

Lægemiddelforskning

2004



THE DANISH
DANMARKS
UNIVERSITY OF
FARMACEUTISKE
PHARMACEUTICAL
UNIVERSITET
SCIENCES





Forskning ved DFU

Denmarks Farmaceutiske Universitet har som det eneste universitet i Danmark lægemidlet i centrum for forskning og uddannelse. De forskning inden for lægemiddelområdet af natur er interdisciplinære det nødvendigt at kombinere flere fagdiscipliner for at få en dybtgående forståelse for nyheder inden for lægemiddelområdet og herunder forhold vedrørende optimal brug af lægemidler. DFU's forskning og uddannelse befinder sig derfor i den spændende grænseflade mellem naturvidenskab, sundhedsvidenskab og teknik - med inddragelse af samfundsvidenskabelige og humanistiske discipliner.

Det er vores håb at nærværende udgave af Lægemiddelforskning i populærvidenskabelig form illustrerer flerfagligheden på DFU og samtidig giver en bredere kreds af læsere et indblik i en række af de spændende og udfordrende forskningsprojekter der udspringer fra DFU.

Sven Frøkjær

Sven Frøkjær rektor

På www.dfuni.dk optræder - i forbindelse med DFU's fem institutter - en gennemgang af Universitetets forskningsområder.

På www.dfuni.dk/gymnasier findes oplysninger om mulighederne for at besøge DFU med kemi- og biologiklasser.

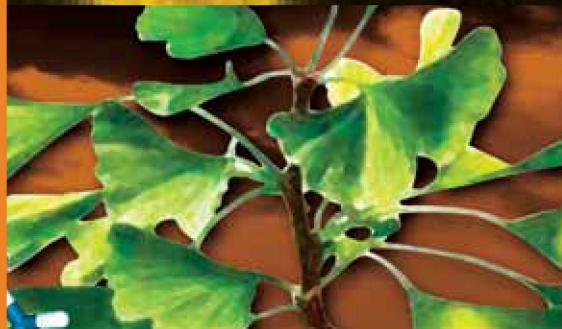
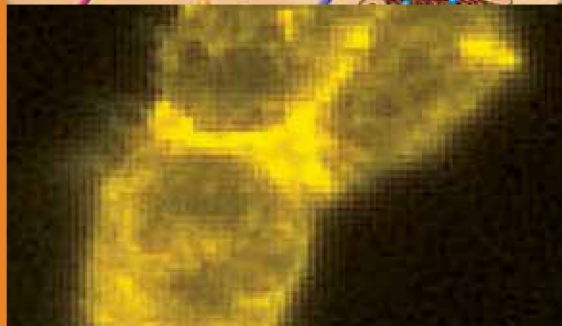
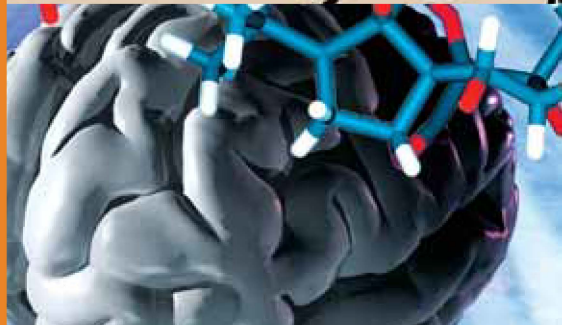
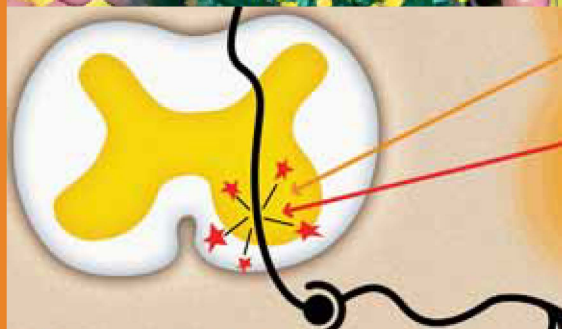
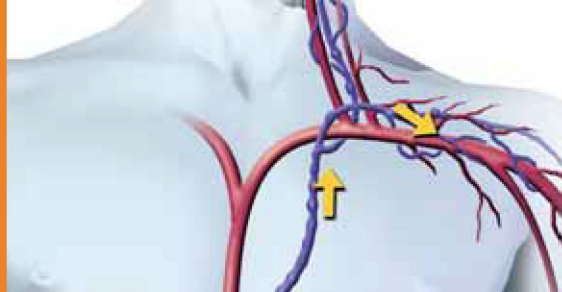
På www.dfuni.dk/farmaceut er der information om farmaceutuddannelsen og dens mange erhvervsmuligheder.

På www.dfuni.dk/publikationer kan man hente inspiration i de tidligere årgange af Lægemiddelforskning.

Ønskes yderligere trykte eksemplarer af Lægemiddelforskning? send din bestilling til bestil@dfuni.dk

Indhold

1. Livsstilsmedicin: Hvad er det?	4-5
Af Claus Møldrup	
2. Nyt middel mod fedme?	6-7
Af Gitte Petersen, Mie Julin Nielsen, Arne Astrup og Harald S. Hansen.	
3. Hostemiddel lindrer smerter	8-9
Af Tina Hoff Duedahl og Janne Rømsing	
4. Antistoffer til behandling af multipel sklerose	10-11
Af Liselotte Brix Jensen, Michelle Krogsgaard, Lars Fugger og Jan Engberg	
5. Når filmens fiktion bliver virkelighed	12-13
Af Dan Stærk, Maja Lambert, Majid Sairafianpour, Cailean Clarkson og Jerzy W. Jaroszewski	
6. Jagten på tempeltræets hemmelighed	14-15
Af Kristian Strømgaard	
7. Ny bioisoster kan skabe nye lægemidler	16-17
Af Jesper Kristensen og Rasmus Prætorius Clausen	
8. siRNA – fremtidens lægemidler?	18-19
Af Camilla Foged, Sven Frøkjær og Hanne Mørck Nielsen	
9. Kan peptider hjælpe lægemiddelstoffer ind i cellen?	20-21
Af Hanne Mørck Nielsen og Camilla Foged	
10. Nye metoder til studier af lægemiddelfordeling	22-23
Af Henrik Jensen, Anne E. Thomsen og Jesper Østergaard	
11. Erstatning af radioaktivitetsmåling i lægemiddeludvikling	24-25
Af Berit Packert Jensen, Bente Gammelgaard, Steen Honoré Hansen og Jan Vanggaard Andersen	
12. Computeren kan forudsige lægemidlers omdannelse	26-27
Af Lars Olsen, Rikke Bergmann og Flemming Steen Jørgensen	
13. Lymfesystemet kan transportere tungopløselige lægemiddelstoffer	28-29
Af Ditte Maria Karpf, Jette Jacobsen, René Holm og Anette Müllertz	
14. Cellulært stressrespons - nøglen til celledskader i hjernesygdomme?	30-31
Af Aase Frandsen	
15. En ny receptor i mennesket	32-33
Af Petrine Wellendorph, Anders Balsgaard, Kasper Bø Hansen og Hans Bräuner-Osborne	
16. Uudnyttet potentiale i den mikrobielle jungle?	34-35
Af Anders Fuglsang	
17. Blandingers toksikologi	36-37
Af Franziska K. Birkved, Anne Munch Christensen, Flemming Ingerslev og Bent Halling-Sørensen	
18. Medicinsk teknologivurdering af dosispakket medicin	38-39
Af Lotte Stig Haugbølle, Birthe Søndergaard og Anne Lee	



Livsstilsmedicin - Hvad er det?

Begrebet »livsstilsmedicin« er blevet en del af vores ordforråd. Men livsstilsmedicin eksisterer ikke i sig selv. Det afgørende er den konkrete anvendelse, fordi de samme lægemidler kan bruges både til at behandle syge og til at forbedre livskvaliteten hos raske. Et eksempel er medicin, som styrker potensen.

Af Claus Mødrup

Begrebet »livsstilsmedicin« optræder oftere og oftere i mediernes dækning af lægemiddelområdet. Men ganske få ved rent faktisk, hvad termen dækker over. Derfor har vi gennemført en videnskabelig analyse af begrebets anvendelse i såvel videnskabelig litteratur som i artikler fra populære medier. Analysen viser et broget billede af mulige definitioner, men i langt de fleste tilfælde er begrebet slet ikke defineret.

I perioden 1978–2003 figurerede ordet livsstilsmedicin 3174 gange i engelsksprogede medier verden over; de 2600 gange var i perioden 1998–2003.

Undersøgelsen viser, at forfatterne har forsøgt sig med ikke mindre end 23 forskellige forklaringer på livsstilsmedicin, men det mest almindelige er, at der ingen definition er overhovedet. At mange bruger ordet uden at vide, hvad det egentlig dækker over, endsize forsøger at forklare det, er naturligvis problematisk set fra et videnskabeligt synspunkt. Men hvad værre er, så kan anvendelsen af begrebet livsstilsmedicin uden omtanke være direkte diskriminerende for patienter.

Risiko for diskrimination

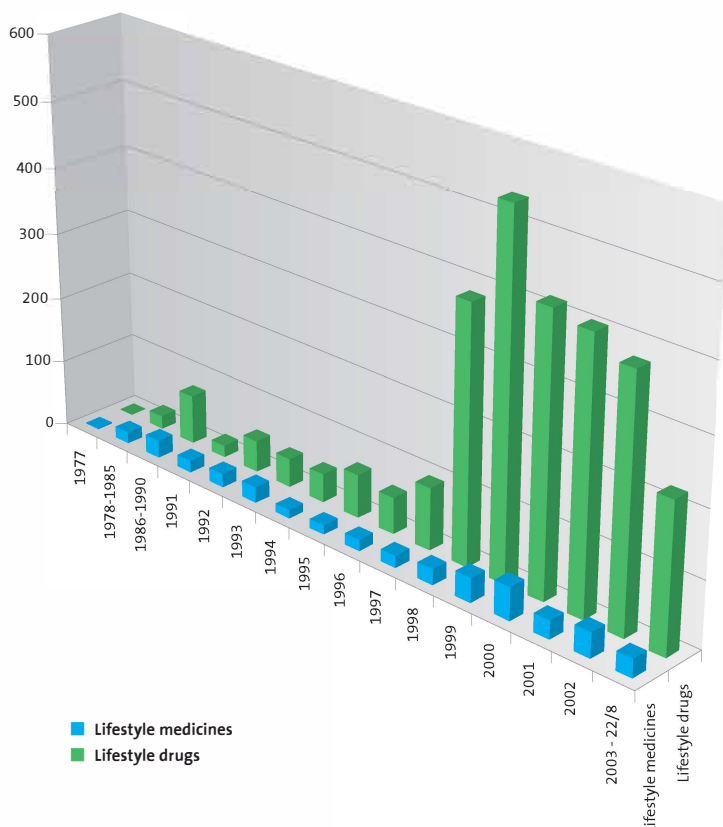
En måde at betragte livsstilsmedicin på i følge litteraturen er ved at dele ordet op i livsstil og medicin. På den måde bliver livsstilsmedicin til al medicin, der anvendes mod lidelser, som er afledt af en persons livsstil. Umiddelbart lyder det jo meget fornuftigt, hvilket nok også er årsagen til, at mange har været forfaldne til at anvende denne definition. Men ved nærmere eftertanke er definitionen ikke så god endda.

Mængden af lidelser, der er en konsekvens af vores livsstil, er jo ganske omfattende. For eksempel vil livsstilsmedicin så også inkludere kemoterapi til behandling af lungekræft som følge af rygning. Eller forebyggende malariabehandling som led i en livsstil der inkluderer en forestående rejse til Afrika. Med andre ord: Hvis man anvender denne definition, vil en meget stor del af de lægemidler, der i dag er på markedet, kunne betragtes som livsstilsmedicin, og så har begrebet jo ingen forklarende værdi.

