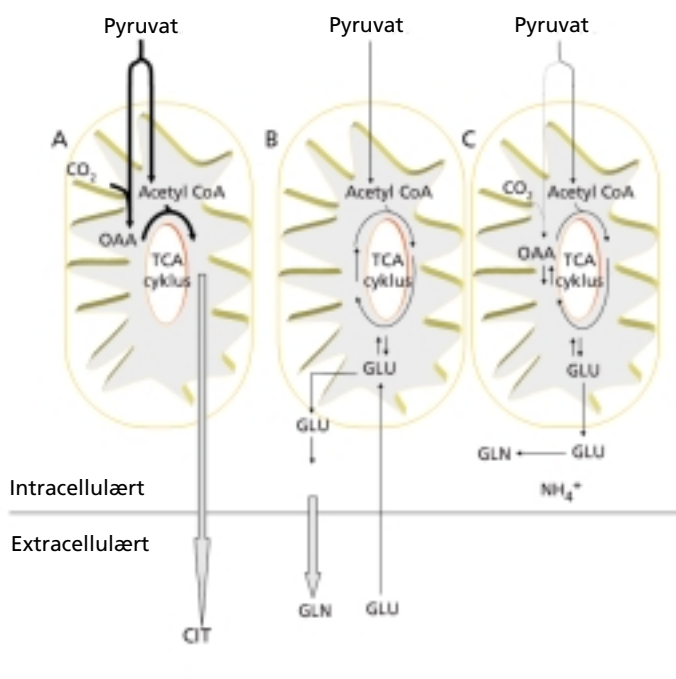
Syntesen af glutamin finder kun sted i astrocytter, og processen påvirker - udover at være en del af glutaminsyre-glutamin-cyklus - reguleringen af mængden af ammoniak i hjernen. Omdannelsen af glutaminsyre til glutamin er den kvantitativt mest betydende proces i hjernen med hensyn til at binde ammoniak. Processen er vigtig, fordi for høje koncentrationer af fri ammoniak kan forgifte både nerveceller og astrocytter, men først og fremmest astrocytter. Beskadigelse af astrocytterne vil naturligvis få alvorlige konsekvenser for nervecellerne.

Forsøg med astrocytter

Vi er interesseret i at opnå mere detaljeret viden om de nævnte omsætningsveje i astrocytternes stofskifte. Det er derfor nødvendigt at isolere astrocytter fra hjernevæv, eksempelvis fra mus, for at kunne være sikre på at andre



Illustrationen viser syntese og frisætning af signalstoffet glutaminsyre fra en nervecelle og optagelse og omsætning af glutaminsyre i en astrocyt. PYR: pyruvat; CIT: citrat; TCA: tricarboxylsyre; α -KG: α -ketoglutarat; GLN: glutamin; GLU: glutaminsyre; OAA: oxaloacetat.



celletyper, såsom nerveceller, ikke påvirker resultaterne. De isolerede og dyrkede astrocytter bliver inkuberet med kulstof 13-mærket glukose, hvor alle kulstofatomer er mærkede. Herefter bliver ekstrakter fra cellerne analyseret med magnetisk resonans spektroskopi og massespektrometri. Med disse analysemetoder er det muligt at følge de mærkede kulstofatomer. Glukose bliver omsat til mærket pyruvat. Den videre omsætning af pyruvat til citrat kan imidlertid følge to forskellige omsætningsveje, og mærkningen gør det muligt at skelne mellem de to ruter. Uden reaktioner mellem pyruvat og CO_2 bliver citrat mærket i to positioner, men når CO_2 bindes til pyruvat, bliver citrat mærket i tre positioner.

Flere slags mitokondrier

Sådanne forsøg har vist, at astrocytter sandsynligvis har specifikke afdelinger inde i cellerne. Til hver afdeling er der knyttet forskellige mitokondrier med hver sine særlige arbejdsopgaver. Afdeling A er karakteriseret ved mitokondrier, som har en høj produktion af citrat for videre frisætning. En produktion, der er fuldt afhængig af den omsætningsvej, hvor pyruvat reagerer med CO_2 .

Afdeling B omdanner glutaminsyre til glutamin. Først optages signalstoffet, når det har udøvet sin effekt på den modtagne nervecelle. Derpå frisætter astrocytterne glutamin til anvendelse i nervecellerne. Man kan sige, at den del af glutaminsyre-glutamin-cyklus, der foregår i astrocytterne, er lokaliseret i afdeling B.

I afdeling C produceres der glutamin, som ikke bliver frisat. Denne syntese af glutamin formodes at have relation til bin-

ding af fri ammoniak og dermed regulering af ammoniakniveauet i hjernen.

Astrocytterne er altså i stand til fysisk at adskille omsætningsvejene i deres stofskifte, selv om processerne involverer de samme udgangsstoffer. Denne evne gør det muligt for cellen at regulere omsætningsvejene hver for sig.

Eksempelvis bevirker opdelingen, at en umiddelbar forøget koncentration af ammoniak ikke fører til forhøjede koncentrationer af glutamin i hjernen, hvilket ville influere på mængden af glutaminsyre og dermed på kommunikationen mellem nervecellerne. Ligeledes er den høje produktion af citrat i afdeling A adskilt fra den øvrige energiomsætning i cellen, hvor citrat indgår som et stof i citronsyrecyklus.

Mål for lægemidler

En kortlægning af astrocytternes specifikke omsætningsveje og deres forskellige mitokondrier kan bane vejen for nye angrebepunkter for fremtidige lægemidler mod neurologiske lidelser. Flere sygdomme i hjernen og i det perifere nervesystem som hepatisk encefalopati, skizofreni og amyotrofisk lateral sklerose er nemlig i et vist omfang knyttet til fejlfunktioner i astrocytterne.

ASTROCYTTER

Astrocytter er celler, der omgiver nervecellernes synapser. Astrocytter er nødvendige for nervefunktionen ved at fjerne signalmolekyler (f.eks. glutaminsyre) og forsyne nerveceller med metabolitter for gendannelse af signalstoffer.



Ph.d. Helle S. Waagepetersen er forskningsadjunkt ved Institut for Farmakologi.



Ph.d. Orla M. Larsson er lektor ved Institut for Farmakologi.



Dr. scient. Arne Schousboe er professor ved Institut for Farmakologi.

Genvej til hjernen via næsen

Det er ofte vanskeligt at sende lægemiddelstoffer ind i centralnervesystemet med blodet, fordi passagen hindres af blod-hjerne-barrieren. Direkte indgift via lugtecellerne i det olfaktoriske område i næsehulen er en interessant mulighed, som nu undersøges i dyreforsøg.

Af Morten Aavad Bagger og Erik Bechgaard

Mange lægemiddelstoffer udøver deres effekt i hjernen eller andre dele af centralnervesystemet. Det gælder f.eks. stoffer, som bruges til at behandle stærke smerter, migræne, epilepsi og Parkinsons syge.

Når sådanne lægemiddelstoffer indgives som tabletter eller ved indsprøjtninger, skal de være i stand til at passere blod-hjerne-barrieren for at virke. blod-hjerne-barrieren er hjernens forsvar mod fremmede stoffer, som cirkulerer rundt i blodet. Barrieren udgøres af cellerne i hjernens kapillær-vægge, hvor åbningerne mellem cellerne er meget små. Derfor er det kun små molekyler, som kan passere gennem åbningerne og komme ind i hjernen.

Dette er en meget effektiv barriere mod mange vandopløselige lægemiddelstoffers passage fra blodet ind i hjernen, da

disse ofte er for store til at slippe gennem nåleøjet. Samtidig indeholder blodkarrene i blod-hjerne-barrieren transportører, der fungerer som udsmidere. Transportørerne genkender forskellige molekulære strukturer og sørger for at pumpe sådanne stoffer tilbage til blodstrømmen. Denne mekanisme tager sig især af fedtopløselige stoffer, hvilket kan blokere for potentielt aktive lægemiddelstoffers adgang til hjernen. I de senere år har en række dyreforsøg imidlertid vist, at der er en mulig genvej for lægemiddelstoffer, som har svært ved at komme ind i hjernen og rygmarvsvæsken. Genvejen går via de nerveceller i næsehulen, som sender duftindtryk ind i hjernen.

Absorption af lægemiddelstoffer via nervecellerne i næsehulen kan have et potentiale indenfor behandling af sygdomme i centralnervesystemet, og samtidig vil bivirkninger, som er relateret til koncentrationen af lægemiddelstofferne i blodet kunne mindskes. For nye konventionelle næsesprays vil eksistens af denne transportvej omvendt kunne medføre øgede dokumentationskrav på grund af risiko for bivirkninger i centralnervesystemet, som ikke vil optræde ved anvendelse af tabletter eller injektioner.

Bagdør til hjernen

Lugtecellerne findes i den øverste, bageste del af næsehulen, hvor kun slimhinden – det olfaktoriske epitel – og en hullet benplade – sibenet – danner barriere mellem centralnervesystemet og de ydre omgivelser. De nøgne ender af lugtecellerne stikker ud gennem slimhinden og rækker således helt ind i næsehulen. Her kan fedtopløselige lægemiddelstoffer optages i nervecellerne og diffundere gennem dem ind til lugtehjernen, som findes i både højre og venstre side af hjernen. Denne transportvej anses for at være relativt langsom med en transporttid til hjernen i størrelsesordenen af timer til dage.

Derimod kan vandopløselige lægemiddelstoffer komme ind i hjernen i løbet af minutter, fordi transportvejen her ikke går gennem nervecellerne, men langs med dem via den rygmarvsvæske, som omslutter nervecellerne helt frem til slimhindens bagside. Optagelse af vandopløselige lægemiddelstoffer gennem slimhinden i næsehulen vil derfor ske til rygmarvsvæsken, hvorfra stofferne kan diffundere videre til væsken mellem hjernecellerne.

På grund af den begrænsede barriere mellem næsehulens duftområde og centralnervesystemet, er det væsentligt, at man i dyreforsøg sammensætter de eksperimentelle lægemidler på en måde, så der ikke opstår skader på dyrenes slimhinder i næsehulen på grund af hjælpestoffer. Flere undersøgelser er gennemført på bedøvede dyr, hvor svælget er afsnøret. Derfor drænes lægemiddelstof og hjælpestoffer ikke bort, som det sker under normale forhold, hvorfor skader på slimhinden lettere kan opstå.

MIKRODIALYSE PÅ DYR

Optagelsen og omsætningen af et lægemiddelstof i hjernen kan måles på forsøgsdyr ved hjælp af mikrodialyse. Princippet er, at lægemiddelstoffet diffunderer gennem en membran ind i en hul nål – en såkaldt probe – der ved lav hastighed gennemstrømmes med en saltopløsning.

Billedet viser en mikrodialyseprobe til kontinuert opsamling af lægemiddelstof fra hjernevæsken i en bedøvet rotte. Den 4 mm lange dialysemembran, som sidder på probens spids, tillader diffusion af molekyler op til 20 kDa. Den viste probes dimensioner er 0,5 x 30 mm, hvoraf membranen udgør 0,5 x 4 mm. Mikrodialyseprober fås, som vist, i en stiv version til implantering i hjernevæv samt en fleksibel version til implantering i f.eks. blodkar.



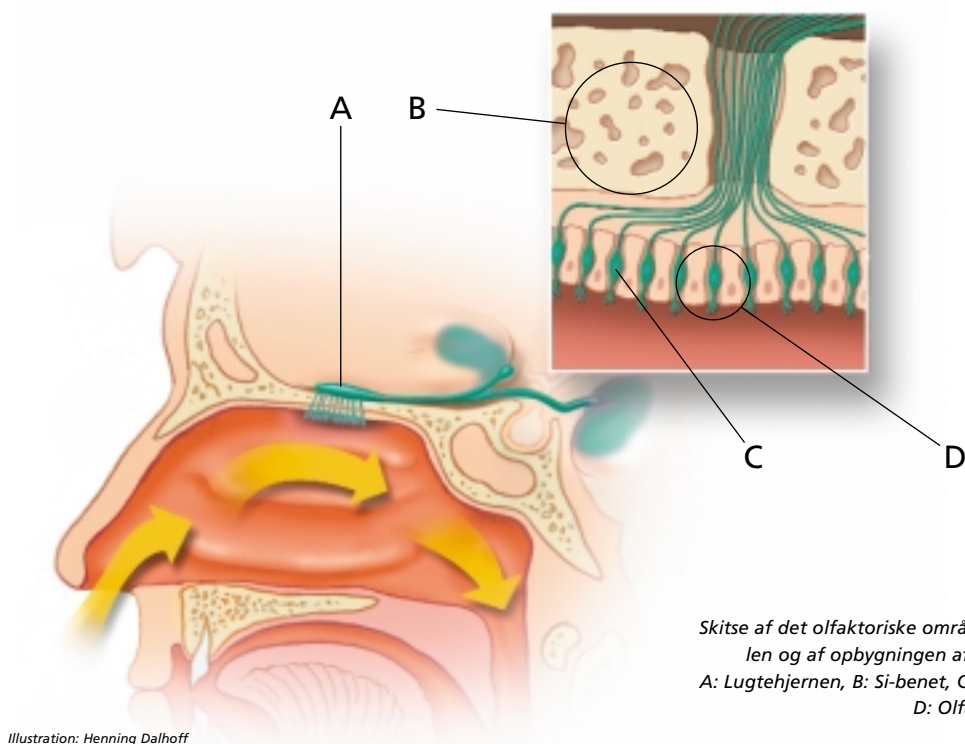


Illustration: Henning Dalhoff

Skitse af det olfaktoriske områdes placering i næsehulen og af opbygningen af det olfaktoriske epitel.
A: Lugtehjernen, B: Si-benet, C: Olfaktorisk nervecelle, D: Olfaktorisk næseslimhinde.



Cand.pharm. Morten Aavad Bagger er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci.



Lic.pharm. Erik Bechgaard er lektor på Institut for Farmaci.

Krav til lægemidler

Da direkte absorption af lægemiddelstoffer via næsehulen hidtil kun er blevet undersøgt i begrænset omfang, er det endnu uklart hvilke fysisk-kemiske egenskaber et lægemiddelstof skal have for at opnå den bedste udnyttelse af den olfaktoriske transportvej.

Det er dog påvist, at lav molekylvægt og moderat fedtopløselighed fremmer transporten af lægemiddelstoffer fra næsehulen til rygmarvsvæsken. Det svarer til, hvad der generelt er optimalt for molekylers passage over biologiske barrierer. Derfor vil lægemiddelstoffer med disse egenskaber ligeledes nemt optages fra næseslimhinden til det almindelige blodkredsløb. Når man arbejder med modelstoffer, er det derfor en fordel at udvælge stofferne på en måde, så den direkte optagelse til hjernen ikke overskygges af absorption via blodkredsløbet.

Direkte optagelse af lægemiddelstoffer via lugtecellerne i næsehulen er tidligere blevet undersøgt ved nasal indgift af radioaktive isotoper af tungmetaller til forsøgsdyr. Dyrene er efterfølgende blevet aflivet, og man har kunnet måle udbredelsen af radioaktivitet fra slimhinden over lugtehjernen og videre ind i den resterende del af hjernen.

Metoden, som også anvendes til at undersøge optagelsen af lægemiddelstoffer, har den ulempe, at der kræves et stort antal forsøgsdyr for at beskrive absorptionen som funktion af tid, ligesom det ikke altid er muligt at opnå kvantitative mål. Derfor er der også blevet udført studier med totalbestemmelse af lægemiddelstoffer i hjernevævet og med løbende opsamling af prøver fra blodet og rygmarvsvæsken på forsøgsdyr.

Et eksempel er L-Dopa, som anvendes til behandling af Parkinsons syge. Det er i dyreforsøg fundet, at koncentrationerne i rygmarvsvæsken i forhold til koncentrationerne i blodet er 10 til 20 gange højere efter indgift i næsehulen end efter injektioner til såvel mus som rotter.

Måling på hjernevæsken

Mikrodialyse er en metode, som kan bruges til opsamling af lægemiddelstoffer fra hjernevæsken. Undersøgelserne kan både gennemføres på bedøvede og ubedøvede dyr, da de ikke medfører væsentlige gener. Dyrene kan endda indgå i overkrydsningsforsøg, hvor forskellige stoffer eller indgiftsformer afprøves i de forskellige grupper af dyr med nogle dages mellemrum, hvilket nedsætter behovet for et stort

antal forsøgsdyr. Samtidig er mikrodialyse en af de eneste metoder, som kan vise, hvordan lægemiddelstoffer over tid fordeles og omsættes i hjernen.

Mikrodialysen foregår ved hjælp af et meget tyndt stålør, som indføres i hjernen på forsøgsdyret. De yderste 1-10 millimeter af røret består af en rørformet dialysemembran. Små molekyler i hjernevæsken kan trænge gennem membranen og over i den saltopløsning, som røret ved lav hastighed gennemstrømmes af. Derimod er membranen lukket for store molekyler som blodceller og proteiner, hvilket letter det efterfølgende analysearbejde.

Når et lægemiddelstof indgives gennem næsehulen og kommer ud i hjernevæsken, vil stoffet således diffundere gennem membranen og komme ind i saltopløsningen. Denne opsamles løbende i fraktioner, som senere kan analyseres med henblik på bestemmelse af sammenhængen mellem tid og koncentration.

Ved anvendelse af mikrodialyse fortages implanteringen ved hjælp af udstyr, som muliggør en meget præcis placering af røret, således at den ønskede struktur i hjernen rammes. På grund af de små dimensioner kan implanteringen ske uden væsentlig skade på det omkringliggende væv.

Det er vigtigt, da resultaterne af forsøgene kun er pålidelige, når der ikke sker skader på blod-hjerne-barrieren. Sådanne skader er naturligvis især uacceptable, når man undersøger transporten til hjernen af lægemiddelstoffer, som normalt kun passerer blod-hjerne-barrieren i begrænset omfang. Kontrol af den fysiske integritet af blod-hjerne-barrieren kan foretages med intravenøs indgift en fluorescerende markør, som ikke er i stand til at passere en intakt blod-hjerne barriere.

Selv om flere studier af lægemiddelstoffers optagelse via lugtecellerne i næsehulen har virket overbevisende med hensyn til direkte transport til centralnervesystemet, især til rygmarvsvæsken, er det endnu uklart, hvorvidt transportvejen er anvendelig ved behandling af mennesker.

For det første er det oftest små stofmængder, som totalt set absorberes via genvejen til hjernen. For det andet har de anvendte forsøgsdyr - mus, rotter og kaniner - en langt større del af næsehulen dækket med lugteceller, end det er tilfældet hos mennesket. Flere forskningsgrupper arbejder dog på at skabe ny viden på området, og fremtiden vil vise om den direkte transportvej gennem næsehulen vil kunne udnyttes til at behandle sygdomme i centralnervesystemet.

Ind gennem tarmens lymfesystem

Mange potente lægemiddelstoffer opløses dårligt i tarmvæsken og har derfor svært ved at passere tarmvæggen og komme ud i blodet. Transport til blodet via lymfesystemet er en lovende mulighed.

Af René Holm, Anette Müllertz og
Henning Gjelstrup Kristensen

I dag udvælger medicinskemikere ofte nye lægemiddelstoffer efter, hvor godt stofferne binder sig til receptorer, som lægemidlet skal påvirke for at lindre eller helbrede en sygdom. Resultatet af strategien er meget potente lægemiddelstoffer.

Men desværre er stofferne ofte vanskelige at anvende i tabletter, fordi de ikke lader sig opløse i mave-tarm-kanalen. Opløsningen i tarmvæsken er nemlig en forudsætning for, at et lægemiddelstof kan passere tarmvæggen og komme ud i blodet, som skal transportere det hen til virkningsstedet. Svært opløselige lægemiddelstoffer vil altså kun komme ud i blodet i meget beskedent omfang, når de indtages i en almindelig tablet. Dét udgør et reelt problem for den farmaceutiske industri i Danmark, fordi den ringe opløselighed ofte fører til forkastelse af lovende lægemiddelstoffer i løbet af udviklingsprocessen.

Sådanne stoffers opløselighed i mave-tarm-væskerne kan imidlertid øges ved at indtage lægemidlet sammen med et fedtrigt måltid, eller ved at pakke lægemiddelstoffet ind i

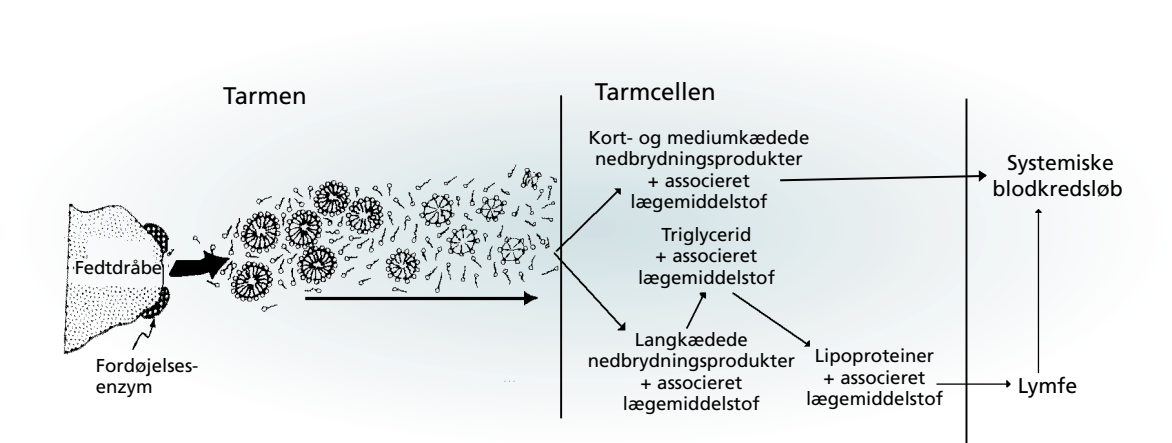
fedt, hvorved biotilgængeligheden af mange tungtopløselige stoffer øges. Den forbedrede optagelse af lægemiddelstoffet skyldes påvirkning fra fedtstofferne under fordøjelsen i tarmen.

Fordøjelse i tarmen

Når man har spist, bearbejdes maden ved tygning og derefter i maven, således at størrelsen af fedtdråberne fra maden formindskes. Herefter tømmes maveindholdet over i tolvfingertarmen, hvor der via galden tilføres fosfolipider og galdesalte samt fordøjelsesenzymer fra bugspytkirtlen.

I tarmvæsken flyder fedtet rundt i dråber som olie i vand. Fosfolipiderne og galdesaltene sætter sig nu på overfladen af fedtdråberne og skaber adgang for fordøjelsesenzymer, der ligeledes sætter sig på fedtdråberne og nedbryder fedtstofferne i mindre bestanddele. I takt med at fedtstofferne nedbrydes, bliver fedtdråberne mindre og mindre, og mængden af nedbrydningsprodukter bliver større og større. Til sidst danner nedbrydningsprodukterne sammen med de tilstedeværende fosfolipider og galdesalte, blandede miceller.

Miceller er små kugler med en fedtholdig kerne og en vandelskende overflade, som øger kroppens optagelse af fedt, fordi den vandelskende overflade muliggør opløsning i tarmvæsken. Tungtopløselige lægemiddelstoffer i en fedtholdig formulering vil under fordøjelsen følge fedtet og ende i micellernes kerner sammen med nedbrydningsprodukterne fra føden.



Triglycerid svarer til, hvad vi i daglig tale kalder for fedt. Triglycerid kan bruges til indpakning af lægemiddelstoffer, som ikke lader sig opløse i tarmvæsken. Figuren viser, hvordan nedbrudt triglycerid danner miceller – små kugler med en fedtholdig kerne omgivet af en vandelskende overflade. De tungtopløselige lægemiddelstoffer indbygges i micellerne, som opløser lægemiddelstofferne.

Micellerne diffunderer ind til tarmvæggen, hvor micellen går i stykker og komponenterne optages af tarmcellerne. Inde i tarmcellerne gendannes langkædede nedbrydningsprodukter til triglycerider, indkorporeres i lipoproteiner og udskilles i lymfen.

Nedbrydningsprodukter med korte og mellemlange kæder optages direkte til blodbanen.



Cand.pharm. René Holm er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci.



Ph.d. Anette Müllertz er lektor ved Institut for Farmaci.



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

Micellerne diffunderer hen til tarmvæggen, hvor de nedbrudte fedtstoffer optages af tarmcellerne sammen med det tungtopløselige lægemiddelstof. Hvad der sker inde i tarmcellerne afhænger af nedbrydningsprodukternes størrelse. Hvis de består af relativt korte kæder af fedtsyrer, bliver de optaget direkte i blodet. Men når kæderne er lange, bliver de oprindelige fedtstoffer gendannet via biokemiske processer i tarmcellerne. Herefter dannes der lipoproteiner ved, at fedtdråberne hægtes på proteiner, som udskilles fra tarmcellerne til lymfekarerne. Fra tarmen transporteres den dannede lymfe op gennem brystet og tømmes ud i blodbanen lige inden hjertet, indeholdende det opløste lægemiddelstof.