En anden måde at betragte livsstilsmedicin på er at udråbe specifikke lægemidler som værende livsstilsmedicin. Det er oftest sådan, at de populære medier bruger begrebet. Det bedst kendte eksempel er behandling af impotens, hvor de anvendte lægemidler uden tøven udråbes som livsstilsmedicin. Det er ved denne generalisering, det går galt, og det er igennem generaliseringen, at man risikerer at diskriminere personer, som er rent faktisk er syge. Det følgende eksempel vil vise, hvorfor man er nødsaget til at forholde sig til den individuelle behandlingssituation, før man kan udråbe et lægemiddel som livsstilsmedicin:

”Hr. Jensen og Hr. Hansen er begge 50 år. De går begge to til lægen. Jensen har haft diabetes, siden han var teenager, og er nu begyndt at mærke forskellige symptomer, som er afledt af hans mangeårige sygdom; et af dem er problemer med potensen. Jensen opfatter selv potensproblemet som en sygdom. Hansen derimod er frisk og rask. Han har været så heldig at møde en dejlig kvinde, som er femten år yngre. Som en naturlig følge af Hansens alder er den seksuelle aktivitet ikke helt som i dengang ungdom. Men en ung kone stiller sine krav, og dem vil Hansen gerne kunne leve op til. Hansen betragter sig ikke som syg, han er blot ved at komme op i årene.”

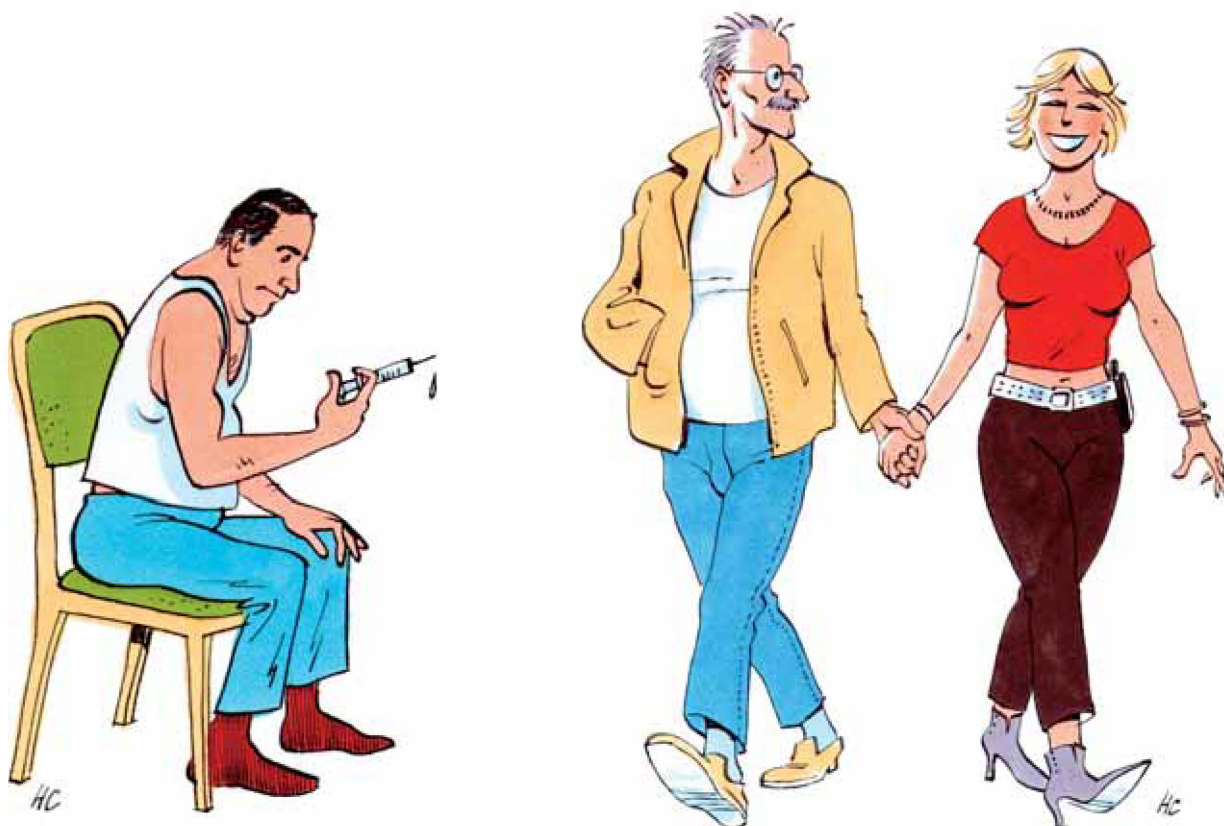
Medicinske produkter mod impotens kan hjælpe både Jensen og Hansen. Ved generelt at udråbe alle medicinske produkter mod



Anvendelsen af ordet livsstilsmedicin i engelsktalende medier gennem de seneste 25 år.



Ph.d. Claus Møldrup er
lektor ved Institut for
Samfundsfarmaci



Hr. Jensen har sukkersyge, og med alderen har han fået problemer med at få rejssning. Hr. Hansen har fået sig en dejlig ung kone, som han gerne vil elske med, lige så tit hun har lyst. For Jensen er medicin mod impotens en sygdomsbehandling. For Hansen er det samme lægemiddel en livsstilsmedicin, som han bruger til at optimere sit liv.

impotens som livsstilsmedicin, vil man automatisk diskriminere Jensen, som jo faktisk er syg.

Endnu værre bliver det, hvis sundhedsmyndigheder og forsikringsselskaber begynder at prioritere med udgangspunkt i den generelle definition. En mulig konsekvens kunne være, at man besluttende, at der ikke skulle ydes tilskud til livsstilsmedicin. I Jensens tilfælde ville dette med rette kunne opfattes som diskrimination af hans diabetes. Omvendt opfatter Hansen sig ikke som syg, han ønsker blot at optimere sin livsførelse ved anvendelse af et lægemiddel. I denne situation kan man så med rette tale om, at Hansen anvender livsstilsmedicin.

Det illustrerer, hvorfor man nødt til at inddrage behandlings-situationen i definitionen af begrebet livsstilsmedicin. For livsstilsmedicin findes pr. definition ikke, det er selve anvendelsen, der kan gøre et lægemiddel til livsstilsmedicin.

Respekt for patienter

Skal man anvende et begreb som livsstilsmedicin, enten i dagligdagen, som led i populær eller videnskabelig formidling, eller i relation til sundhedspolitiske beslutninger og prioriteringer, har man en forpligtelse til at træde varsomt i respekt for de patienter, som faktisk er syge, og som opfatter deres medicinske behandling som værende en nødvendighed og ikke som livsstilsmedicin.

Hvis man fremover anvender begrebet livsstilsmedicin, vil følgende definition således kunne være en hjælp:

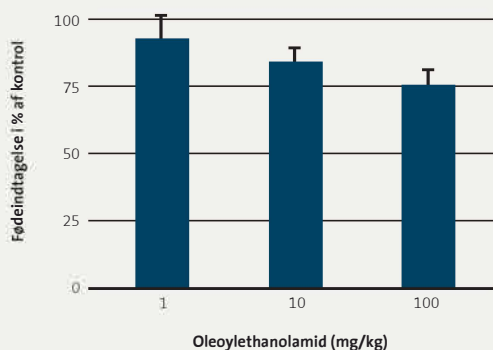
»Livsstilsmedicin er lægemidler, der udover at kunne lindre, helbrede og forebygge kan anvendes til at forbedre tilstande, som ikke betragtes som sygelige. Et sådant lægemiddel bliver først til livsstilsmedicin, hvis individet, der indtager lægemidlet, ikke betragter sig selv som syg, men blot anvender lægemidlet som led i en livsstil.«

METODE OG KILDEmateriale

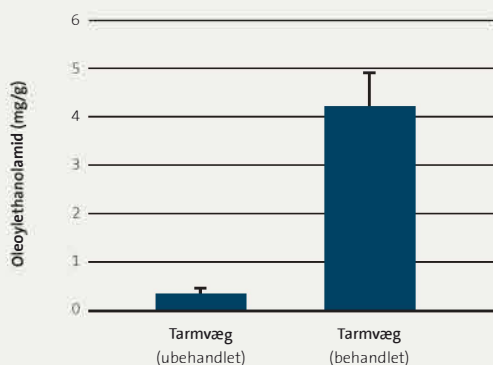
Anvendelsesgraden af ordet livsstilsmedicin (lifestyle medicine/drug) blev belyst ved søgning i databasen Lexis-Nexis. Lexis-Nexis er - som navnet antyder - en database, der indeholder både juridisk materiale og nyhedsdokumenter, og som på disse områder er verdens førende informationssystem med stof fra over 29.000 engelsksprogede kilder fra hele verden; fortrinsvis fra engelsksprogede lande.

Databasen giver mulighed for at søge i mere end 2,9 milliarder dokumenter fra internationale, regionale og lokale aviser, telegrambureauer, juridiske tidsskrifter, retskilder, lovsamlinger, markedsrapporter, nyhedsbreve, firma- og finansoplysninger mm. Mange af aviserne og tidsskrifterne går tilbage til 70'erne og 80'erne, de fleste er dog først tilgængelige fra 90'erne og frem. I studiet blev filtret "verdensnyheder" anvendt, hvilket inkluderer 1.800 aviser, magasiner og TV-/radioprogrammer.

Nyt middel mod fedme?



- 1) Effekten af oralt indtaget oleylethanolamid på fødeindtagelsen hos rotter, som har fastet i 24 timer før behandling. En halv time efter behandling med oleylethanolamid fik rotterne fri adgang til føde i 90 minutter. Jo større dosis, rotterne fik, jo mindre åd de.



- 2) Figuren viser mængden af oleylethanolamid i rotters tarmvæg, henholdsvis det naturlige indhold i ubehandlede rotter (data fra amerikansk artikel) og i behandlede rotter, som har fået 10 mg oleylethanolamid/kg under samme omstændigheder som i figur 1. På det tidspunkt, hvor behandlede rotter indtog mindre føde end kontrolgruppen, var mængden af ikke-nedbrudt, aktivt oleylethanolamid i tarmvæggen 11 gange højere end hos de ubehandlede rotter.

Hvis oleylethanolamid har samme effekt på mennesker som på rotter, har vi fundet et stof, som efter oral indtagelse virker lokalt i tarmen og sandsynligvis er ganske ufarligt for kroppen – et sikkert lægemiddel mod fedme.

Af Gitte Petersen, Mie Julin Nielsen, Arne Astrup og Harald S. Hansen.

Fedme er en stadig mere udbredt folkesygdom i næsten alle vestlige lande, og det er vanskeligt at tabe sig, hvis man først er blevet svært overvægtig. Ganske vist lykkes det ofte at smide nogle kilo ved at gå på diæt, men oftest tager man hurtigt det samme på igen. Derfor er der et stigende behov for medicinsk behandling af denne livsstilsrelaterede sygdom.

Lægemidler til behandling af fedme kan supplere diæter og fremkalde vægttab på flere forskellige måder. I øjeblikket er der tre receptpligtige lægemidler på markedet i Danmark. Det ene er Xenical, som nedsætter optagelsen i blodet af en del af de indtagne fedtstoffer. De to andre lægemidler, Reductil og Regenon, hæmmer appetitten ved at påvirke signaler for mæthed og sult direkte i hjernen, og samtidig øger de kroppens energiforbrug til varme.

Alle tre lægemidler kan have bivirkninger. Xenical kan give diarre og luft i maven, mens Reductil og Regenon blandt andet kan medføre søvnforstyrrelser og forhøjet blodtryk. Drømmen om det perfekte slankemiddel ser noget anderledes ud: Et naturligt forekommende stof, som kan indtages i tabletform, som nedsætter appetitten via en effekt direkte i tarmene, og som ikke medfører bivirkninger andre steder i kroppen.

OLEOYLETHANOLAMID

Oleylethanolamid er et naturligt forekommende stof, som findes i en bred vifte af både planter og dyr. Den store udbredelse af stoffet vidner om evolutionær konservering, som tyder på, at oleylethanolamid har en vigtig funktion for mange forskellige organismers overlevelse. Majs er en af de planter, hvori der er målt et relativt stort indhold af oleylethanolamid. Hvis et menneske skulle indtage oleylethanolamid i et omfang, der svarer til den mængde, der hæmmer fødeindtagelsen hos rotter, skulle en person på 70 kilo spise omkring to tons majs om dagen. En ren form af dette naturligt forekommende fedtstof er derfor allerede fremstillet og givet til forsøgsdyr i kapsler.

Nedsat sultfølelse

Måske er vi på sporet af mirakelkuren med oleylethanolamid, et stof, som kroppen selv producerer. Når stoffet injiceres i bughulen



på rotter, som har fastet i et døgn, og som dernæst får fri adgang til foder i halvanden time, så spiser de mindre end ubehandlede rotter, der også har fastet.

Effekten skyldes, at oleoylethanolamid påvirker en såkaldt transkriptionsfaktor, PPAR α , som sandsynligvis er forbundet med eller lokaliseret tæt på tarmvæggenes sensoriske fibre. Fibrene har forbindelse til hjernens sultcenter, og når de stimuleres af oleoylethanolamid via PPAR α , sender fibrene besked til hjernen om nedsat sultfølelse.

Med opdagelsen af oleoylethanolamids virkning på rotters foderindtag, står vi muligvis over for et vigtigt element i den videre forståelse af kroppens komplekse appetitreguleringssystem, men også over for en mulig kandidat til et lægemiddel mod fedme.

I første omgang var der dog en åbenbar begrænsning af stofets fremtidsmuligheder. Oleoylethanolamid skulle injicerer. Her er der næppe tvivl om, at den store gruppe af overvægtige, som ønsker lettilgængelige midler til at opnå vægttab, absolut vil foretrække tabletter eller kapsler.

Oral indtagelse

Ingen forventede på det tidspunkt, at oleoylethanolamid ville virke, hvis det blev indgivet gennem munden, da man regnede med, at stoffet ville blive nedbrudt i tarmene. I tarmslimhinden findes der nemlig store mængder af et enzym, FAAH, som nedbryder stoffet. Men alligevel afprøvede vi trods alle odds, om stoffet efter oral indtagelse kunne nedsætte fødeindtagelsen hos rotter, der havde fastet i 24 timer.

Resultatet var overraskende. Efter halvanden times fri adgang til foder fandt vi, at der var en signifikant nedsættelse af fødeindtagelsen på over 15 procent hos de rotter, der havde fået 10 milligram oleoylethanolamid pr. kilo kropsvægt, set i forhold til ubehandlede rotter. De rotter, der fik en større dosis på 100 milligram oleoylethanolamid pr. kilo kropsvægt, åd 24 procent mindre end kontrolgruppen.

Effekt i tarmvæggen

Herefter undersøgte vi, hvor stor en del af den indtagne mængde oleoylethanolamid, der nåede frem til tarmvæggen uden at blive

nedbrudt af FAAH. Til dette forsøg syntetiserede vi en radioaktiv udgave af stoffet, så vi ved måling kunne skelne det indgivne stof fra det oleoylethanolamid, som rotterne selv producerer. Indholdet af radioaktivt oleoylethanolamid efter oral indtagelse af 10 milligram pr. kilo kropsvægt blev undersøgt i tre prøver: I mavesækkens indhold, i tarmenes indhold af ufordøjet føde, samt i tarmvæggen hos rotter.

To timer efter oral administration af oleoylethanolamid, heraf de sidste halvanden time med fri adgang til føde, var der stadig 14 procent af den samlede mængde oleoylethanolamid tilbage i mavesækken. 0,2 procent af stofet fandtes i tarmindeholdet, og 0,5 procent befandt sig i tarmvæggen. De 0,5 procent svarer til 11 gange den naturlige koncentration af oleoylethanolamid i tarmen. Det er derfor sandsynligt, at selv om kun 0,5 procent af den indtagne dosis når frem til tarmvæggen, er det nok til at nedsætte fødeindtagelsen.

For at sikre, at den hæmmende effekt på fødeindtagelsen ikke kunne tilskrives nedbrydningsprodukterne af oleoylethanolamid, oliesyre og ethanolamin, blev der udført separate forsøg, hvor enten oliesyre eller ethanolamin blev indgivet oralt til rotterne. Det gav ingen effekt. Rotterne åd lige så meget efter 24 timers faste som de ubehandlede kontrol dyr.

FOR SENT TIL PATENT

DFU og KVL har søgt om patent på opdagelsen af oleoylethanolamid som oralt virkende slankemiddel. Dette blev dog gjort værdiløst, fordi en forskningsgruppe i Californien et halvt år tidligere havde indsendt en patentansøgning, som patenteksperter vurderede også dækkede oral indtagelse trods ansøgningens manglende dokumentation herfor.

Næppe væsentlige bivirkninger

Et andet studie blev kort tid efter publiceret af en anden forskningsgruppe, og det bekræftede vores data for oral administration. Derudover dokumenterede studiet, at oleoylethanolamid efter lang tids daglig indtagelse ikke blev ophobet i hverken musklerne eller i hjernen hos rotterne. Det er et meget centralt kriterium for at kunne bibeholde en lav risiko for bivirkninger. Fra et farmakologisk synspunkt, er nedbrydningen af oleoylethanolamid til oliesyre og ethanolamin også positiv, fordi begge stoffer findes i store mængder i kroppen i forvejen. Derfor forventes nedbrydningsprodukterne heller ikke at kunne forårsage nævneværdige bivirkninger.

Hvis oleoylethanolamid harsammeeffekt på mennesker som på rotter, har vi fundet et stof som efter oral indtagelse virker lokalt i tarmen og sandsynligvis er ganske ufarligt for kroppen – et sikkert lægemiddel mod fedme. Næste skridt vil være at afprøve oleoylethanolamid på mennesker.



Ph.d. Gitte Petersen er adjunkt ved Institut for Farmakologi.



Mie Julin Nielsen er netop færdiguddannet cand.scient. fra Institut for Human Ernæring, KVL.



Dr.med. Arne Astrup er professor og institutleder ved Institut for Human Ernæring, KVL.



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

Hostemiddel lindrer smerter

I mange år har morfin været det foretrukne stof til behandling af operationssmerter, men desværre medfører behandlingen en del bivirkninger. Et hostemiddel kan måske supplere morfin ved smertebehandling efter operationer, så man kan bruge mindre doser morfin og dermed minimere bivirkningerne.

Af Tina Hoff Duedahl og Janne Rømsing

Smerterefter en operation er næsten uundgåelige og ofte meget ubehagelige for patienten. For at forhindre eller lindre ubehaget ved smerterne er det nødvendigt med en nøje tilpasset smertebehandling både før, under og efter operationen.

Behandlingen gives ikke blot af hensyn til patientens velbefindende, men også for at mindske risikoen for senere udvikling af kroniske smerter. Når patienten smertedækkes tilfredsstillende, fremmes normaliseringen af vigtige funktioner som åndedræt, fordøjelse og mobilitet, hvilket betyder kortere indlæggelsestid og dermed også betydelige samfundsmæssige besparelser.

Der bruges forskellige typer af smertestillende lægemidler til at lindre smerterne efter en operation. I mange år har morfin været det foretrukne stof til behandling af middelstærke til stærke smerter. Morfin tilhører gruppen af opioider og har en god smertestillende effekt, men desværre også bivirkninger som

kvalme, forstoppelse, vejrtrækningsbesvær, svimmelhed og sløvhed. For at mindske brugen af morfin og derved reducere graden af bivirkninger, er der et stort ønske om at kunne anvende andre smertestillende lægemidler, eventuelt i kombination med morfin, og samtidig opnå en optimal smertestillende effekt.

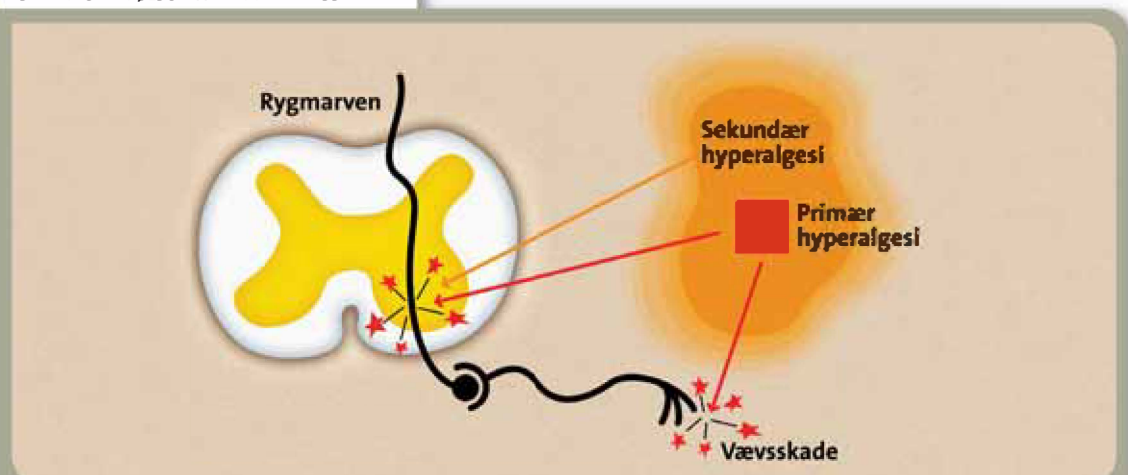
Supplement til morfin?

Et lægemiddelstof, som er interessant i denne sammenhæng, er dextromethorphan. Stoffet anvendes som hostemiddel mod tør hoste og sælges både som tabletter og mikstur på de danske apoteker. Udover at virke hostestillende har stoffet vist sig også at have anti-hyperalgetiske egenskaber, dvs. være i stand til at mindske graden af smerteoverfølsomhed efter en vævsskade, som f.eks. er opstået ved en operation. Det skyldes, at dextromethorphan tilhører den gruppe af stoffer, som blokerer de såkaldte N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-receptorer, som findes i rygmarven og er involveret i fornemmelsen af smerter.

Da dextromethorphan ikke virker på de samme receptorer som morfin, undgås de bivirkninger, som opstår ved morfinbehandling. I små doser har dextromethorphan ganske få bivirkninger, men i meget høje doser kan stoffet virke euforiserende.

Den anti-hyperalgetiske effekt efter indgift af tabletter eller mikstur er lav på grund af en ringe optagelse i blodet fra mave-tarmkanalen samt en omfattende nedbrydning i leveren. For at

SMERTEOVERFØLSOMHED EFTER VÆVSSKADER



Hyperalgesi: Øget følsomhed overfor smertefuld stimulering efter en vævsskade, som f.eks. er opstået på grund af en operation eller ved en forbrænding.

Primær hyperalgesi: Område på huden, der efter en forbrænding er ekstra følsomt overfor påvirkning med varme og tryk. Skyldes en kombination af direkte vævsskade og centrale mekanismer i rygmarven.

Sekundær hyperalgesi: Zone, der opstår i ubeskadiget hud rundt om det beskadigede område. Huden inden for zonen er ekstra følsom over for påvirkning med tryk, men ikke overfor varme. Skyldes centrale mekanismer i rygmarven.



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



Ph.d. Janne Rømsing er lektor ved Institut for Farmaci.

opnå en bedre anti-hyperalgetisk effekt af dextromethorphan og en hurtigere indsættende virkning, har vi udført et eksperimentelt smerteforsøg, hvor stoffet blev indgivet langsomt direkte i blodet ved intravenøs infusion til frivillige forsøgspersoner, som var mænd i alderen 21-35 år.

Smerteforsøg

Forsøget blev udført på Smertefysiologisk afdeling på Herlev Amtssygehus i samarbejde med overlæge Jørgen B. Dahl. Den eksperimentelle smerte blev påført forsøgspersonerne ved at bruge et varmelegeme til at opvarme et mindre område på undersiden af armen ved 45 grader i fem minutter. Derefter blev området dækket med en creme, som indeholdt det aktive stof i chilipeber. Effekten af de to stimuleringer tilsammen svarer til en første grads forbrænding med rødme og ømhed.

Det stimulerede område blev ekstra følsomt overfor tryk og varme, hvilket kaldes primær hyperalgesi. I den ubeskadigede hud rundt om det stimulerede område opstod en zone med forøget følsomhed overfor påvirkninger med tryk, hvilket kaldes sekundær hyperalgesi. Sekundær hyperalgesi skyldes centrale mekanismer i rygmærven, og menes at hænge nøje sammen med måden, hvorpå smerter opstår efter en operation.