Struktureret fedt

Fedt består af triglycerider, der rent kemisk er tre fedtsyrer bundet sammen. Triglycerider, der stort set svarer til det, man i daglig tale kalder fedt, er neutrale forbindelser med mulighed for stor variation i strukturen – disse forskelle er f.eks. årsagen til, at olivenolie adskiller sig fra tidselolie.

En interessant udvikling i biokemien og ernæringsvidenskaberne har været udviklingen af strukturerede triglycerider, som enten er kemisk eller enzymatisk modificerede, så de opnår de fysiske egenskaber og fysiologiske funktioner, som man ønsker. Disse specielt fremstillede triglycerider har fundet anvendelse i behandlingen af patienter med cystisk fibrose og for tidligt fødte børn.

Brug af lymfesystemet

Lymfesystemet er et vidtforgrent netværk af specialiserede kar med fire vigtige funktioner. Den første er at bringe filtreret vævsvæske tilbage til blodet og dermed opretholde kroppens væskebalance. Den anden er at transportere hvide blodlegemer ud i blodet. Den tredje er at indgå i immunforsvaret ved at rense den dannede lymfe i lymfeknuderne for fremmedlegemer, og den fjerde er at transportere fedt bort fra tarmen.

Nyere forskning har vist, at transporten af de fedtholdige næringstoffer via lymfen kan påvirke transporten af tungtopløselige lægemiddelstoffer ud i blodet via lymfesystemet; tilmed i en mængde, der bidrager væsentligt til den totale biotilgængelighed.

Den lymfatiske absorptionsvej for lægemidler er endnu mangelfuldt undersøgt, men den er interessant i forbindelse med formulering af lægemidler. Det skyldes først og fremmest, at der er mulighed for at øge biotilgængeligheden af tungtopløselige lægemiddelstoffer, men også at lægemidlerne transporteres uden om leveren, inden de når blodbanen. Herved undgås nedbrydning af lægemiddelstoffet i leveren.

En øget forståelse af de faktorer, som påvirker optagelsen af lægemiddelstoffer via lymfesystemet kan muliggøre en målrettet optagelse af nogle af de nye potente lægemiddelstoffer, som i dag må kasseres, fordi de ikke lader sig opløse i tarm-

væsken. Optagelsen vil også kunne anvendes til bl.a. behandling af kræft i fremskredne stadier, hvor kræftcellerne har spredt sig, samt til behandling af sygdomme som AIDS, hvor immunforsvarets funktion er nedsat.

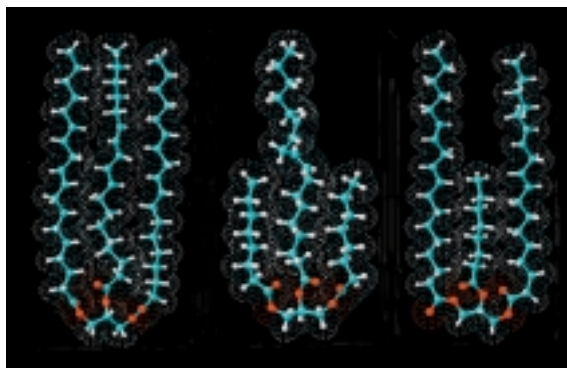
Transport af lægemidler

Vi bruger rotter til at teste forskellige farmaceutiske hjælpestoffers indflydelse på optagelsen af tungtopløselige lægemiddelstoffer; både direkte i blodet og via lymfesystemet.

Ved hjælp af rottemodellen har vi undersøgt de strukturerede triglyceriders potentiale som hjælpestoffer til at fremme biotilgængeligheden af tungtopløselige lægemiddelstoffer. De anvendte strukturerede triglycerider indeholder både fedtsyrer med korte og mellemlange kæder, der optages gennem blodet, og langkædede fedtsyrer, der optages gennem lymfen.

Forsøgene viste, at det var muligt at øge optagelsen både via lymfen og via blodet ved anvendelse af disse kunstige triglycerider. Den umiddelbare konklusion er, at man i fremtiden skal anvende strukturerede fedtstoffer ved formulering af tungtopløselige lægemidler. Men desværre er organismens behandling af de indtagne stoffer ikke let og gennemskuelig. Dyreforsøgene har nemlig vist, at ikke alt det lægemiddelstof, der optages gennem lymfesystemet, kan genfindes i blodet. Årsagen er sandsynligvis, at der sker en ændret fordeling i vævet af lægemiddelstoffet, som påvirkes ved tilstedeværelsen af lipoproteiner i blodet.

Viden om hvordan lægemidler optages i blodet via lymfesystemet og om hvilke fysiologiske forhold, der spiller ind, vil danne grundlag for en rationel – og måske endda innovativ – formulering af lægemidler med større biotilgængelighed og dermed større terapeutisk effekt.



Figuren viser den rumlige struktur af de undersøgte strukturerede triglycerider. Molekylet til venstre er en afbildning af et naturligt forekommende triglycerid. De to andre billeder viser strukturerede triglycerider, som er fremstillet, så de indeholder både mellemlange og lange kæder i forskellige positioner.

Computeren er medicinalindustriens krystalkugle

Det er dyrt for medicinalindustrien at finde ud af, om kroppen er i stand til at optage nye lægemidler. Computere kan forudsige kroppens optagelse af lægemiddelstoffer og gøre udviklingen af ny medicin hurtigere og billigere.

Af Jan Høst, Flemming Steen Jørgensen,
Inge Thøger Christensen, Lars Hovgaard og Sven Frøkjær

Når man udvikler nye lægemidler, er der altid et uomgængeligt spørgsmål: Kan kroppen optage lægemiddelstoffet? Normalt er det mest behageligt for patienten, at lægemiddelstoffet indtages som tabletter og derefter optages i blodet fra tarmen. Hvis lægemiddelstoffet passerer tarmen uden at blive optaget i blodet, har det ingen virkning, og derfor er det vigtigt, at et lægemiddelstof kan trænge gennem tarmslimhinden og komme ud i blodet.

Lægemedelindustrien er naturligvis ikke interesseret i at satse penge og mandskab på lægemidler, der ikke kan passere tarmslimhinden. Jo tidligere under udviklingen af et lægemiddel man bliver klar over, om lægemiddelstoffet kan trænge gennem tarmslimhinden, jo bedre.

Ønskesituationen er at kunne forudsige lægemiddelstoffers evne til at passere tarmslimhinden, inden stofferne er fremstillet. Hidtil har det været nødvendigt at syntetisere lægemiddelstofferne i laboratoriet, før man kan teste deres egenskaber på celler, dyr og mennesker. Hvis man kan beregne lægemiddelstoffers evne til at trænge gennem tarmslimhin-

den på en computer - uden anden input end deres kemiske struktur - kan medicinalindustrien spare mange penge.

Forudsigelse af et lægemiddelstofs egenskaber ud fra den kemiske struktur er en kompliceret proces. De fysiske egenskaber kan være fordelingen af et lægemiddelstof i kroppen, udskillelse af stoffet eller enden til at trænge gennem en biologisk membran som tarmvæggen.

Data til modeller

Vi har beregnet 20 kemiske forbindelsers evne til at trænge gennem tarmslimhinden. Stofferne er valgt ud fra deres forskellighed for at dække et bredt spektrum af kemiske forbindelser. Vi anvender computerprogrammet Volsurf, til at beregne forskellige teoretiske egenskaber for hvert enkelt forbindelse. Volsurf er et internationalt anerkendt program som bl.a. beregner volumen og overfladeareal.

Udgangspunktet for beregningerne er molekylernes kemiske struktur. Dels tager programmet hensyn til hvilke og hvor mange forskellige atomer molekylet indeholder. Men også den tredimensionelle placering af atomerne kommer i betragtning.

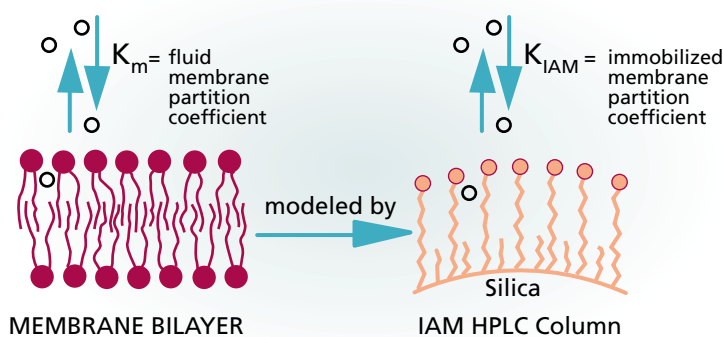
Overfladens karakter har ligeledes stor betydning. Nogle atomer bidrager med en såkaldt vandig overflade. Det er primært ilt og kvælstof samt brint, der sidder direkte bundet til ilt og kvælstof. Denne vandige overflade er meget ladet og ligner dermed vand. Vand har udelukkende denne type overflade, da vand jo består af lutter ilt og brint. En del af molekylernes overflade kan også være ikke-vandig, og den består oftest af kulstof med tilknyttede brintatomer. Denne type overflade ses ofte i fedtlignende kemiske forbindelser og ligeledes i membraner, hvis indre er opbygget af fedt. Lægemiddelstoffer, som primært har en fedtlignende overflade, er normalt bedre til at trænge gennem membraner som tarmslimhinden end lægemiddelstoffer, hvor det meste af overfladen er vandig.

Kort sagt: Volsurf beregner hvor stor en del af overfladen, der er vandig, hvor stor en del der er fedtlignende, samt lægemiddelstoffets volumen og overfladeareal.

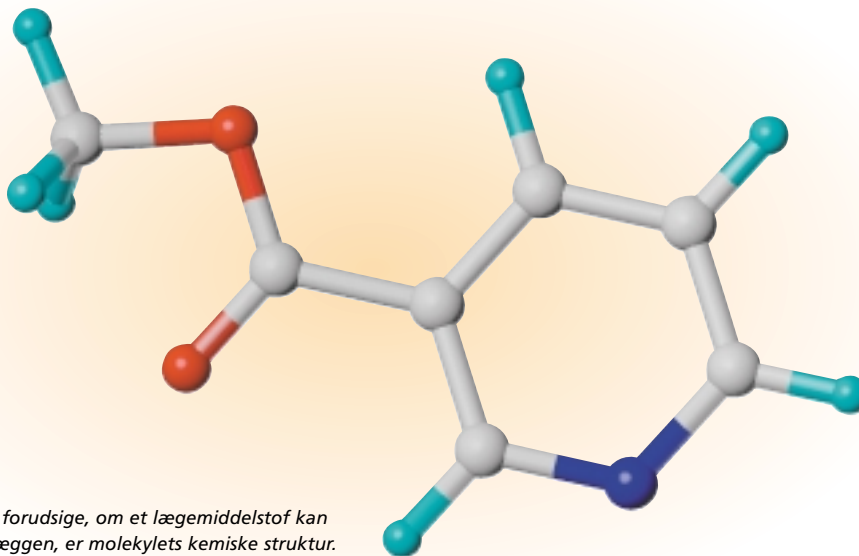
Test af beregninger

Det er nødvendigt at sammenholde beregningerne fra Volsurf med eksperimentelle data for at være sikker på, at de beregnede resultater svarer til virkeligheden. Her bruger vi en kunstig membran til at bestemme lægemiddelstoffers evne til at trænge gennem biologiske membraner som tarmslimhinden. Nogle af de kemiske forbindelser trænger ind i den kunstige membran og tilbageholdes, mens andre ikke trænger ind, fordi de ikke har de rigtige kemiske egenskaber til at trænge ind i membranen. Metoden kaldes for Immobilized Artificial Membrane-kromatografi.

Samtidig udfører vi transportforsøg med levende celler. Her



Lægemedelmolekyleres evne til at trænge gennem tarmslimhinden testes eksperimentelt ved hjælp af den kunstige membran (til højre), der minder om en biologisk membran som tarmslimhinden (til venstre). Stoffer, som kan trænge ind i membranen bindes, mens stoffer uden evne til indtrængning forbliver i den omgivende væske.



Udgangspunktet for at forudsige, om et lægemiddelstof kan trænge gennem tarmvæggen, er molekylets kemiske struktur. Her ses strukturen af Nikotinsyre, methylester.

dyrkes en bestemt type celler, kaldet Caco-2, på et filter, hvor cellerne vokser sammen og danner en tæt membran, som ligner tarmslimhinden. Derefter måles lægemiddelstoffernes evne til at trænge gennem membranen.