Resultaterne af behandlingen med dextromethorphan viste en udtalt anti-hyperalgetisk virkning. Desuden viste det sig, at virkningen var forsinket ca. to timer i forhold til den maksimale koncentration af dextromethorphan i blodet. Dét er en meget vigtig oplysning set i klinisk sammenhæng, hvis man ønsker at bruge dextromethorphan mod operationssmerter. Stoffet skal altså gives ca. to timer før, den smertestillende effekt skal indtræde, hvilket ved kortvarige operationer kan betyde, at stoffet skal gives til patienten før eller ganske kort efter operationens start.

Bedre smertebehandling

Vort forsøg viser, at anvendelsen af dextromethorphan har potentiale som et supplement til den nuværende behandling af smerter efter operationer. Ved at anvende dextromethorphan kan brugen af morfin og graden af stoffets bivirkninger forhåbentligt nedsættes, samtidig med at en bedre smertedækning opnås. Dextromethorphan kan således potentielt bidrage til at forbedre patienternes velbefindende og reducere indlæggelses-tiden, hvilket vil medføre samfundsmæssige besparelser.

En hypotese er endvidere, at brugen af dextromethorphan kan mindske risikoen for senere udvikling af kroniske smerter, men dette er endnu ikkedokumenteret. Flere kliniske studier med dextromethorphan indgivet til operationspatienter er nødvendige, inden stoffet eventuelt tages i brug ved smertebehandling efter operationer.

SMERTEFORSØG:

Eksperimentel smerte-påførsel med et varmelegeme ved 45 grader i fem minutter.



En creme med indholdsstoffet fra chilipeber smøres på. Den samlede virkning af varmen og cremen svarer til en første-gradsforbrænding.



I det indrammede område ses primær hyperalgesi; rundt omkring det beskadede område er der sekundær hyperalgesi.



Med en priktest udmåles området med sekundær hyperalgesi og øget følsomhed over for smerter. Følsomheden dæmpes markant ved infusion af dextromethorphan.



Antistoffer til behandling af multipel sklerose

Hvert år rammes 200 danskere af multipel sklerose. Vi undersøger sygdomsmekanismerne og studerer de involverede vævstyper og celler ved hjælp af antistoffer, som muligvis vil kunne udvikles til lægemidler til behandling af den kroniske sygdom.

Af Liselotte Brix Jensen, Michelle Krosgaard, Lars Fugger og Jan Engberg

Multipel sklerose er en kronisk sygdom, hvor nerverne i centralnervesystemet beskadiges. Sygdommen menes at være autoimmun, dvs. at kroppens eget immunforsvar fejlagtigt angriber og nedbryder de myelinskeder, der omgiver nervetrådene. Det fører til en slags kortslutning af nerveimpulserne, som resulterer i nedsat nervefunktion. De mest almindelige symptomer er svækkelse af muskler, lammelser, problemer med synet og balanceevnen, talebesvær og vanskeligheder med vandladning.

Sygdommen udvikler sig med varierende hastighed hos forskellige patienter og er karakteriseret ved gentagne angreb på forskellige dele af nervesystemet. De enkelte angreb kan medføre en bred vifte af symptomer afhængigt af, hvilke nerver der beskadiges. I perioder forbedres eller forsvinder symptomerne helt, men de efterfølges oftest af nye anfald med sværere symptomer.

Hvert år rammes ca. 200 danskere af sygdommen, og der findes omkring 5000 patienter i Danmark. Både kvinder og mænd kan få sklerose, men kvinder rammes næsten dobbelt så ofte som mænd. Den præcise sygdomsårsag kendes ikke, og derfor er det hverken muligt at forebygge eller helbrede. Man ved dog, at både arvelige og miljømæssige faktorer spiller en rolle, og formentlig er det et sammenfald af flere faktorer, der udløser sygdommen.

Der er stor interesse i at få mere at vide om sygdomsmekanismerne, og en effektiv behandling står naturligvis højt på ønskelisten. Derfor har vi udviklet reagenser, som kan være med til at belyse sygdomsprocessen, og som eventuelt vil kunne anvendes til behandling af sklerose.

Immunforsvaret angriber eget væv
Multipel sklerose forekommer hyppigst hos personer med bestemte vævstyper

molekyler (MHC), som sidder på overfladen af de antigenpræsenterende celler. MHC-molekylerne er en vigtig del af vores immunforsvar, fordi de præsenterer stumper af fremmede proteiner, peptider, fra virus eller bakterier for immunforsvarets angrebsceller, T-cellerne. Når T-cellerne genkender et kompleks af MHC og et peptid, aktiveres immunforsvaret, som bekæmper den pågældende virus eller bakterie.

Under normale omstændigheder er immunforsvaret i stand til at genkende kroppens væv som "selv" og angriber ikke kroppens egne celler, men hos sklerosepatienter sker der en fejlagtig genkendelse af eget væv som fremmedartet, og T-cellerne går til angreb på de skeder af myelin, som omgiver og beskytter nervetrådene.

I patienter med sklerose har man fundet T-celler, der genkender specifikke peptider, som er dannet ved nedbrydning af myelin, og som præsenteres af vævstypemolekylet DR2. Sådanne T-celler findes også hos raske individer, men hos sklerosepatienter er de aktiverede, og deres genkendelse af myelinpeptiderne medfører, at immunforsvaret forsøger at nedbryde myelinskederne.

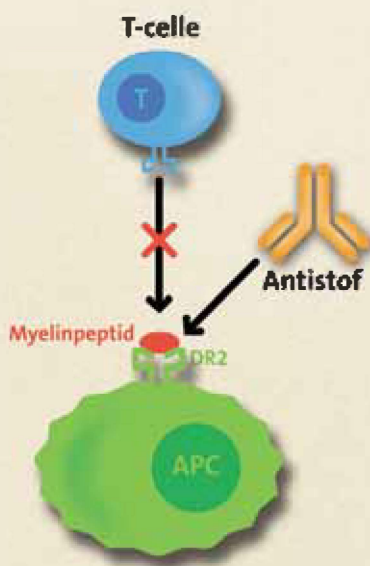
Det er endnu ikke klarlagt, hvordan T-cellerne aktiveres hos sklerosepatienter, men en teori går ud på, at dele af virus eller bakterier ligner komponenter fra myelin og dermed aktiverer T-celler, der så genkender både myelin og den pågældende virus eller bakterie. For nylig er det blevet vist, at en autoreaktiv T-celle fra en sklerosepatient både aktiveres af dele af en virus bundet til et specifikt vævstypemolekyle og af et myelinpeptid bundet til et andet vævstypemolekyle.

Hjernevæv fra patienter

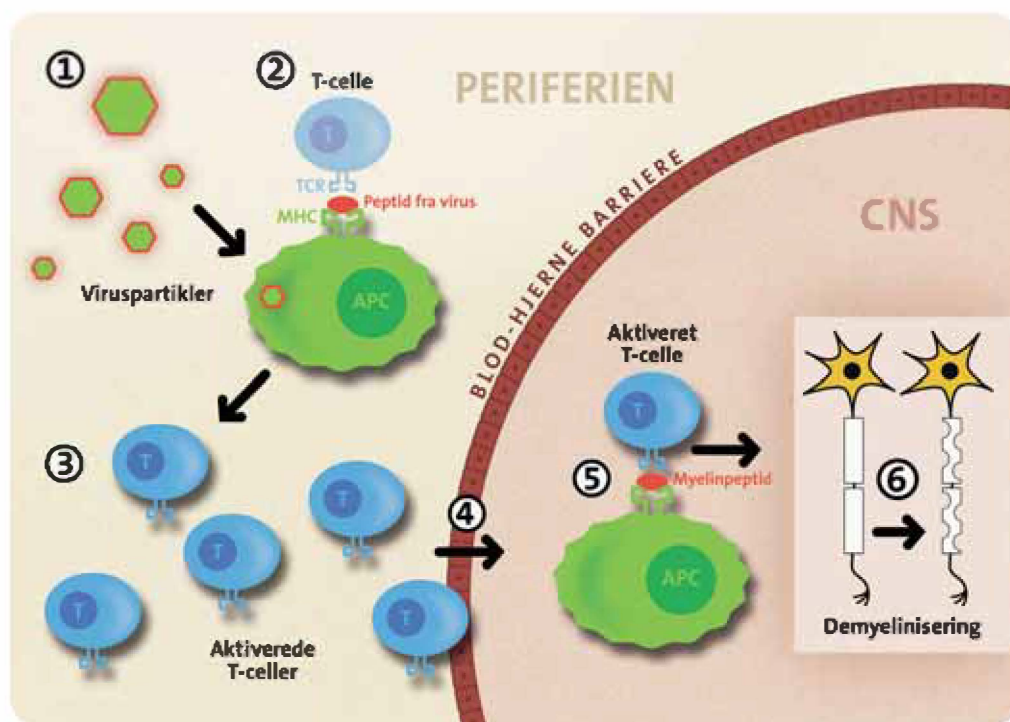
Vi har specialiseret os i at fremstille sjældent forekommende antistoffer, der genkender MHC-peptidmolekyler på samme måde og med samme specificitet som immunforsvarets T-celler. Antistofferne kan bruges til at undersøge forekomsten af MHC-peptidmolekyler på celler og i væv. Desuden kan de blokere for T-cellers genkendelse af MHC-peptid og dermed påvirke aktiveringen af immunforsvaret.

Vi har isoleret antistoffer, der specifikt genkender komplekser af vævstypemolekylet DR2 og myelinpeptid, og antistofferne er blevet brugt til at undersøge forekomsten af DR2-myelinpeptid i hjernevæv fra patienter med sklerose og hos raske personer. Forsøgene viste, at kompleksene findes på overfladen af celler i hjernen hos både raske mennesker og sklerosepatienter, men patienterne har flere celler med disse molekyler på overfladen og har flere molekyler pr. celle.

Det understreger betydningen af vævstypemolekylet DR2 i udviklingen af sklerose, men viser samtidig, at tilstedeværelsen af DR2 i sig selv ikke er nok til at udvikle sygdommen. Forsøgene viste også, hvilken type af celler i hjernen der præsenterer DR2-myelinpeptid. Observationen er vigtigt i forståelsen af de biologiske mekanismer, der ligger til grund for multipel sklerose.



Vi har udviklet antistoffer, der har samme specificitet som de autoreaktive T-celler, der angriber myelinskederne. Antistofferne forhindrer aktiveringen af T-cellerne ved at blokere for deres genkendelse af DR2-myelinpeptidmolekyler på overfladen af antigenpræsenterende celler (APC).

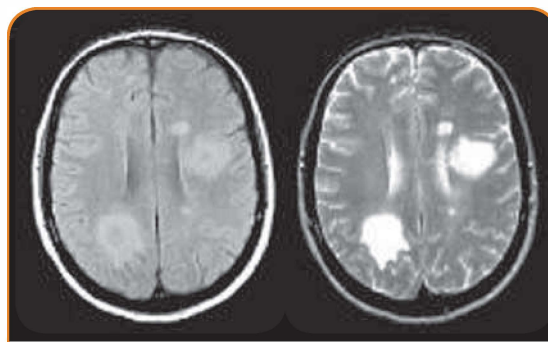


Hypotetisk mekanisme ved udviklingen af multipel sklerose: (1) Under en virusinfektion bliver virus optaget af antigenpræsenterende celler (APC) og nedbrudt til mindre proteinstykker, peptider (2). Peptiderne præsenteres for immunforsvarets T-celler ved hjælp af specialiserede receptorer, kaldet MHC-molekyler, og T-cellerne genkender virusstumperne som fremmede (3). T-cellerne aktiveres og deler sig (4). De aktiverede T-celler krydser blod-hjernebarrieren og kommer ind i centralnervesystemet, hvor de møder nye APC-celler, der præsenterer komponenter fra nedbrudt myelin, myelinpeptider, som ligner viruspeptider og dermed genkendes af de aktiverede T-celler (5). Det starter en reaktion, der fører til nedbrydning af myelinen omkring nerveenderne (6).

Antistoffer til behandling

På den baggrund undersøger vi, om antistofferne kan bruges til at hæmme T-cellernes aktivering og dermed udviklingen af sygdommen. Forskning har gjort det muligt at dyrke T-celler udtaget fra patienter med multipel sklerose i cellekulturer. Det viser sig, at vores DR2-myelinpeptid specifikke antistoffer kan forhindre T-cellerne i at blive aktiveret af celler, der præsenterer DR2-myelinpeptid. På den baggrund er det muligt, at antistoffet også i mennesker kan hæmme T-cellernes aktivering og dermed deres ødelæggende effekt.

Før man kan undersøge, om antistofferne har en gavnlig effekt på sklerosepatienter er det nødvendigt at testevirkningen i egnede dyremodeller, og her findes der genmodificerede mus, som kan få induceret en skleroselignende sygdom. Vi er i gang med at undersøge effekten af et af vores antistoffer i musene, hvor vi forsøger at hæmme sygdomsudviklingen ved behandling med antistoffet. Foreløbige resultater tyder på, at antistoffet har en beskyttende virkning.



Hjerneskader som følge af multipel sklerose set i en MR-scanner. Der ses to akutte læsioner med betydeligt ødem, samt to mindre kroniske læsioner. Her er vist to forskellige MR-billeder: Protonvægtet (venstre) og T2-vægtet (højre).

KRYSTALLER ØGER FORSTÅElsen

Der forligger ingen strukturel viden om, hvordan T-celler eller T-cellelignende antistoffer genkender DR2-myelinpeptid, men en sådan viden er vigtig for at forstå mekanismerne. Proteinets tredimensionelle opbygning kan opklares på atomart plan ved hjælp af røntgenkrystallografi, og vi er sammen med vores samarbejdspartnere i Oxford i færd med at bestemme strukturen af et af vores antistoffer bundet til komplekset af DR2 og myelinpeptid. Det er nødvendigt at fremstille store mængder af ultrarent protein til de røntgenkrystallografiske studier, hvilket er meget tidskrævende.

Samtidig er vores samarbejdspartnere i Oxford i gang med at løse strukturen for T-celleceptoren i kompleks med det samme vævstypemolekyle. Sammenligning af de to strukturer kan give en bedre forståelse af genkendelsesprocessen og information om, hvad der skal til for at forhindre T-cellens genkendelse af DR2-myelinpeptid. Informationerne kan åbne op for nye angrebsstrategier ved udvikling af lægemidler til behandling af multipel sklerose.



Ph.d. Liselotte Brix Jensen er adjunkt ved Institut for Farmakologi.



Ph.d. Michelle Krogsgaard, er postdoctoral fellow ved Department of Microbiology and Immunology, Stanford University School of Medicine, USA.



Dr.med. Lars Fugger er professor og overlæge ved Klinisk Immunologisk afdeling, Århus Universitetshospital, Skejby Sygehus



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

Når filmens fiktion bliver virkelighed

På film er det legende let. Ude i junglen putter Dr. Campbell et blad i kromatografen, og på en computerskærm ser han en 3D-struktur af det aktive plantestof, som måske kan helbrede kræft. Faktisk er fiktionen på vej til at blive til virkelighed.

Af Dan Stærk, Maja Lambert, Majid Sairafianpour, Cailean Clarkson og Jerzy W. Jaroszewski

I filmen "Medicine Man" fra 1992 spiller Sean Connery rollen som Dr. Robert Campbell, en excentrisk videnskabsmand, der arbejder på et forskningsprojekt langt ude i Amazonjunglen. Hans mål er at identificere et stof fra en plante, som kan helbrede kræft. Tiden er knapp, for bulldozerne er ved at æde sig vej hen til det område, hvor planterne gror.

Opgaven med at identificere det aktive indholdsstof i planten lykkes først, da han får tilsendt en gaskromatograf. I filmen ses Dr. Campbell putte et blad i gaskromatografen, og sekunder senere vises den tredimensionelle struktur af molekylet på en computerskærm.

Det er absolut ikke fiktion, at naturen er en rig kilde til nye lægemidler, men det er det rene eventyr, at strukturen af et specifikt indholdsstof kan findes så let og hurtigt. Ikke desto mindre arbejder en forskningsgruppe ved Danmarks Farmaceutiske Universitet på at udvikle en ny teknik, som vil gøre filmens visionære fiktion til virkelighed i laboratoriet.

Naturen som kilde til lægemidler

Naturen har gennem årtusinder været en rig kilde til medicin for mennesket, og omkring 75 procent af jordens befolkning har udelukkende adgang til planter som medicin. I Danmark har anvendelsen af naturlægemidler et betydeligt omfang, men også indenfor den etablerede lægemiddelverden spiller naturstoffer en vigtig rolle. Således er omkring halvdelen af alle nye lægemiddelstoffer enten naturstoffer eller strukturer, hvor naturstoffer har været inspirationskilden. Som eksempler på naturstoffer, der anvendes som etablerede lægemidler, kan nævnes kinin fra kinabark mod malaria, morfin fra opiumsvalmuen som bedøvelsesmiddel og taxol fra takstræet som medicin mod kræft.

Grunden til, at naturstoffer spiller så central en rolle i lægemiddeludviklingen er, at planter gennem milliarder af års evolution har udviklet stoffer som værn mod bakterier og andre mikroorganismer. Naturstoffer indeholder derfor en forprogrammeret biologisk effekt, hvorfor naturstoffer ofte kaldes privilegerede strukturer. Desuden er mangfoldigheden og forskelligheden af naturstoffers kemiske strukturer, kemodiversiteten, meget større end det, man kan syntetisere i laboratoriet.

Naturen har således udviklet et helt bibliotek af privilegerede strukturer, men for at kunne anvende naturstofferne i medicinalforskning skal de først isoleres i ren form, og strukturen af stofferne skal opklares. Det har indtil videre været et langsomt og kostbart arbejde at få isoleret naturstofferne og løst deres struktur, men ny teknologi ser ud til at kunne klare opgaven på en brøkdel af den tid, der hidtil har været nødvendig.

Tre fluer med ét smæk

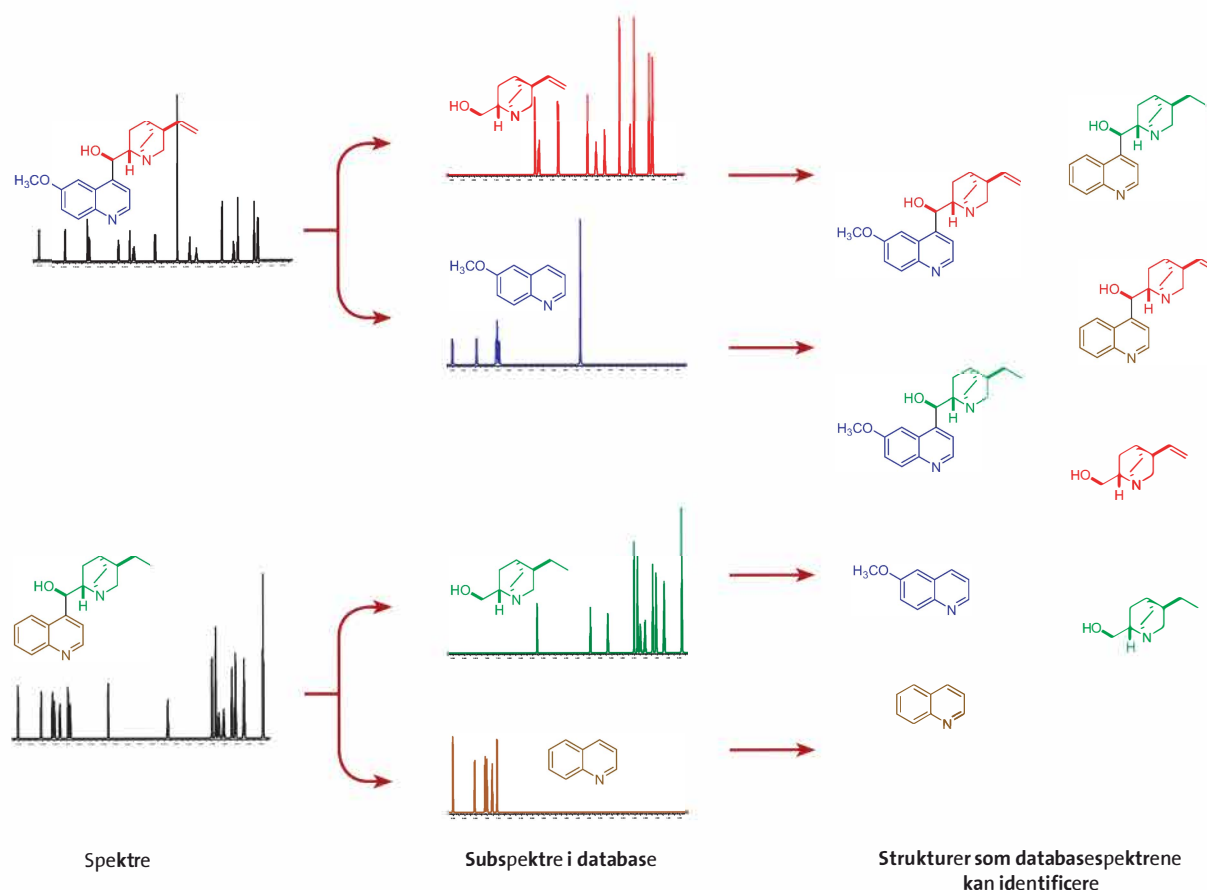
Om end ekstraktioner foregår på en anden måde i laboratoriet, så laver de fleste danskere ekstrakter hver dag i form af kaffe eller te, hvor indholdsstofferne i kværnedes kaffebønner eller fintsnittede teblade ekstraheres med varmt vand. På tilsvarende måde starter alle isoleringsprocedurer i laboratoriet med, at naturstofferne ekstraheres fra plantematerialet med et passende opløsningsmiddel. Så vidt så godt, men nu kommer den første store udfordring, for det er ofte en vanskelig opgave at isolere hvert enkelt stof fra de komplekse ekstrakter. Problematikken kan illustreres ved, at et almindeligt ekstrakt som kaffe indeholder flere hundrede forskellige stoffer.

Hidtil har princippet været, at flere forskellige kromatografiske trin på præparativ skala har ført til isolering af tilstrækkelige mængder af stofferne til en efterfølgende strukturoptælling med hjælp af moderne spektroskopiske teknikker. Men selv her er man ikke i mål - for et spektrum skal tolkes af en person med ekspertviden for at opklare den tredimensionelle struktur af det pågældende stof. Isoleringen af ekstrakternes indholdsstoffer, optagelse af spektrale data for de enkelte stoffer og den manuelle tolkning af spektrene har hidtil været betragtet som tre adskilte trin på vejen til at løse de isolerede molekylers strukturer.

Nye teknologiske landvindinger har imidlertid gjort det muligt at lave en direkte sammenkobling af den hurtigste og mest



HPLC-NMR apparaturet ved Danmarks Farmaceutiske Universitet. I glasskabet til højre ses HPLC delen, som er forbundet til NMR apparatet til venstre med tynde kapillarer, som ses ved pilen.



Et ukendt naturstof, der kan betragtes som opbygget af to kendte delstrukturer, vil kunne identificeres, fordi spektret af stoffet vil ligne summen af spektrene af de to delstrukturer. Princippet er her illustreret med quinolinalkaloide som eksempel. Figuren viser, hvordan spektret af kinin øverst tv. både giver referencespektret til kinin selv, samt til to delstrukturer, som er elementer i andre quinolinalkaloide. Det samme gælder for dihydrocinchonidine nederst tv., og ved at kombinere spektrene af de to stoffer kan man få referencespektre til identificering af otte mulige strukturer og/eller delstrukturer.

effektive kromatografiske metode HPLC (High Performance Liquid Chromatography) med den i særklasse mest informative spektroskopiske teknik NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Den direkte sammenkobling af HPLC og NMR kaldes HPLC-NMR og er muliggjort af et nyligt opstillet apparatur ved Danmarks Farmaceutiske Universitet.