Til sidst kædes forsøgsresultaterne fra membrankromatografien og fra arbejdet med Caco-2 cellerne sammen med de egenskaber, som vi har beregnet med Volsurf. Mange af de beregnede egenskaber viser sig ofte at være uden indflydelse på stoffernes evne til at trænge gennem tarmslimhinden, men enkelte har en markant betydning.

Molekylernes volumen og overfladeareal kan umiddelbart bruges til forudsigelse af transporten over tarmslimhinden. Det er ikke nogen overraskelse, at størrelsen har betydning, fordi store molekyler normalt har svært ved at trænge gennem membraner.

Desuden er der en sammenhæng mellem lægemiddelstoffernes evne til at passere membraner og det vandige overfladeareal. Det vandige overfladeareal relaterer sig direkte til sandsynligheden for, at molekylerne danner brintbindinger med omgivelserne. Brintbindinger dannes fra lægemiddelstoffet til den omgivende væske, og de kan kun dannes fra vandig overflade til vandige omgivelser som f.eks. tarmvæsken. Det betyder, at molekyler med meget vandig overflade danner mange brintbindinger, hvis de befinder sig i tarmvæsken, mens de ikke kan danne nogen, hvis de befinder sig i en fedtholdig membran som tarmslimhinden. Molekyler, der kun har en ganske lille vandig overflade, kan selv ikke i vandige omgivelser lave brintbindinger og forskellen til de fedtholdige omgivelser i membranen er derfor ikke så stor for dem.

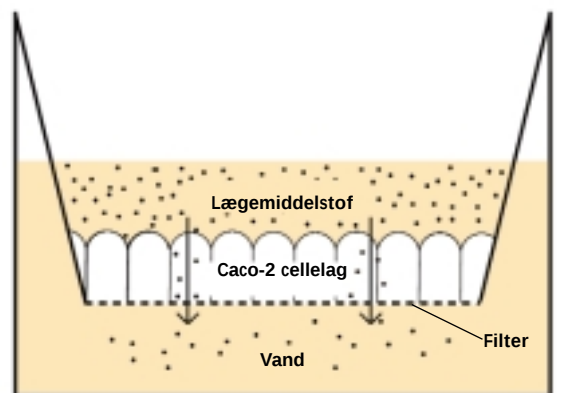
Derfor kan molekyler med en meget vandig overflade ikke trænge ind i tarmslimhinden, da brintbindingerne binder dem til vandet, mens molekyler med en fedtholdig overflade snildt kan vandre gennem membranen, fordi de ikke har brintbindinger.

God sammenhæng

Studierne viser, at der er en god sammenhæng mellem de computerberegnete egenskaber og forsøgsresultaterne fra henholdsvis de kunstige membraner og med Caco-2 cellerne. På trods af den påviste sammenhæng kan der dog gå lang

tid, før computerberegninger helt erstatter eksperimentel bestemmelse af evnen til at gennemtrænge tarmslimhinden. Forudsigelsen er nemlig stadig præget af stor usikkerhed, fordi der er mange andre ting, som påvirker et lægemiddelstofs evne til at passere tarmvæggen end størrelse, overflade og brintbindinger. Indtagelse af føde, som teknisk set ikke har noget at gøre med tarmslimhinden, påvirker lægemiddelstoffets evne til at trænge gennem tarmvæggen. Desuden findes der transportsystemer i tarmslimhinden, der sender molekyler gennem den, hvis molekylerne ellers har de egenskaber, der kræves af pågældende transportør. Disse transportører kan enten øge eller hindre lægemiddelstoffernes passage gennem tarmslimhinden.

Men der er ingen tvivl om, at computerne er kommet for at blive i forskningsverden. I takt med computerens udvikling vil beregningsmetoderne blive mere avancerede, hvilket vil øge præcisionen i forudsigelserne. I fremtiden vil det være muligt at tage hensyn til flere mekanismer i tarmslimhinden, og efter tilbundsående udforskning af alle mekanismerne vil præcise forudsigelser af membranpassagen blive mulig.



Lægemiddelstoffet passerer Caco-2 cellelaget på samme måde som var det en rigtig tarmslimhinde.



Cand.pharm. Jan Høst er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci.



Ph.d. Flemming Steen Jørgensen er docent ved Institut for Medicinskemi.



Ph.d. Inge Thøger Christensen er kemiker ved Novo Nordisk A/S



Ph.d. Lars Hovgaard er direktør ved Galenica Aps.



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

E-screening af lægemidler

Computerbaserede metoder integrerer medicinalkemi og farmaci og gør det muligt både at optimere et lægemiddelstofs biologiske aktivitet og dets biotilgængelighed.

Af Flemming Steen Jørgensen, Jørgen Bonefeld Kristensen og Inge Thøger Christensen

Udviklingen af et nyt lægemiddel er en kompliceret, langvarig og kostbar proces. Ofte er det nødvendigt at fremstille titusindvis af stoffer, hvoraf et eller måske et par stykker efter 5-10 års arbejde ender som nye lægemidler. Det er selv sagt klart, at medicinalindustrien forsøger at optimere udviklingsprocessen, som kan sammenlignes med et forhindringsløb, hvor der ved hver forhindring skilles nogle deltagere fra. Oprindeligt var det medicinalkemikernes job at fremstille et potentielt lægemiddelstof med passende aktivitet og selektivitet. Lægemiddelkandidaten blev derefter sendt videre i systemet med henblik på at opnå en farmaceutisk formulering, som sikrede, at lægemiddelstoffets biotilgængelighed var passende, så det blev optaget i kroppen og nåede det ønskede virkningssted.

For blot få år siden indså man nødvendigheden af at bestemme disse egenskaber så tidligt som muligt under udviklingen

af et nyt lægemiddel. Man er derfor begyndt at udvikle computerbaserede metoder, som alene ud fra et stofs kemiske strukturformel kan forudsige stoffets opløselighed, absorption, transport, metabolisme, udskillelse og senest toksicitet.

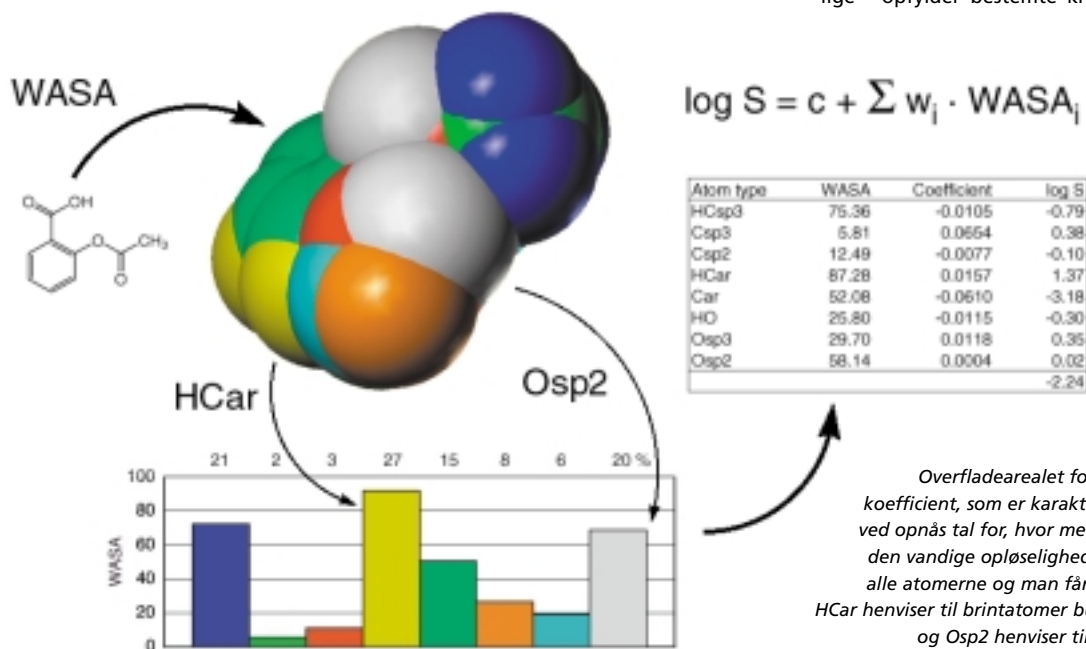
Den største betydning af de nye metoder er, at beregningerne gør det muligt at kombinere de medicinalkemiske og farmaceutiske undersøgelser. Med computerens hjælp kan medicinalkemikerne nu samtidig med optimeringen af aktivitet og selektivitet sikre sig, at de fremstillede stoffer har passende egenskaber og biotilgængelighed i kroppen.

Denne integration af de traditionelle medicinalkemiske og farmaceutiske områder stiller store krav til uddannelsen af personer indenfor begge discipliner. Det projekt, som beskrives her, er da også inspireret af og stærkt påvirket af et samarbejde mellem Institut for Medicinalkemi og Institut for Farmaci.

Forudsigelse af egenskaber

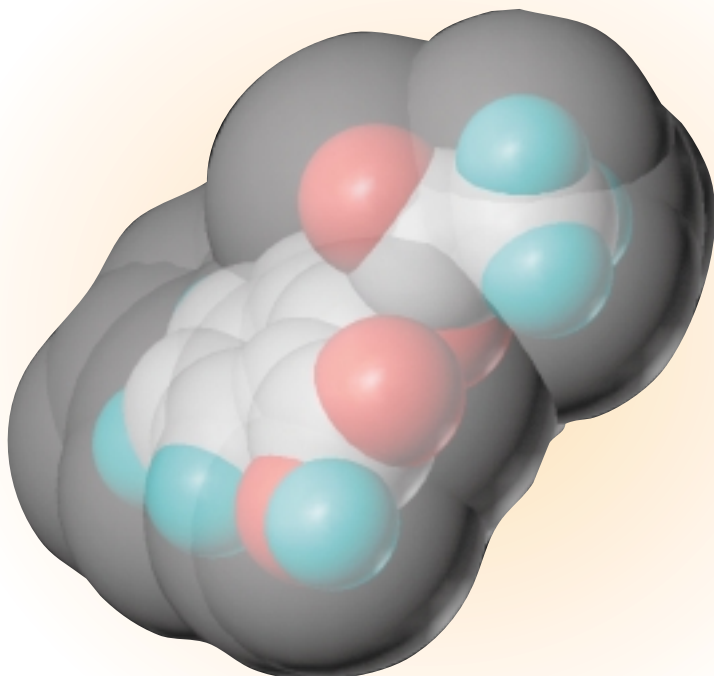
Vi har som udgangspunkt valgt at udvikle to forholdsvis enkle metoder, fordi de skal være tilstrækkeligt hurtige til, at hundredvis eller måske tusindvis af stoffers egenskaber kan forudsiges i løbet af nogle minutter.

Tidsfaktoren er vigtig, fordi man i dag designer og fremstiller biblioteker med tusindvis af stoffer i de indledende faser under udviklingen af et nyt lægemiddel. Her er det nødvendigt, at stofferne - samtidig med, at de er strukturelt forskellige - opfylder bestemte krav til opløselighed, absorption,



Beregning af acetylsalicylsyres vandopløselighed efter ATW WASA princippet. ATW står for Atom-Type Weighed og WASA står for Water-Accessible Surface Area. Baseret på en traditionel kemisk formel konstrueres en tre-dimensionel model af molekylet. Denne model bruges til at beregne, hvor meget de enkelte atomer bidrager til den vandtilgængelige overflade.

Overfladearealet for hvert atom multipliceres med en koefficient, som er karakteristisk for hver atomtype, og der ved opnået tal for, hvor meget de enkelte atomer bidrager til den vandige opløselighed. Endelig summeres bidragene fra alle atomerne og man får molekylets vandige opløselighed. HCar henviser til brintatomer bundet til et aromatisk kulstofatom og Osp2 henviser til iltatomerne i carbonylgrupperne.



Figuren viser en tredimensionel model af acetylsalicylsyre, hvor atomerne er farvet efter type (ilt er rød, kulstof hvid og brint lyseblå). Den vand-tilgængelige overflade, dvs. den overflade, som afspejler, hvor tæt et vandmolekyle kan komme på acetylsalicylsyre, er vist som en halvgennemsigtig sky rundt om modellen.

transport, metabolisme og udskillelse. Tidsforbruget for begge beregningsmetoder er kun omkring 1 sekund pr. stof. Den ene metode, vi har udviklet, bygger på det princip, at et stof består af forskellige atomer og hvert af disse atomer bidrager til stoffets egenskaber. En tre-dimensionel model konstrueres ud fra stoffets kemiske struktur, og hvert atoms bidrag til stoffets vandtilgængelige overflade beregnes. For hver atomtype vægtes arealet nu med en koefficient, som er karakteristisk for atomtypen, og endelig lægges bidragene fra alle atomerne sammen.

Ved den anden metode, fragmentmetoden, deles stoffet op i fragmenter svarende til funktionelle grupper og ringsystemer. Hvert fragment antages at bidrage med en karakteristisk værdi og ved sammenlægning af bidragene fås værdien for den aktuelle egenskab, som vi vil vide noget om. Begge metoder har indtil nu været anvendt til forudsigelse af egenskaber som vandopløselighed, absorption i mave-tarm-kanalen og transport over blod-hjerne-barrieren.

Vandopløselighed

Når et lægemiddel indtages gennem munden, typisk i form af en tablet, skal lægemiddelstoffet først opløses i maven eller tarmen, dernæst passere tarmvæggen og endelig optages i blodet, som sørger for den videre transport. Vandopløseligheden har altså stor betydning for mængden af tilgængeligt lægemiddelstof i mave-tarm-systemet og dermed for absorptionen og biotilgængeligheden af lægemiddelstoffet.

Vi har brugt begge de nye computermetoder til at beregne vandopløseligheden af 1292 strukturelt meget forskellige stoffer. Til denne type forudsigelse var fragmentmetoden bedst (for andre egenskaber er det omvendt), og vandopløseligheden af stofferne kunne forudsiges relativt sikkert.

pH-afhængig opløselighed

Det er ikke kun et stofs vandopløselighed ved neutral pH, som har interesse i lægemiddelsammenhæng. Såfremt stoffet skal opløses i mavesækken, er det også vigtigt at kende dets opløselighed i sur væske.

Vi har derfor forsøgt at udvide begge metoder til ikke blot at kunne forudsige opløseligheden i rent vand, men også til at estimere opløselighedens afhængighed af pH. Desværre vanskeliggøres dette af manglen på eksperimentelt bestemte pH-opløselighedsdata. Indtil nu er det dog lykkedes os at forudsige opløseligheden som funktion af pH for simple stoffer, som kun indeholder en svagt sur eller en svagt basisk gruppe. Ovennævnte er kun nogle eksempler på de mange egenskaber, som computerbaserede metoder kan bruges til at forudsige. Metoderne er for tiden inde i en rivende udvikling, og de anvendes allerede ved udvikling af nye lægemidler.

EN SAMLET VURDERING

Computere er allerede i 25 år blevet brugt til at beregne, hvor aktivt et potentielt lægemiddelstof er. Her giver modellerne et bud på, hvor effektivt stoffet er til at aktivere relevante receptorer på målcellerne.

Men det er ikke nok, at et lægemiddelstof er virksomt. Det skal også nå frem til virkningsstedet i kroppen. I de senere år er vi begyndt at bruge computere til at beregne egenskaber som absorption, distribution, metabolisme og udskillelse fra kroppen.

Ved at kombinere de to typer beregninger får man mulighed for både at forudsige lægemiddelstoffets biologiske aktivitet og dets biotilgængelighed. Man finder med andre ord på et tidligt tidspunkt i processen ud af, om et lægemiddelstof er egnet til videre udvikling.

Beregning af acetylsalicylsyres vandopløselighed ved hjælp af fragmentmetoden. Med udgangspunkt i stoffets kemiske formel identificeres karakteristiske grupper eller fragmenter og deres antal bestemmes. For acetylsalicylsyre finder vi f.eks. en methylgruppe, fire-CH= grupper, en estergruppe osv. Opløseligheden beregnes derefter ved at summere bidragene fra hver af disse fragmenter.

Fragment	Counts	Coefficient	log S
-CH ₃	1	-0.3915	-0.39
=CH in a ring	4	-0.3382	-1.35
-C(=O)OH aromatic	1	-0.0338	-0.03
-C(=O)O- ester	1	0.2613	0.26
CH=CH-CH=C-	2	-0.1248	-0.25
CO-O-C-CH=	1	-0.1088	-0.11
			-1.88



Ph.d. Flemming Steen Jørgensen er docent ved Institut for Medicinskemi.



Stud.pharm. Jørgen Bonefeld Kristensen er Novo Nordisk Scholarstipendiat ved Institut for Medicinskemi, hvor han udfører sit specialeprojekt.



Ph.d. Inge Thøger Christensen er kemiker ved Novo Nordisk A/S.

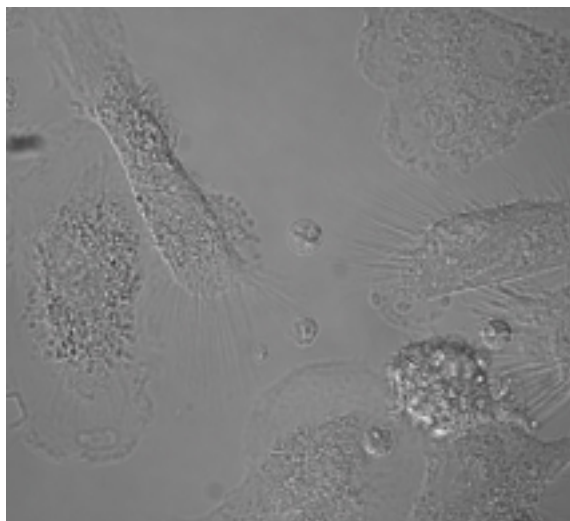
Optagelse af nye vacciner i kroppens immunceller

En række nye vacciner er baseret på proteiner eller DNA fra sygdomsfremkaldende mikrober. Vaccinerne er uden risiko for brugeren, men de virker ikke så effektivt som traditionelle vacciner. Derfor skal de nye vacciner transporteres hen til og optages i netop de celler i immunforsvaret, som vaccinerne skal sætte i alarmberedskab.

Af Camilla Foged, Birger Brodin og Sven Frøkjær

Det er nu mere end 200 år siden, at Edward Jenner opdagede, at levende ko-kopper kan beskytte mennesker mod kopper, og han lagde dermed grunden for den del af lægevidenskaben, som kaldes immunologi. For 100 år siden skabte Louis Pasteur et nyt gennembrud ved at bruge dræbte mikroorganismer som vacciner. Han understregede det vigtige princip, at stimulering af menneskets immunsystem med en lille smule af en sygdomsfremkaldende mikroorganisme kan beskytte mod efterfølgende infektion.

De traditionelle vacciner har været en stor succes i hele verden, og flere sygdomme som f.eks. kopper er i dag udryddet globalt. Men trods succesen er vor viden om, hvordan vacciner virker langt fra tilbundsgående, for der findes stadig mange sygdomsfremkaldende mikroorganismer, som hvert år forårsager millioner af dødsfald, og som vi endnu ikke har været i stand til at udvikle vacciner imod. Nogle eksempler er HIV og malaria.



Transmissionsbillede af dendritiske celler. Bemærk den meget foldede overflade, der giver cellerne en stor overflade til optagelse af mikroorganismer samt til omrøring af det omgivende vandlag og til samspil med andre immunceller.

Indenfor de seneste år har bioteknologien gjort det muligt at fremstille en ny type vacciner, som består af mindre enheder af de sygdomsfremkaldende mikroorganismer, nemlig proteiner og små peptidstumper kaldet peptider samt DNA. Fordelen ved de nye vacciner er færre bivirkninger, fordi kun en lille del af mikroorganismerne præsenteres for kroppens immunforsvar. Samtidig undgår man risikoen for sygdom. Til gengæld er de nye vacciner endnu ikke så effektive til at stimulere immunforsvaret som de traditionelle vacciner.

Nye transportsystemer

Effekten af de bioteknologiske vacciner kan muligvis forbedres, hvis de transporteres direkte hen til de celler i immunforsvaret, som de skal sætte i alarmberedskab. På Institut for Farmaci fremstiller vi forskellige former for transportsystemer, som kan dirigere de nye vacciner hen til de celler i kroppen, hvor de har størst effekt. Vi prøver at udnytte det princip, som bakterier og virus har udviklet til perfektion, nemlig at inficere på den mest effektive måde.

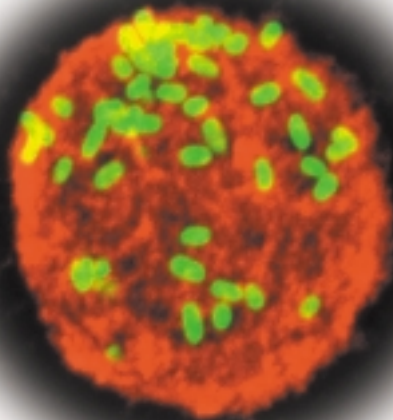
Vi koncentrerer os om partikler i mikro- og nanometer skalaen til transport af vaccinerne; partiklerne har de samme dimensioner som mikroorganismer. Partiklerne skal indkapsle de artsfremmede vacciner, beskytte dem mod nedbrydning og sørge for, at vaccinen frigives på kontrolleret vis på det rigtige sted i kroppen. Endelig skal partiklerne forbedre immunresponset overfor vaccinerne. På verdensplan sættes der på forskellige former for bionedbrydelige partikler af fedtstoffer kaldet lipider samt på polymerpartikler af bl.a. mælkesyre, stivelse og gelatine. I gruppen arbejder en ph.d.-studerende med faste lipid-nanopartikler til DNA-vaccination og en anden ph.d.-studerende undersøger et polymerbaseret system til en kræftvaccine.

Måling af cellulær optagelse

Et af vore mål er at undersøge, hvilken betydning partiklernes fysisk-kemiske egenskaber såsom størrelse, ladning og fedtopløselighed har for deres optagelse i immunsystemets celler.

Vi bruger kulturer af en type immunceller, der kaldes dendritiske celler til undersøgelserne. Forstadier til dendritiske celler dannes i knoglemarven og cirkulerer hele tiden rundt i blodet. De fungerer som immunsystemets skildvagter, der opfanger faresignaler og bevæger sig til infektionsstedet, hvor de optager artsfremmede stoffer. Derpå sætter de gang i et meget effektivt immunrespons. Dendritiske celler kan nemlig provokere immunforsvaret til at reagere på to måder: For det første dannes der antistoffer, som kan neutralisere sygdomsfremkaldende mikroorganismer, og for det andet stimulerer de dendritiske celler dannelsen af dræberceller, som kan genkende inficerede celler og eliminere dem.

Til forsøgene isolerer vi forstadier til dendritiske celler fra don-



Konfokalmikroskopi er en avanceret form for fluorescensmikroskopi, hvor man ved hjælp af en laser og fin optik er i stand til at detektere fluorescens fra et meget tyndt optisk snit uden at medtage forstyrrende lys fra de nærliggende planer. Således kan man ved at mærke celler med fluorescerende markører både se strukturer på overfladen og inde i cellen. Figuren viser et konfokalt billede af en dendritisk celle, som har optaget *E.coli*. Den grønne farve stammer fra *E.coli*. Den røde farve stammer fra et antistof rettet mod en overflademærker på dendritiske celler. Det ses, at *E.coli* efter to timer befinder sig nær cellens ydre membran.



Cand.scient. Camilla Foged er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci. Ph.d.-projektet er støttet af Statens Teknisk Videnskabelige Forskningsråd og Centre for Drug Design and Transport.

orblod og dyrker dem i kultur en uge ved tilstedeværelse af en række stoffer, som fremkalder dannelsen af dendritiske celler. Som modelpartikler anvender vi kommercielt tilgængelige latex-partikler, som har flere fordele; de er velkarakteriserede, de findes i mange veldefinerede størrelser, og de kan mærkes med fluorescerende molekyler, hvilket gør det muligt at detektere dem. Desuden varierer vi ladning og fedtopløselighed på overfladen af partiklerne.

Dendritiske cellers optagelse af disse modelvacciner måles med en type fluorescens-mikroskopi, som kaldes konfokal laser-scanningsmikroskopi, samt ved fluorescens-aktiveret cellesortering.