Ved undersøgelserne adskilles stofferne i et planteekstrakt ved hjælp af HPLC og føres direkte over i NMR-spektrometret, hvor de nødvendige spektrale data optages for hvert enkelt stof. Ud over at HPLC-NMR sammensmelter to arbejdsprocesser, som før var adskilte, så medfører udformningen af de enkelte komponenter i HPLC-NMR apparaturet, at der kan arbejdes med meget mindre mængder prøver end tidligere. Alt i alt betyder det en væsentlig nedsættelse af arbejdsbyrden.

Hidtil har tolkningen af de spektrale data fra HPLC-NMR været foretaget manuelt. Naturstokemisk gruppe arbejder imidlertid på også at automatisere denne proces, så man kan slå alle tre fluer med ét smæk. Udviklingsprocessen sker i samarbejde med det firma, som fremstiller HPLC-NMR apparaturet. Metoden går ud på at udvikle computerbaserede søgealgoritmer, som kan identificere strukturen af de isolerede stoffer ved hjælp af sammenligninger med spektrale data fra en database.

Opbygning af database

Man kender i øjeblikket mere end 200.000 naturstoffer, og det samlede antal naturstoffer må antages at være væsentligt større. Ideelt set skulle en database indeholde spektre af samtlige disse naturstoffer. Det er imidlertid en næsten uoverkommelig opgave, både økonomisk og tidsmæssigt, at optage NMR-spektre af alle de kendte naturstoffer, hvoraf mange ikke er tilgængelige i ren form. For endnu ukendte stoffer er der ingen muligheder for på forhånd at have spektrale data.

Heldigvis er det ikke nødvendigt at have spektrale data af alle kendte stoffer for at kunne bruge databasen til strukturoptælling af nye stoffer. Det skyldes, at mange naturstoffer kan betragtes som strukturer, der er opbygget af mindre delstrukturer, og ofte vil delstrukturene være kendte. Et nyt stof, som er opbygget af to kendte delstrukturer, vil derfor kunne identificeres, fordi spektret af dette naturstof vil ligne summen af spektrene af de to delstrukturer.

Store perspektiver

Ved Danmarks Farmaceutiske Universitet har brugen af HPLC-NMR indtil videre primært været brugt til at undersøge planter med virkning mod parasitære sygdomme såsom malaria og Leishmaniasis. Millioner af mennesker smittes hvert år med de to sygdomme, og for malaria er der en meget stor dødelighed; specielt blandt børn.

HPLC-NMR har allerede vist sig som en effektiv metode til meget hurtigt at identificere indholdsstofferne i planteekstrakter. Således er der på meget kort tid isoleret quinolinalkaloide med virkning mod malariaparasitter og tanshinoner med virkning mod Leishmaniaparasitter. Der arbejdes i øjeblikket intensivt med at videreudvikle HPLC-NMR systemet og efterprøve metoden indenfor mange andre forskningsprojekter.

Den kortere analysetid som HPLC-NMR har sammenlignet med traditionelle metoder betyder, at et meget større antal planter kan undersøges på samme tid. Dermed bliver det meget billigere at isolere naturstoffer, og det må forventes, at naturstoffer vil komme til at spille en endnu stærkere rolle i lægemiddeludviklingen end det er tilfældet i dag. Om end isolering og strukturoptælling endnu ikke foregår så hurtigt som i "Medicine man", så er filmens fiktion på vej til at blive virkelighed.



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



Cand.scient. Maja Lambert er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Majid Sairafianpour er adjunkt ved Institut for Medicinalkemi.



Ph.d. Cailean Clarkson er adjunkt ved Institut for Medicinalkemi.



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

Jagten på tempeltræets hemmelighed

Ekstrakt af tempeltræets blade er verdens mest solgte naturlægemiddel og påstås at afhjælpe demens og andre sygdomme i hjernen. Ved at studere unikke stoffer i ekstraktet forsøger forskere på DFU at opklare, hvordan stofferne virker i hjernen. Målet er at udvikle stoffer, der virker bedre end de naturlige.

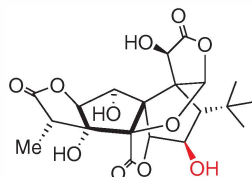
Af Kristian Strømgaard

Verdens mest solgte naturlægemiddel er ekstrakt fra træet Ginkgo biloba, også kaldet tempeltræet. G. biloba-ekstrakt bruges især i mange europæiske lande, hvor det udskrives til at afhjælpe symptomer på demens, især Alzheimers sygdom, og en række kliniske studier har antydnet, at ekstraktet rent faktisk har en vis effekt. Den påståede positive virkning på almindelige menneskers hukommelse er formentlig mere tvivlsom.

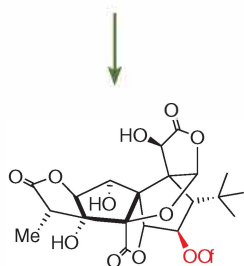
Ved anvendelse af naturlægemidlet indtager man en kompleks blanding af mange forskellige stoffer. Ekstraktet er standardiseret

efter to typer af kemiske forbindelser, flavonoider og terpenilaktoner, og man formoder, at det er netop disse to stofgrupper, der har afgørende betydning for effekten. Terpenilaktonerne er en gruppe af stoffer, der er unikke for G. biloba og ikke findes andre steder i planteriget. Derimod forekommer flavonoiderne i en lang række planter, og man ved, at de kan have gavnlige virkninger, f.eks. som antioxidant. Men det er højst usikkert, om flavonoider trænger ind i hjernen, hvilket naturligvis er en forudsætning for at kunne have effekt i hjernen.

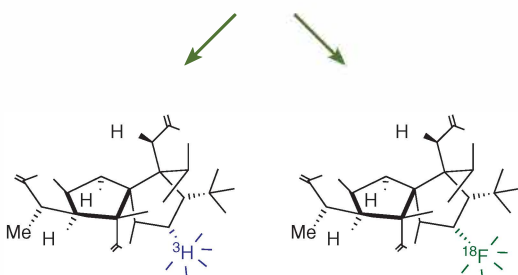
Der er stor interesse for at forstå, hvorfor og hvordan G. biloba-ekstrakt virker og for at udvikle lægemidler baseret på indholdsstofferne. Da der er forholdsvis gode indikationer for, at terpenilaktonerne er helt eller delvis ansvarlige for G. bilobas terapeutiske effekt, er disse stoffer et godt sted at starte. Der er to grundlæggende spørgsmål, som må afklares, hvis man skal sandsynliggøre, at terpenilaktoner er involveret i G. bilobas effekt på sygdomme i hjernen: Først og fremmest må man vise, at stofferne faktisk trænger ind i hjernen. Dernæst må man afklare, hvordan de påvirker hjernens funktion, f.eks. ved at ændre nerve-cellerne omsætning af signalstoffer. At besvare de to spørgsmål var målet for et forskningsprojekt, der blev udført i samarbejde med Kemisk Institut på Columbia University i New York.



ginkgolide C



mellemprodukt



For at undersøge om terpen-trilak-toner fra Ginkgo biloba trænger ind i hjernen, blev to forskellige radioaktive versioner af de naturlige stoffer fremstillet. Startende fra det naturlige ginkgolide C blev et mellemprodukt lavet, hvorfra begge radioaktive stoffer kunne fremstilles.

VERDENS ÆLDSTE TRÆ

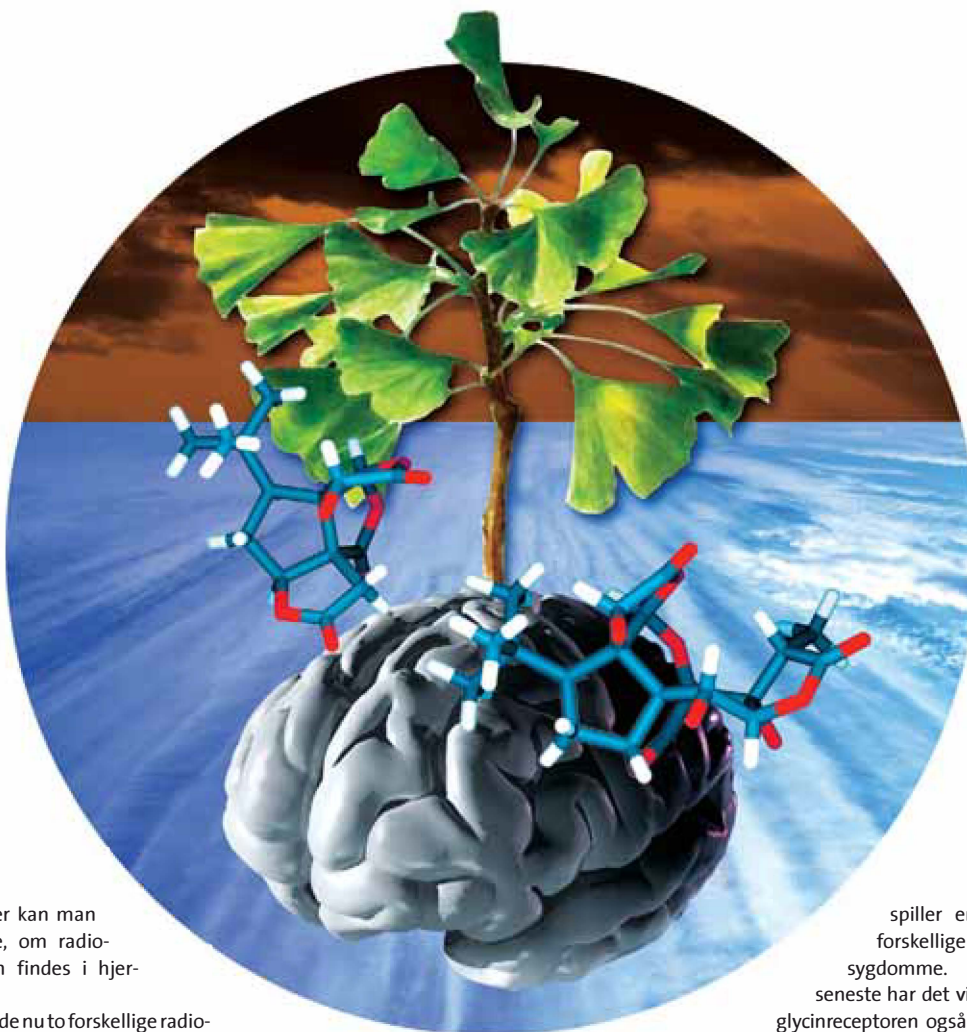
Tempeltræet er verdens ældste træ, som har vokset på Jorden gennem mere end 250 millioner år. Brugen af Ginkgo biloba-ekstrakt til medicinsk behandling blev allerede beskrevet i kinesiske lægebøger for over 3000 år siden. I dag vokser der mere end 50 millioner tempeltræer verden over, specielt i Kina, Frankrig og USA. De producerer hvert år omkring 8000 tons tørrede blade, der bruges til at fremstille ekstrakt. Et standardiseret ekstrakt indeholder 6 procent terpenilaktoner og 24 procent flavonoider. Ekstrakter markedsføres blandt andet under navnene Tanakan (Frankrig) og Rökan (Tyskland). I Tyskland bliver Ginkgo biloba-ekstrakt ordineret til behandling af forskellige lidelser relateret til hukommelse og demens.

Ind i hjernen

Det er ofte et stort problem at få lægemiddelstoffet transporteret ind i hjernen, fordi naturen har været så snedig at danne den såkaldte blod-hjernebarriere, der forhindrer fremmede stoffer i at trænge ind i hjernen. Barrieren kan dog overskrides på forskellig vis, bl.a. mener man, at stoffer, som er meget fedtopløselige, nemmere trænger over blod-hjernebarrieren end mere vandopløselige stoffer. Når man vil undersøge, om bestemte stoffer trænger ind i hjernen, fremstiller man en radioaktivt mærket version af stoffet. Det radioaktivt mærkede stof gives til forsøgsgdyr,



Ph.d. Kristian Strømgaard er adjunkt på Institut for Medicinalkemi.



og derefter kan man undersøge, om radioaktiviteten findes i hjernen.