Projektet har til dato koncentreret sig om opsætning og karakterisering af cellekulturer med dendritiske celler, og desuden har vi udviklet metoder til at bestemme optagelsen i cellerne og koblingen af diverse makromolekyler til modelpartikler. I den næste fase vil vi gå i gang med at kvantificere optagelsen af vaccinerne i de dendritiske celler ved hjælp af fluorescens-aktiveret cellesortering, hvorved man kan måle intensiteten af det fluorescerende lys fra hver enkelt

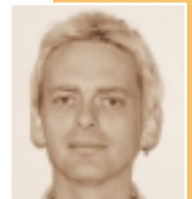
celle. Desuden vil vi se på, hvordan forskellige typer partikler påvirker præsentationen af artsfremmede peptider og dermed det efterfølgende immunrespons.

Langsigtede perspektiver

Vi tror, at studier af partiklernes egenskaber og deres betydning for optagelsen i cellerne kan give os en større forståelse af, hvilke faktorer der er vigtige for at starte et immunrespons ved vaccination med nye bioteknologiske vacciner. En sådan viden vil være værdifuld til design af nye transportsystemer, og vil måske kunne fortælle os, hvilke stoffer, der er bedst egnede som vacciner.

Endelig ønsker vi at undersøge mulighederne for at forøge immunresponsen ved specifikt at kunne dirigere vacciner til dendritiske celler i kroppen. Det kunne gøres ved at koble et molekyle til vaccinen, der genkendes af receptorer på overfladen af de dendritiske celler.

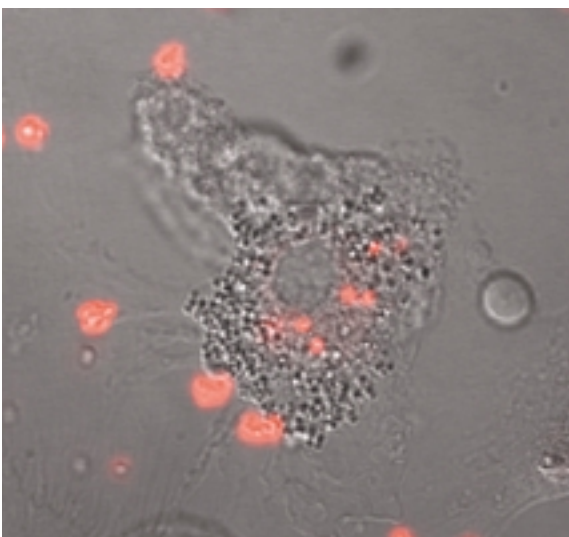
Potentialet af de nye vacciner er stort, og vacciner rettet mod infektionssygdomme, autoimmune sygdomme og kræft udgør spændende nye lægemiddelkandidater.



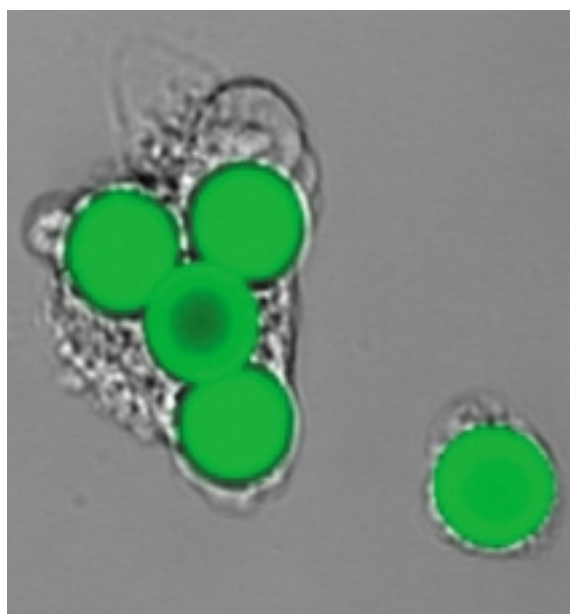
Ph.d. Birger Brodin er forskningslektor ved Institut for Farmaci.



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



Her ses en overlejring af et transmissionsbillede og et konfokalt optisk snit gennem en dendritisk celle, der har været inficeret med *E.coli* i tre timer. Den røde farve stammer fra *E.coli*. Nu befinder bakterierne sig i cytoplasmaet tæt på cellekernen. Bemærk den lille T-celle til højre, der scanner dendritcellens overflade for artsfremmede peptider.



Overlejring af et transmissionsbillede og et konfokalt optisk snit gennem en dendritisk celle, der har været inficeret med 10 μ m latexpartikler i fire timer. Latexpartiklerne er grønne.

DNA-vaccine mod salmonella

Forsøg med vacciner af rotter skal vise, om en ny DNA-vaccine gør dyrene immune over for salmonella. Forskningen kan føre til udvikling af DNA-vacciner mod bakterier, som ofte findes i fødevarer.

Af Jesper Drøgemüller, Peter Thygesen, Erik Riise og Jan Engberg

Vacciner består traditionelt af svækkede bakterier eller virus, som aktiverer immunsystemet til at modstå fremtidige infektioner med den pågældende mikroorganisme. Men der er ulemper ved de traditionelle vacciner. Svækkede bakterier og virus fremkalder typisk de karakteristiske symptomer for sygdommen i mild grad. Selvom symptomerne er mildere end ved den egentlige sygdom, kan de give anledning til en del ubehag, især hos mindre børn. Man kan også vaccinere med komponenter af bakterier og virus, hvorved man ofte undgår disse problemer. Sådanne vacciner aktiverer især den del af immunforsvaret, som sørger for dannelsen af antistoffer, som kan opspore de pågældende mikroorganismer. Men det er ikke altid nok til at nedkæmpe sygdomsfremkaldende bakterier og virus.

For at vaccinationen skal virke optimalt, må man også aktivere den anden del af immunforsvaret. Immunforsvarets anden arm er baseret på dræberceller, som destruerer de celler i kroppen, der er inficeret af mikroorganismer. Dræbercellerne spiller en vigtig rolle ved bekæmpelsen af en række infektionssygdomme, specielt intracellulære bakterier og virus, og her er de traditionelle former for vaccination ikke altid tilstrækkelige til at opnå en effektiv beskyttelse.

På grund af ulemperne ved de eksisterende vacciner forskes der intens i nye måder at vaccinere på. Adskillige studier har vist, at DNA-vacciner er i stand til at stimulere immunforsvaret. Princippet er, at der indføres et stykke DNA fra en mikroorganisme i kroppens egne celler. Genet indeholder opskriften på et protein fra den bakterie eller virus, som man ønsker beskyttelse imod. Når genet er kommet ind i cellerne, producerer de proteinet, hvorpå det bliver præsenteret på cellernes overflader. Det sætter immunforsvarets celler i alarmberedskab mod den pågældende bakterie eller virus. På den måde opnår man en situation, der ligner en egentlig infektion med intracellulære bakterier. For at øge beskyttelsen yderligere kan genet for bakterieprotein indgives i kombination med gener for immunforsvarets signalstoffer, og ved hjælp af dem kan immunresponsen stimuleres i den retning, man ønsker.

Rotter som modelsystem

Som modelsystem har vi valgt infektion med *Salmonella typhimurium* i rotter. *S. typhimurium* er en af de salmonellabakterier, der optræder hyppigt i fødevarerforgiftninger hos mennesker. I organismen lever bakterien inde i cellerne, og dens infektionsmønster ligner en anden salmonellaart, *Salmonella typhi*, der

er årsag til den langt farligere infektionssygdom tyfus hos mennesker. Tyfus optræder hyppigt i situationer, hvor mange mennesker er samlet på et lille areal med få vandressourcer og dårlige sanitære forhold.

Til at alarmere immunforsvaret mod *S. typhimurium* har vi valgt et protein fra bakteriens overflade, det såkaldte flagelprotein (FliC).

For at forstærke immunresponsen vil vi samtidig forsøge at stimulere det cellulære immunsystem. Reguleringen af det cellulære immunsystem er meget kompliceret, og der indgår flere forskellige hjælpeceller og signalstoffer, der stimulerer hjælpecellerne. Et af vigtigste signalstoffer er et gamma-interferon. Af denne grund indeholder vaccinen også DNA, der danner gamma-interferon.

Genet for flagelproteinet er blevet isoleret fra *S. typhimurium* ved hjælp af PCR-teknik. Med denne metode kan man mangfoldiggøre et bestemt gen fra en organisme, så genet efterfølgende kan isoleres. Genet for gamma-interferon er blevet fremstillet på samme måde ud fra hvide blodlegemer fra rotter. For at sikre at rottecellerne udtrykker gamma-interferon, anvendte vi blodlegemer, som blev isoleret fra rotter, der er stimuleret med en ikke dødelig dosis af *S. typhimurium*. Disse celler har en øget produktion af gamma-interferon.

Ved opformeringen af generne for flagelproteinet og for gamma-interferon kobles de to gener sammen således, at de syntetiseres som et sammenhængende protein. De fusionerede gener indsættes derpå i et plasmid, et lille ringformet stykke DNA, der fungerer som genfærge. Plasmidet kan indføre de indsatte gener i både colibakterier og i rotteceller.

Fordelen ved at bruge en sådan genfærge er, at alt DNA-arbejdet kan foretages i colibakterier. Ved at analysere sammensætningen af DNA-molekylerne har vi sikret os, at generne er opformet fejlfrit, at de er koblet rigtigt sammen, samt at de sidder korrekt i forhold til den gensekvens, der starter produktionen af proteinet fra salmonella i kombination med gamma-interferon.

Forsøg med rotter

I første omgang undersøgte vi, om fusionsproteinet kan udtrykkes i cellekultur af celler fra mus. Her brugte vi en analyseteknik, der er baseret på antistoffer, som genkender fusionsproteinet. Metoden er meget følsom, og tilstedeværelsen af det ønskede protein kan spores i meget små mængder. Undersøgelsen viste, at cellerne danner fusionsproteinet.

Næste trin er at afprøve vaccinen i rotter, hvilket vi netop er gået i gang med. DNA'et indgives ved direkte injektion i musklerne, fordi muskelceller er i stand til at optage og udtrykke fremmed DNA. Vaccinationen gentages efter 14 dage på samme måde som i traditionel vaccination for at forstærke immuniseringseffekten. 14 dage efter den sidste vaccination gives rotterne en normalt dødelig dosis af *S. typhimurium*, og vaccinsens effekt på overlevelsen anvendes som mål for vaccinsens effektivitet.



Cand.pharm. Jesper Drøgemüller er undervisningsassistent ved Institut for Farmakologi.



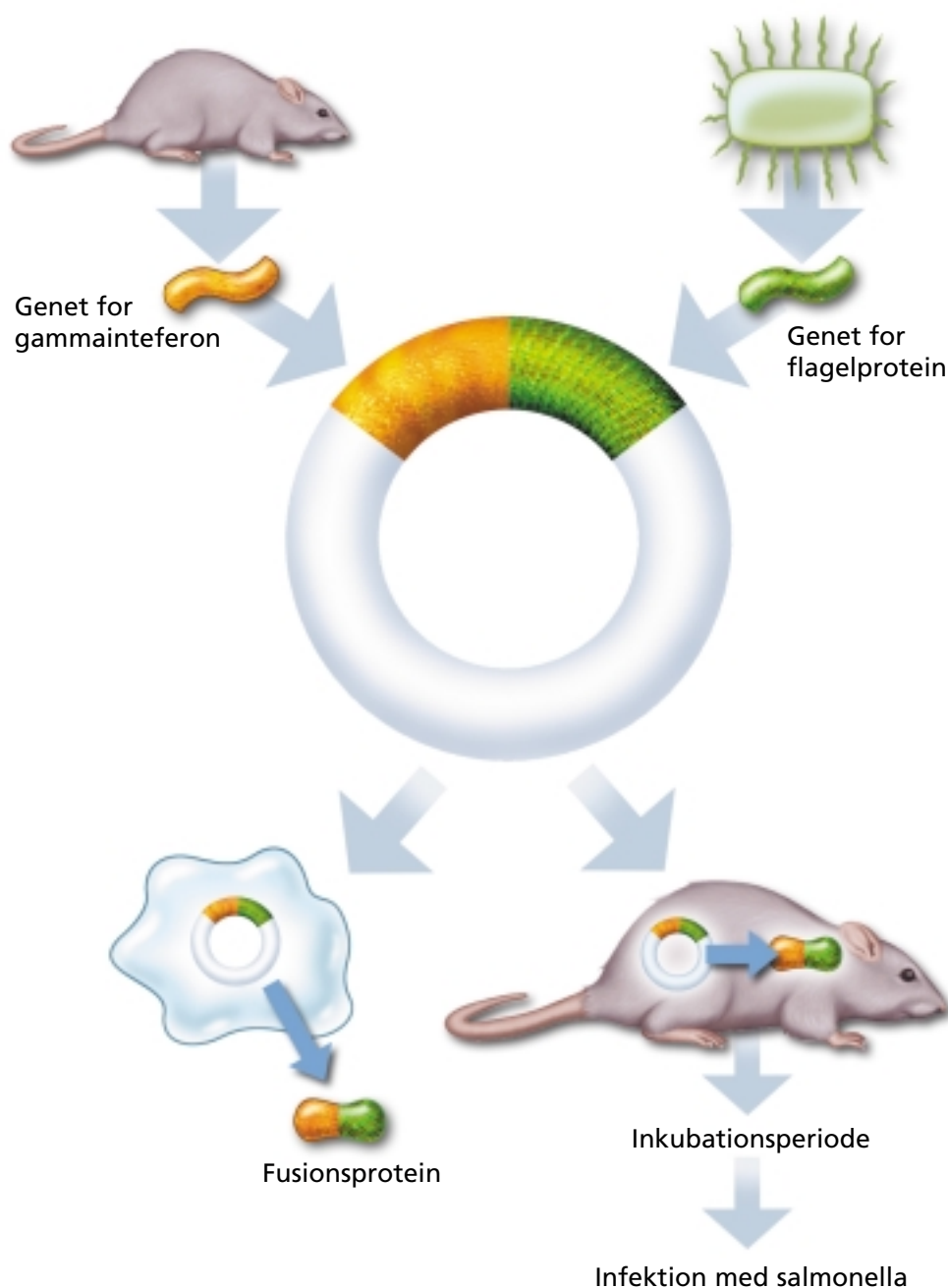
Ph.d. Peter Thygesen er research scientist, Farmakokinetisk Afd. Novo Nordisk A/S.



Ph.d. Erik Riise er lektor ved Institut for Farmakologi.



Dr.scient. Jan Engberg er professor ved Institut for Farmakologi.



Figuren viser princippet i fremstilling af en DNA-vaccine. Genet for flagelproteinet fra salmonella samt genet for gammainterferon, der stimulerer det cellulære immunforsvar, indsættes i et lille ringformet stykke DNA, der fungerer som genfærge. Plasmidet indsættes i cellekulturer (tv), og cellerne danner nu et fusionsprotein af flagelproteinet og gammainterferon. Plasmidet kan bruges til at indføre de to gener i både colibakterier og i rotteceller. Når man ved arbejdet med cellekulturer har sikret sig, at fusionsproteinet dannes og fungerer korrekt, afprøves DNA-vaccinen i rotter (th). DNA'et indgives ved direkte injektion i musklerne, fordi muskelceller er i stand til at optage og udtrykke fremmed DNA.

Højfølsomme mikroteknikker til analyse af blod og urin

For at få tilladelse til at sælge et lægemiddel, må man kunne dokumentere, hvad der sker med lægemiddelsstoffet efter optagelsen i kroppen. Normalt omsættes lægemiddelsstoffer i leveren, og et kendskab til omdannelsesprodukterne og deres udskillelse fra kroppen giver en sikkerhed for lægemidlets uskadelighed.

Af Lars Bendahl, Bente Gammelgaard, Ole Jøns, Ole Farver og Steen Honoré Hansen

Hvad sker der med et lægemiddel efter indtagelsen? Hvilke stoffer omdannes medicinen til? Er omdannelsesprodukterne uskadelige eller giftige? Svarene kan findes ved at analysere blodprøver eller urinprøver fra patienten. Men analyserne kræver, at man råder over meget følsomme og selektive målemetoder.

For at udvikle nye teknikker, der øger mulighederne for følsom og selektiv detektion, er det nødvendigt med både

basal analytisk kemisk forskning og målrettet udviklingsarbejde. På Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi har vi netop kombineret to teknikker på en måde, som muliggør anvendelse af mikroteknikken kapillarelektroforese til analyse af biologiske prøver.

Når det er nødvendigt med meget følsomme metoder ved analyser af blod og urin skyldes det, at de forbindelser, der ønskes analyseret, ofte findes i lav koncentration blandt tusindvis af andre forbindelser. Derfor må man anvende metoder, der først adskiller så mange af stofferne som muligt, og som derefter måler mængderne af de relevante stoffer i en detektor.

Målet med vor forskning har været at kombinere en af de mest effektive separationsteknikker med nogle af de mest selektive og samtidig mest følsomme detektionsmetoder.

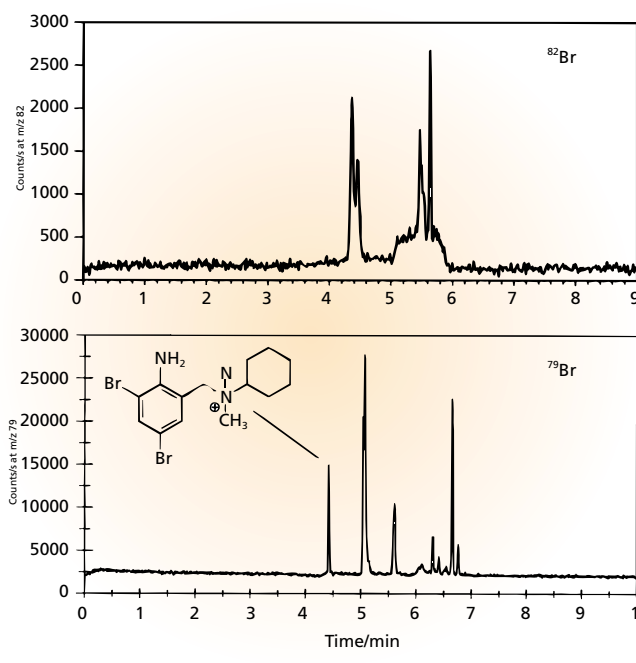
Adskillelse og måling

Separationsprincippet for kapillarelektroforese er baseret på, at prøvens indholdsstoffer vandrer med forskellige hastigheder i et elektrisk felt; små molekyler med en høj elektrisk ladning vil således vandre hurtigere end store molekyler med lav elektrisk ladning. Separationerne foretages i tynde kvartsrør med indre diameter på typisk 25-75 µm, under indflydelse af elektriske feltstyrker på op til ca. 100.000 V/m. Det er en yderst effektiv mikroseparationsteknik, men desværre er følsomheden ved anvendelse af den traditionelle UV-detektionsteknik ikke altid tilstrækkelig til, at metoden kan anvendes ved analyse af biologiske prøver, hvor mange relevante stoffer kun findes i meget små mængder.

To nye teknikker har ændret dette forhold radikalt. Den første er baseret på en sammenkobling af kapillarelektroforese med induktivt-koblet-plasma-massespektrometri (ICP-MS). Her føres prøven ind i et plasma, som har en temperatur på omkring 8.000°C. Den høje temperatur i plasmaet medfører, at alt stof i prøven atomiseres og ioniseres. De positive ioner, der dannes ved processen, føres hen til et massespektrometer, som sorterer dem efter deres masse-ladningsforhold. Man kan altså måle selektivt på udvalgte grundstoffer og oven i købet på enkelte isotoper af et givet grundstof. Tilmed er denne målemetode generelt meget følsom for en lang række grundstoffer.

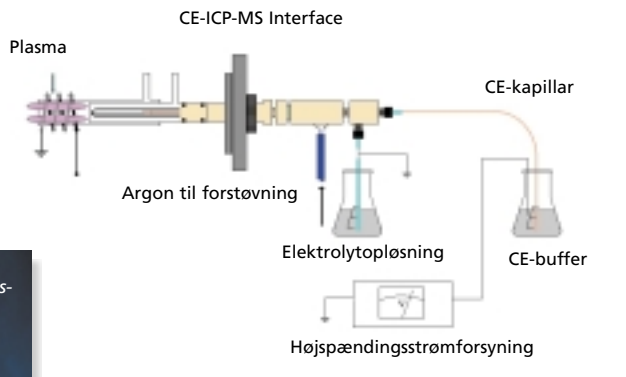
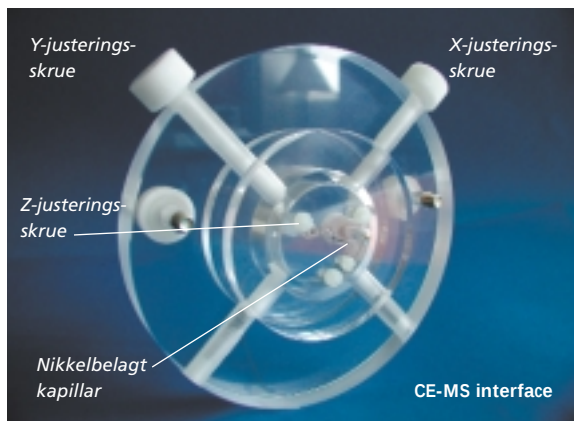
Problemet med at koble kapillarelektroforese on-line til ICP-MS ligger i, at kapillarelektroforese er en mikroteknik, mens massespektrometrien må betegnes som en makroteknik, der kræver store prøvemængder tilført – flere milliliter i minuttet. Til sammenligning er mængden, der kommer fra kapillarelektroforesen mindre end en mikroliter i minuttet.

Hvis massespektrometret skal kunne analysere denne meget lille volumen, skal prøven føres direkte ind i plasmaet. Her er det lykkedes os at udvikle et billigt mellemled mellem kapillarelektroforesen og massespektrometret, som koster under tusind kroner. Interfacet fungerer som en forstøver og er udformet således, at den forstøvede sky kan sprayeres direkte ind i det varme plasma.



Eksempler på anvendelser af CE-ICP-MS ved bioanalyse. Øverst, et elektroferogram fra en analyse for selen i human urin, der viser, at prøven indeholder 4 forskellige selenforbindelser. Den totale koncentration af selen i prøven er ca. 30 ng/mL. Nederst, et elektroferogram fra en analyse for brom i human urin fra en person, der har indtaget hostemidlet bromhexin. Analysen viser, at størstedelen af hostemidlet er blevet omdannet til en række forskellige bromholdige omdannelsesprodukter.

Figuren illustrerer princippet for CE-ICP-MS koblingen. Den elektriske forbindelse til udgangen af kapillaret er opnået gennem en elektrolytopløsning, der strømmer langs udgangsenden af kapillaret. Forbindelser, der forlader udgangsenden af kapillaret under separationen, føres med den strømmende elektrolytopløsning og forstøves ved hjælp af argon direkte ind i plasmaet.



Den elektriske kontakt til udgangsenden af kapillaret er opnået gennem et pålagt nikkellag, der samtidigt fungerer som elektrisk pol ved elektro-sprayionisationen. Forbindelser, der under separationen forlader kapillarets udgangsende, forstøves ved hjælp af et elektrisk felt til en sky af ladede areosoler. På vej mod massespektrometret omdannes areosolerne til en sky af molekyllære ioner.

En analyse for selen i human urin viser, hvad den kombinerede målemetode kan præstere. Her er det lykkedes at påvise fire forskellige selenforbindelser, som findes i koncentrationer på få nanogram pr. ml urin.

Vi har også analyseret urinprøver fra en person, som har indtaget hostemidlet bromhexin. Kun en lille fraktion af lægemidlet udskilles uomdannet. Størstedelen af lægemidlet er blevet omdannet til en række stofskifteprodukter, hvoraf i alt otte forskellige kan detekteres. Kun stoffer indeholdende brom bliver detekteret her.

Billigt og effektivt

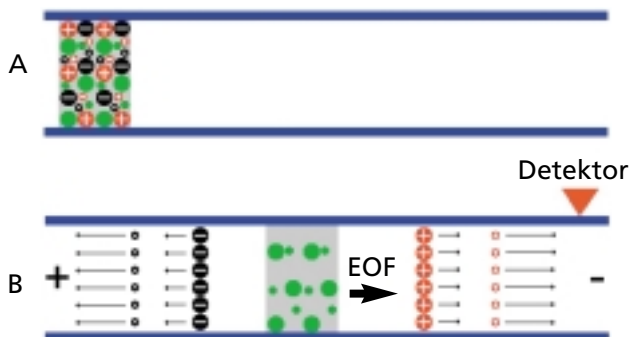
Massespektrometri er som nævnt en teknik, hvor ioner kan blive sorteret efter forholdet mellem deres masse og ladning. Der findes flere forskellige metoder til ionisation af prøven i massespektrometri.

Vi har også koblet kapillarelektroforese med elektro-sprayionisation-massespektrometri. Her forstøves prøven ved hjælp af et elektrisk felt til en spray af ladede aerosoler, dvs. partikler på dråbeform. På vej ind i massespektrometret fordampes

opløsningsmidlet fra partiklerne, og ladningen overgår til de efterladte forbindelser.