Vi designede nu to forskellige radioaktive versioner af terpenlaktoner, hvor mærkningen blev foretaget med tritium (^3H) og fluor-18 (^{18}F), som er radioaktive versioner af brint og fluor. De to radioaktive atomer har vidt forskellige egenskaber, som gør, at de hver for sig kan besvare basale spørgsmål om stoffernes skæbne i kroppen. Tritium, som har en lang halveringstid på 12 år, er velegnet til at påvise radioaktiviteten ved obduktion efter aflivning. Fluor-18 har en kort halveringstid på 110 minutter og kan bruges til undersøgelser af den levende hjerne ved hjælp af PET scanning (Positron Emission Tomografi).

Udgangspunktet for syntesen var en af de naturlige terpenlaktoner, ginkgolid C, som blev omdannet til et mellemprodukt. I mellemproduktet kunne både tritium og fluor-18 introduceres i molekylet, og de to radioaktive versioner af ginkgolidet blev fremstillet. Stoffene blev injiceret i rotter, som blev aflivet på forskellige tidspunkter efter injektionen. Derefter blev de forskellige dele af kroppen, især hjernen, analyseret for spor af radioaktivitet. En fraktion af de radioaktive stoffer trængte over blod-hjernebarrieren, selv om stofferne blev fundet i de største mængder i nyrerne og leveren.

Studierne viste præcist, hvor i hjernen stofferne fandtes. Så på spørgsmålet om terpenlaktoner trænger ind i hjernen, kan vi nu svare: Ja, det gør de!

Påvirkning af signalstoffer

Tidligere studier havde indikeret, at terpenlaktoner påvirker de signalstoffer i hjernen, som dæmper kommunikationen mellem nerveceller; specifikt gamma-aminosmørsyre (GABA) og glycin. Begge signalstoffer kontrollerer åbning og lukning af ionkanaler i nervecellernes receptorer for stofferne.

Flere lægemidler påvirker GABA-receptoren, mens man ved væsentligt mindre om glycinreceptoren. Giftstoffet stryknin er dog kendt for at blokere receptoren, og man ved at receptoren

spiller en rolle i forskellige arvelige sygdomme. På det seneste har det vist sig, at glycinreceptoren også er involveret i følelsen af smerte.

For at undersøge om terpenlaktoner har en effekt på GABA- og glycinreceptorer, brugte vi dele af rottehjerner, hvor disse receptorer findes. Terpenlaktoner blev tilsat, og vi målte aktiviteten i receptorerne. Det viste sig, at terpenlaktonerne blokerede glycinreceptorerne ved at binde nede i selve ionkanalen og fungere som en prop, der lukker kanalen.

Dermed var terpenlaktoners første direkte effekt på vigtige signalstoffer i hjernen påvist, men betydningen af blokeringen af glycinreceptorer i relation til behandling af sygdomme i hjernen er langt fra klarlagt.

Nye stoffer og testmetoder

Hvis man vil udvikle lægemidler baseret på terpenlaktoner fra *G. biloba*, er det nødvendigt at forstå, hvilke dele af stoffet der er nødvendige for aktiviteten. Samtidig er det absolut ikke sikkert, at det naturlige stof isoleret fra *G. biloba* virker optimalt. Derfor er det nødvendigt at ændre på stoffet og undersøge, hvad ændringerne betyder for aktiviteten på receptoren.

Derfor har vi fremstillet op mod 70 forskellige terpenlaktoner. De nye stoffer syntetiseres ud fra de naturlige stoffer og derefter analyseres stofferne for deres aktivitet på receptoren ved hjælp af et testsystem, der hurtigt og effektivt kan give svar på stoffernes aktivitet. Foreløbigt har det vist sig at være svært at forbedre aktiviteten af de naturlige stoffer, men det har været muligt at forsimple den relativt komplicerede struktur og samtidig bevare aktiviteten.

Da glycinreceptoren er involveret i en række arvelige sygdomme og i smerte, kan man forestille sig, at terpenlaktonerne kan bruges til behandling af disse sygdomme. Samtidig kan stofferne bruges som værktøjer til at skabe ny forståelse for glycinreceptorernes funktion og derved bane vej for udvikling af nye lægemidler.

Ny bioisoster kan skabe nye lægemidler

En nyt stof aktiverer receptorerne for hjernens vigtigste stimulerende signalstof, glutaminsyre, og den nye kemiske struktur rummer unikke muligheder for at designe lægemiddelstoffer, der specifikt aktiverer udvalgte glutaminsyre-receptorer. Det kan bane vejen for lægemidler mod Alzheimers syge, epilepsi og skizofreni.

Af Jesper Kristensen og Rasmus Prætorius Clausen

På Institut for Medicinalkemi har syntesegruppen og neuromedicinalkemigruppen samarbejdet om at udvikle en ny kemisk struktur, der efterligner carboxylsyren, som er indbygget i to meget vigtige signalstoffer i hjernen. Opdagelsen giver nye muligheder for at fremstille kemiske stoffer, der kan imitere de to signalstoffer og give indsigt i, hvordan hjernen fungerer. I sidste ende kan det føre til nye og forbedrede lægemidler mod alvorlige hjerne-lidelser som Alzheimers sygdom, epilepsi og skizofreni. Her er der nemlig ubalance i de signalsystemer i hjernen, der benytter de to signalstoffer.

Carboxylsyre findes ikke blot i hjernen, men er universelt tilstede i en stor del af kroppens kemiske stoffer og er bl.a. grunden til at eddikesyre og citronsyre smager surt. Mange af kroppens proteiner genkender forskellige signalstoffer, som indeholder carboxylsyren. Det gælder f.eks. for nervecellernes receptorer for hjernens to mest udbredte signalstoffer: Det stimulerende signalstof glutaminsyre og det hæmmende signalstof gamma-aminosmørsyre (GABA). Begge stoffer indeholder carboxylsyren, som er helt central for kroppens genkendelse af stofferne. Hvis carboxylsyren ikke var indbygget i signalstofferne, ville hjernens receptorer ikke kunne genkende dem.

Neuromedicinalkemigruppen har i en årrække arbejdet med at fremstille stoffer, der indeholder en bioisoster for carboxylsyren. Det vil sige en kemisk struktur, der er sur som carboxylsyren,

men alligevel ikke er identisk. Da strukturen ligner den ægte vare, vil nogle af kroppens receptorer tro, at stoffet er et signalstof, mens andre receptorer ikke kan genkende det. Man kan derfor kemisk fremstille et stof, som ligner GABA, men som indeholder bioisosteren i stedet for carboxylsyren. Dette stof kan nu tænde eller slukke for udvalgte GABA-receptorer i hjernen.

Kemisk tæmning

Det er princippet i et stof fra neuromedicinalkemigruppen, som Lundbeck er i færd med at udvikle til et nyt sovemiddel. Sovemidlet aktiverer kun nogle ganske bestemte GABA-receptorer i hjernen, og netop derfor er det anvendeligt. Hvis man brugte et stof, der aktiverede flere forskellige typer GABA-receptorer, ville det være giftigt.

Naturen anvender samme princip. Bioisosteren, som er brugt i sovemidlet, stammer fra rød fluesvamp. Svampen fremstiller to stoffer med denne bioisoster: Ibotensyre, som efterligner glutaminsyre, og muscimol, som efterligner GABA. De to stoffer er dog giftige og netop deres aktivering af udvalgte GABA-receptorer og glutaminsyre-receptorer i hjernen er den direkte årsag til svampens hallucinerende effekter. Ved kemisk modificering af muscimol har man "tæmnet" det giftige stof og gjort det anvendeligt til at afhjælpe søvnproblemer.

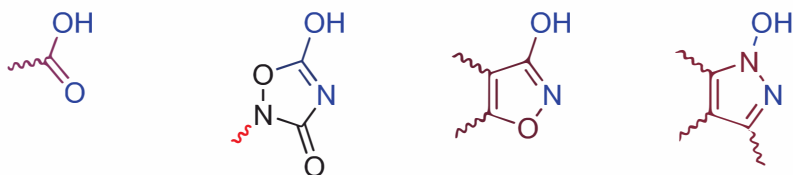
Et andet eksempel er stoffet quisqualysyre som er isoleret fra planten *Quisqualis indica*, som stammer fra Papua Ny Guinea. Dette stof efterligner glutaminsyre og kan aktivere udvalgte glutaminsyre-receptorer, men ved hjælp af en anden bioisoster end den fra rød fluesvamp.

Syntetisk stof

Den nye bioisoster, der er opdaget på Institut for Medicinalkemi, findes ikke i naturen. Den er syntetisk fremstillet, og kroppen vil genkende denne bioisoster anderledes end de tidligere kendte bioisostere. Det blev klart, da ibotensyre fra rød fluesvamp blev fremstillet med den nye bioisoster. Naturlig ibotensyre var kun i stand til at aktivere to af tre undergrupper af glutaminsyre-receptorer, mens den nye bioisoster aktiverede alle tre undergrupper. Hjernen vil derfor reagere forskelligt på de to stoffer, selvom de ligner hinanden meget.

Det nye stof vil formodentlig være giftigt, hvis det kom ind i hjernen, men mulighederne for at tæmme stoffet er større end for ibotensyre. Den nye bioisoster kan nemlig udbygges i tre positioner, mens bioisosteren fra rød fluesvamp kun kan udbygges to steder. Den syntetiske bioisoster byder derfor på nye muligheder for at opbygge kemiske stoffer, som ikke kan fremstilles ud fra de tidligere anvendte bioisostere.

Man kan forestille sig mange anvendelsesområder for denne nye carboxylsyrebioisoster. Vi arbejder i øjeblikket bl.a. på at fremstille stoffer, hvor syregruppen i GABA og gamma-hydroxysmørsyre - bedre kendt som fantasy - udskiftes med den nye bioisoster i jagten på at udvikle nyeselektive farmakologiske værktøjer og i sidste ende lægemidler.



Carboxylsyrens kemiske struktur er vist med blå til venstre. Med rødt er det angivet, hvor man kemisk kan bygge videre på strukturen. De næste to strukturer er bioisosterne fra *Quisqualis indica* og fra rød fluesvamp, *Amanita Muscaria*. Bioisosteren fra *Quisqualis indica* kun kan udbygges i en position, mens den fra rød fluesvamp byder på to udbygningsmuligheder. Den nye syntetiske bioisoster, som er vist til højre, er unik, fordi den har hele tre positioner, hvor man kan udbygge strukturen kemisk. Det giver flere muligheder i design af lægemiddelstoffer.

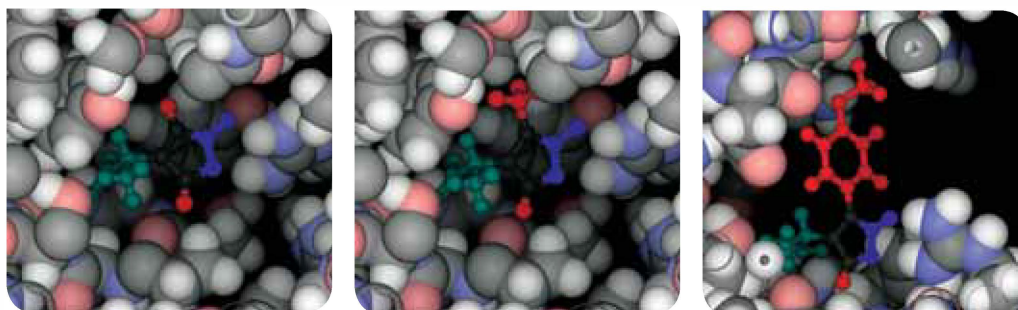


Ph.d. Jesper Kristensen
er adjunkt ved Institut
for Medicinalkemi.



Ph.d. Rasmus Prætorius
Clausen er forsknings-
adjunkt ved Institut for
Medicinalkemi.

DESIGN AF SPECIFIKKE STOFFER



De tre figurer viser, hvordan man kan bruge den nye biooster til at fremstille stoffer med virkning på specifikke receptorer for glutaminsyre. I eksemplerne er bioosteren anvendt i stoffer, der ligner ibotensyre fra rød fluesvamp.

Bioosteren er den femleddede ring, hvor syredelen er farvet blå, mens den sorte farve angiver ringens tre kulstofatomer, hvor man kan udbygge strukturen kemisk.