Da forbindelsernes kemiske struktur bevares ved denne ionisationsform, er det muligt at opnå information om et stofs molekylvægt og formodede struktur, samtidig med at det er en følsom målemetode.

Igen er det af stor vigtighed, at mest muligt af prøven fra kapillarelektroforesen bliver ført ind i massespektrometret. Da massespektrometret fungerer bedst med små væskemængder, går kunststykket ud på, at få dannet en meget fin forstøvning af prøven direkte fra analysekapillaret til massespektrometret. Dette er tidligere gjort muligt ved hjælp af de såkaldte nano-spray-interfaces, som er kommercielt tilgængelige, og som koster omkring 100.000 kr. Her er det lykkedes for os at fremstille et interface til under tusind kroner. Den elektrisk ladede spray udgår fra selve kapillaret, der er pålagt et elektrisk ledende lag af nikkel. Ved hjælp af justeringsskruer kan det nikkelbelagte kapillar placeres således, at størstedelen af sprayeren rettes direkte mod indgangen til massespektrometret. Ved at benytte begge typer af koblede teknikker ved bioanalyse af et stof som hostemidlet bromhexin, der indeholder to bromatomer pr. molekyle, kan vi få oplysninger om, hvilke omdannelsesprodukter i urinen, der indeholder brom, og hvor meget der er af de enkelte produkter. Endvidere får vi oplysning om stoffernes molekylvægt, hvorefter en foreløbig kemisk struktur kan optegnes.



Skematisk illustration af separationsprincippet i kapillarelektroforese. A: En prøve bestående af anioniske •, kationiske • og neutrale forbindelser • indføres i kapillaret. B: Kapillaret pålægges en elektrisk spænding, og de ladede forbindelser vil nu vandre med forskellig hastighed og retning. En overordnet væskestrømning i kapillaret, benævnt det elektroosmotiske flow (EOF), sikrer, at alle forbindelserne føres imod detektoren.

Kraftfuldt værktøj

En intensiv forskning i og udvikling af nye højfølsomme og selektive analyseteknikker er vigtig i forbindelse med fortsatte bioteknologiske landvindinger.

Specielt er sammenkoblingen af meget effektive separations teknikker med følsomme detektionsprincipper et kraftfuldt værktøj ved analyse af meget komplekst sammensatte prøver. Ved yderligere at kombinere data fra sammenkobling af kapillarelektroforese med de to forskellige former for massespektrometri, kan vi på få dage opnå resultater, som det tidligere ville tage uger eller måneder at opnå. Da der samtidig er tale om en mikrometode kan prøver i nanoliter-størrelsen analyseres.



Cand.scient. Lars Bendahl er ph.d.-studerende ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Ph.d. Bente Gammelgaard er lektor ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Lic.pharm. Ole Jøns er lektor ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Dr.scient. Ole Farver er professor ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



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

Farmaceutisk omsorg på apotekerne

Farmaceutisk omsorg handler om at sikre, at patienterne får de rigtige lægemidler i de rigtige doseringer samt god besked om, hvordan medicinen skal anvendes og hvorfor. På danske apoteker har farmaceuterne dårlig tid til opgaven. En vej til at forbedre situationen er, at apotekerne får mulighed for at tjene penge på farmaceutisk omsorg.

Af Charlotte Rossing, Ebba Holme Hansen
og Janine Marie Morgall

Målet med farmaceutisk omsorg er at sikre, at enhver medicinsk behandling er rettet mod at opnå resultater, som forbedrer patientens livskvalitet. Konceptet blev udviklet i USA i slutningen af 1980'erne, og ideen var, at farmaceuter i samarbejde med læger og sygeplejersker kunne reducere og forebygge lægemiddelrelaterede problemer på hospitalerne.

Der er god grund til at gøre en indsats. I USA - og sandsynligvis også i Danmark og Europa - oplever en ud af halvtreds hospi-

talspatienter problemer med lægemidler - f.eks. forkert medicin, forkert dosering, bivirkninger eller manglende behandling. Ideen om at trække på farmaceuters faglige kompetence til at afhjælpe problemerne blev godt modtaget af farmaceuter og deres faglige organisationer i mange lande. Farmaceutisk omsorg er efterfølgende blevet overført fra hospitaler til apoteker i primærsektorer.

Farmaceutisk omsorg er en professionsstrategi, som søger at opfange og forebygge problemer i forbindelse med anvendelse af lægemidler. I arbejdet tænker farmaceuten helhedsorienteret på patienten og dennes anvendelse af medicin. Farmaceutisk omsorg indgår i Danmarks Apotekerforenings kvalitetssikringsprogram som en metode til at sikre lægemiddelbehandlingen blandt patienterne. Dette kan ske ved: "at identificere, løse og forebygge lægemiddelrelaterede problemer samt at overvåge og dokumentere resultaterne af behandlingen". Information til patienterne om problemer ved brug af lægemidler er et væsentligt aspekt af farmaceutisk omsorg.

Problemer med lægemidler

I USA udgav "Committee on Quality of Health Care in America" i 2000 rapporten "Det er menneskeligt at fejle", som vakte stor opsigt, også i Danmark, med sin dokumentation af de problemer, som findes ved anvendelsen af lægemidler. I rapporten skønner komiteen, at to procent af alle hospitalsindlagte patienter i USA oplever et lægemiddelrelateret problem, som kunne have været undgået. At det ikke sker, resulterer i en årlig merudgift på 2 milliarder dollar til behandling af de gener, patienterne må døje med. Komiteen vurderer endvidere, at der dør 7000 mennesker om året i USA på grund af fejlmedicinering.

Der findes ingen nyere opgørelse over omfanget af lægemiddelrelaterede problemer i Danmark. En undersøgelse lavet i 1996 på svenske apoteker viste, at der var problemer med lægemidler hos 2,5 procent af patienterne. Problemerne vedrørte især receptpligtig medicin. De oftest rapporterede vanskeligheder var patientens usikkerhed om formålet med at tage lægemidlet, problemer med doseringen, praktiske problemer og receptfejl.

I vinteren 1999/2000 gennemførte vi en spørgeskemaundersøgelse om farmaceutisk omsorg på Danmarks 288 apoteker, hvor spørgsmålene blev besvaret af den farmaceut, som var ansvarlig for farmaceutisk omsorg eller information på apoteket. Svarprocenten var 75,7 procent.

De resultater, vi fremlægger i denne artikel, er relateret til

Konsultation ved skranken. Farmaceuter har en god faglig baggrund for at tale med patienterne om deres brug af medicin og for derigennem at identificere, løse og forebygge lægemiddelrelaterede problemer. Men i praksis kniber det med at få tid til farmaceutisk omsorg på danske apoteker.



PROBLEMER I FORBINDELSE MED ANVENDELSE AF LÆGEMIDLER

Ubehandlet indikation	<i>Patienten har et medicinsk problem, som burde behandles med lægemidler</i>
Uhensigtsmæssig præparatvalg	<i>Patienten har en behandlingskrævende tilstand, men det anvendte præparat er ikke det optimale</i>
For lav dosering	<i>Patienten får det rigtige lægemiddel, men i for lav dosis til at det har den ønskede virkning</i>
Uhensigtsmæssig anvendelse	<i>Patienten får det rigtige lægemiddel, men anvender det ikke hensigtsmæssigt på grund af tekniske, fysiske, psykiske, sociale eller økonomiske årsager</i>
Overdosering	<i>Patienten får det rigtige lægemiddel, men i for høj dosis til at det har den ønskede virkning</i>
Bivirkninger	<i>Patienten oplever bivirkninger</i>
Interaktioner	<i>Patienten har et medicinsk problem, som skyldes, at lægemidlet reagerer uheldigt med andre lægemidler eller med levnedsmidler</i>
Medicinering uden grund	<i>Patienten anvender medicin, selv om der ikke er behov for det</i>

besvarelsen af to spørgsmål: Hvordan prioriterer farmaceuterne information om lægemiddelrelaterede problemer? Og hvilke forhindringer for farmaceutisk omsorg oplever farmaceuterne på apotekerne?

Information på apoteker

Farmaceuterne prioriterede emner af en teknisk karakter højest, og mere end to tredjedele vurderede, at "information om den tekniske brug af lægemidler" er vigtig. Emnerne var: Hvordan lægemidlet skal indtages, hvilken dosis der skal indtages, hvor lang tid lægemidlet skal bruges, og hvordan det skal opbevares.

"Information relateret til lægemidlers kliniske virkninger" blev vurderet som betydningsfuld af færre farmaceuter. Et af emnerne var behovet for at informere om, hvordan lægemidler, som indtages samtidig, kan skabe problemer for patienten. Halvdelen af farmaceuterne vurderede, at dette er vigtig information. En tredjedel mente, at "information om lægemidlers bivirkninger" er vigtig.

Inden for området "information om formålet med at tage lægemidlet" var emnerne: Hvordan virker lægemidlet, og hvad er formålet med at tage medicinen? Omkring halvdelen af farmaceuterne mente, at det var vigtigt at give denne form for information til patienterne. Sådanne oplysninger kan kaldes motiverende information, og det er den type information, som prioriteres højt inden for farmaceutisk omsorg.

Forhindringer på apotekerne

Tidligere undersøgelser i bl.a. USA og Irland har vist, at det kan være svært at indføre farmaceutisk omsorg i det daglige arbejde på apotekerne. I denne undersøgelse blev følgende forhindringer for farmaceutisk omsorg oplevet af mindst en tredjedel af farmaceuterne:

Den oftest oplevede interne forhindring var manglende mulighed for at forlade de daglige arbejdsrutiner for at arbejde med farmaceutisk omsorg, hvilket var et problem for 65 procent af de adspurgte. 40-46 procent svarede, at manglende arbejdskraft var en forhindring. 37 procent anførte, at

manglende lyst fra ledelsen var en forhindring for implementeringen af farmaceutisk omsorg. Endelig mente 35 procent af farmaceuterne, at manglende driftsmidler var et problem. Dette kan tolkes som en lav prioritering af ressourcer til at indarbejde farmaceutisk omsorg på danske apoteker.

Den vigtigste eksterne forhindring var manglende samarbejde med læger, hvilket blev nævnt af 35 procent af farmaceuterne. Andre forhindringer var manglende samarbejde med patientforeninger og manglende samarbejde med andet sundhedspersonale.

Lang vej igen

Når farmaceuterne på de danske apoteker primært prioriterer teknisk information om lægemiddelrelaterede problemer, kan det hænge sammen med opbygningen af farmaceutstudiet, der primært er fokuseret på tekniske fag. En sådan fagsammensætning fremmer ikke nødvendigvis en helhedsorienteret opfattelse af patient og lægemiddel-anvendelse.

Den vigtigste eksterne forhindring for farmaceutisk omsorg - manglende samarbejde med lægerne - og de interne forhindringer vedrørende manglende prioritering og manglende ressourcer bør afhjælpes for at fremme arbejdet med farmaceutisk omsorg. Dette er afhængig af ledelsen på det enkelte apotek. Et større engagement fra ledelsens side kan måske medvirke til at reducere de oplevede forhindringer.

Derimod kan det være vanskeligt for den enkelte apoteker at finde øgede driftsmidler til farmaceutisk omsorg. At tage betaling for sådanne sundhedsydelser kan være en løsning på dette problem. Danmarks Apotekerforening arbejder nu med modeller for "prisbærende sundhedsydelser", hvor apotekerne netop kan tjene penge på at udøve farmaceutisk omsorg.

Konklusionen er, at der stadig mangler et stykke vej, før farmaceutisk omsorg bliver en del af hverdagen på danske apoteker. Hvis apotekerne ønsker at implementere farmaceutisk omsorg, peger denne undersøgelse på nogle områder, hvor man kan sætte ind.



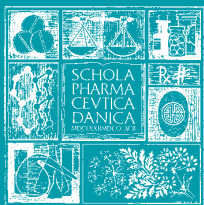
Cand.pharm. Charlotte Rossing er ph.d.-studerende ved Institut for Samfundsfarmaci.



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



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



Lægemiddelforskning

udgives af Danmarks Farmaceutiske Højskole

Redaktion:

Mette Rasmussen (ansvarshavende),
Jesper Munck og Rolf Haugaard

Grafisk design og produktion:

ProGrafica as

Fotos:

Jesper Munck,
Anne Sørensen, Image State (s. 2),
Isabelle Rozenbaum/PhotoAlto (s. 7)
og Polfoto (s. 8)

ISSN 1601-8850 (online)

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