I figuren til venstre har vi udbygget den ene position med en aminosyregruppe (grøn), som er nødvendig for glutaminsyre-receptorernes genkendelse af stoffet. De to andre positioner er angivet med rødt. Dette stof aktiverer tre slags glutaminsyre-receptorer. Receptoren er vist i sin aktiverede form, hvor den omslutter stoffet som handsken om en hånd.

I midterste figur har vi modificeret stoffet ved at indsætte en methylsubstituent (rød) i øverste kulstofposition (sort). Stoffet tæmmes derved til kun at aktivere en af de tre receptorgrupper. Stoffer af denne type kan muligvis anvendes mod neurologiske lidelser som Parkinsons syge, depression og migræne. Et lægemiddel mod angst, som har præcis denne aktivitetsprofil, er på vej i USA.

I de to første figurer passer stofferne til receptorlommen. Men i højre figur er en meget større substituent end methylsubstituenten indsat i øverste position (rød). Udbygningen forhindrer receptoren i at lukke sammen om stoffet, som derfor ikke længere aktiverer receptoren. Dette stof kan til gengæld forhindre glutaminsyre i at aktivere receptoren ved at spærre for receptorlommen. På den måde kan det slukke for udvalgte glutaminsyre-receptorer i hjernen.

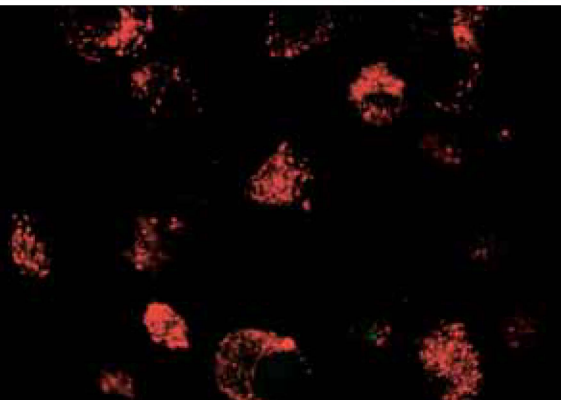
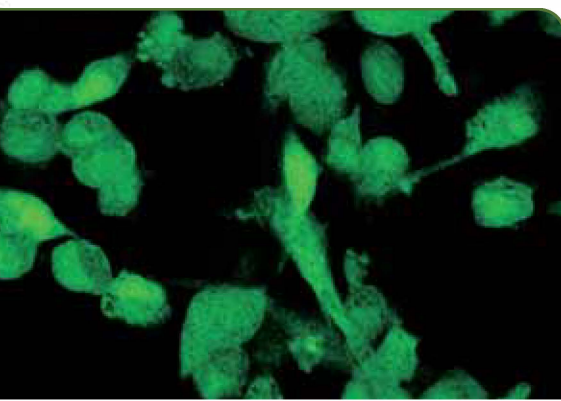
Næste trin i forskningen bliver at modificere den tredje position nederst i bioosteren. Det giver nye muligheder for at kontrollere stoffernes biologiske aktivitet.

siRNA

– fremtidens lægemidler?

Små interfererende RNA-molekyler (siRNA) kan effektivt skrue ned for udtrykkelsen af specifikke gener. siRNA har et stort terapeutisk potentiale til behandling af sygdomme, som kan kureres ved at hæmme et eller flere gener, f.eks. kræft eller AIDS. Flere store farmaceutiske udfordringer skal dog løses, inden siRNA kan blive til lægemidler.

Af Camilla Foged, Sven Frøkjær og Hanne Mørck Nielsen



Et optisk snit af HeLa-celler optaget ved konfokalmikroskopi. HeLa-cellerne er stabilt transfekteret med proteinet Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), der er et grønt fluorescerende protein (vist ved den grønne farve). Cellerne øverst er ubehandlede. Cellerne nederst er behandlet med komplekser af kationiske liposomer og siRNA, der er mærket med en rød farve. Det ses, at behandling med siRNA fører til optagelse af siRNA i cellerne og hæmning af udtrykkelsen af EGFP (den grønne farve er knap synlig på nederste billede).

Alle celler i planter, dyr og mennesker har et urgammelt indbygget forsvar, som opsporer og destruerer fremmed genetisk materiale. Systemet slår til, når det opdager dobbeltstrengt RNA - for dét er lig med problemer. Dobbeltstrengt RNA kan f.eks. være virus, som er ved at inficere cellen.

Fænomenet, som er relativt nyopdaget, kaldes RNA-interferens (RNAi). I 2001 blev det publiceret, at mekanismen kan aktiveres kunstigt med små, syntetiske, dobbeltstrengede RNA-molekyler (siRNA). Når man indfører siRNA i en celle, sker der en specifik hæmning af udtrykkelsen af et gen med en komplementær sekvens, f.eks. et kræftgen.

siRNA-medieret hæmning af genudtrykkelse har et stort terapeutisk potentiale. I forsøg med cellekulturer er udvalgte gener blevet hæmmet i HIV og poliovirus, og det samme er tilfældet med en række gener, som har betydning for udvikling af kræft. I eksperimenter med mus er det lykkedes at behandle leverbetændelse med siRNA. Metoden er endnu ikke afprøvet på mennesker, men forsøg med at behandle AIDS-ramte børn planlægges nu i USA.

Molekylær mekanisme bag RNAi

Vi har efterhånden en god forståelse af de molekylære mekanismer bag naturlig RNA-interferens: Når der er dobbeltstrengt RNA i cellevæsken, nedbryder et enzym RNA'et til små siRNA-molekyler. siRNA-molekylerne indbygges derpå i et proteinkompleks, der katalyserer en opsnoning til enkeltstrengt siRNA, som efterfølgende guider kom-

plekset hen til budbringer-RNA (mRNA) med en komplementær sekvens. mRNA er en enkeltstrengt kopi af et gen, der indeholder opskriften på det protein, som genet koder for. Under normale omstændigheder aflæses mRNA i cellernes proteinfabrikker, som så producerer proteinet. Det forhindres imidlertid, når mRNA indfanges af proteinkomplekset, som nedbryder budbringeren. På den måde hæmmes udtrykkelsen af det pågældende gen, som f.eks. kan være et gen fra vira som HIV, der udnytter cellens maskineri til at danne sine proteiner.

En tilsvarende proces finder sted, når syntetiske siRNA-molekyler indføres i en celle, og det kan bruges til at hæmme hvilket som helst gen med en komplementær sekvens. siRNA har flere fordele sammenlignet med den beslægtede metode antisense medicin, som typisk består af korte, enkeltstrengede DNA-sekvenser, der neutraliserer mRNA fra udvalgte sygdomsgener. De største fordele er, at siRNA er effektivt i langt lavere koncentrationer, at siRNA er mere stabilt, samt at siRNA har en høj specificitet. Ændring af blot en base i siRNA'et kan reducere aktiviteten dramatisk. Netop den høje specificitet gør siRNA attraktivt som lægemiddel, fordi stoffet forventes at medføre langt færre bivirkninger end konventionel medicinsk behandling.

siRNA har dog også sine begrænsninger; først og fremmest er effekten relativt kortvarig. Derfor er det nødvendigt at udvikle metoder til at forlænge virkningen, hvis siRNA skal blive til lægemidler.

Vej ind i cellen

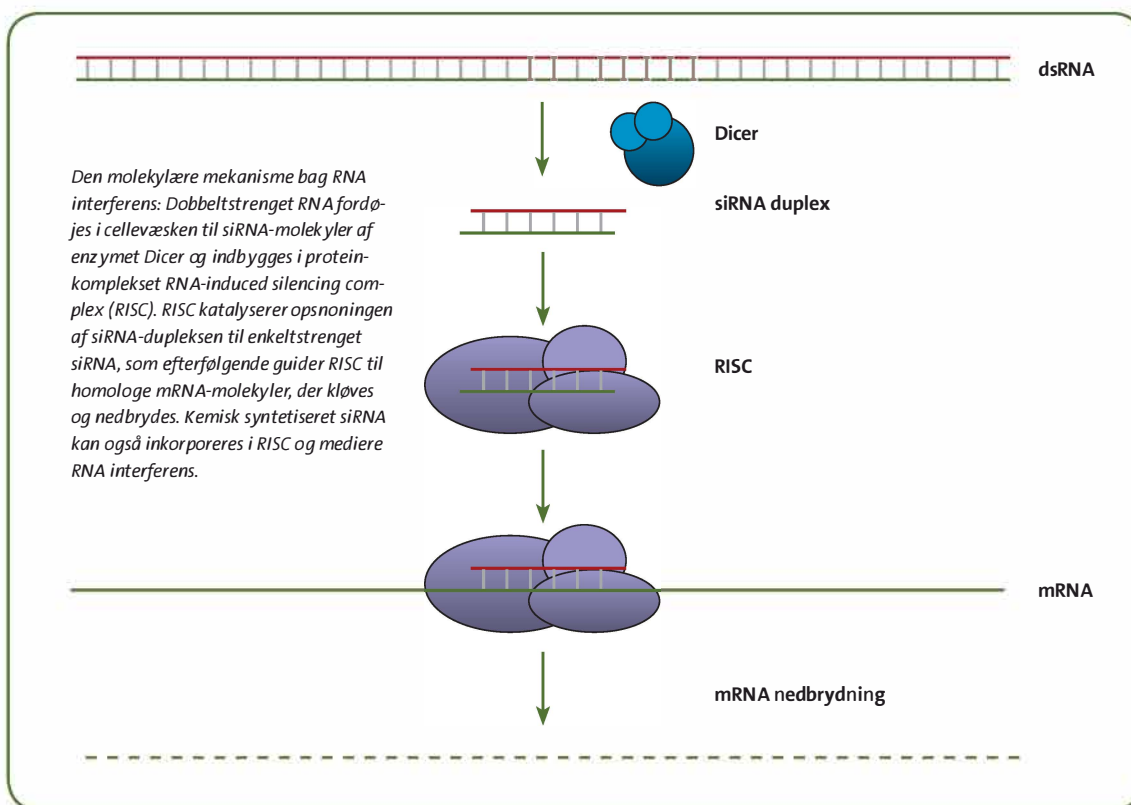
RNA interferens finder kun sted i cellevæsken. For at bruge siRNA til sygdomsbehandling er det derfor nødvendigt, at siRNA transporteres ind gennem målcellernes membraner i tilstrækkeligt høje koncentrationer.

siRNA kan introduceres ind i pattedyrceller på to måder. Kemisk syntetiseret siRNA kan sendes direkte i cellen, eller man kan indføre DNA, som danner siRNA inde i cellen. Til det formål kan man bruge små DNA-ringe, som kaldes plasmider, eller vira. Fra et farmaceutisk synspunkt er kemisk syntetiseret siRNA at foretrække, fordi dosis nøje kan kontrolleres, og fordi man undgår en række bivirkninger og risici, der er forbundet med anvendelse af virus.

Desværre er det svært at få syntetisk siRNA ind gennem cel-

HVAD ER RNA?

RNA er en forkortelse for ribonukleinsyre. RNA er en polymerkæde, der lige som DNA er opbygget af monomerer, der kaldes nukleotider. Nukleotiderne i RNA består af sukkerstoffet ribose, en fosfatgruppe, der forbinder nukleotiderne indbyrdes, samt en base. I RNA findes baserne adenine (A), guanine (G), cytosine (C) og uracil (U). Baserne kan parre indbyrdes – G med C og A med U - og danne dobbeltstrengt struktur. RNA er involveret i aflæsning af information lagret i DNA og medvirker på flere fronter i proteinsyntesen.



Ph.d. Camilla Foged er adjunkt ved Institut for Farmaci.



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



Ph.d. Hanne Mørck Nielsen er lektor ved Institut for Farmaci.

lemembranen. RNA er vandopløselige og negativt ladede makromolekyler, der vanskeligt passerer en fedtholdig cellemembran med en negativt ladet overflade. Når det gælder cellekulturer, findes der dog en del kemiske og fysiske teknikker, som kan løse opgaven. De fysiske metoder anvender tryk, strøm eller ultralyd til at tvinge molekylerne ind i cellen. De kemiske metoder er baseret på positivt ladede molekyler som lipider eller polymerer, der kan kompleksbinde de negativt ladede RNA-molekyler i partikler. Partikler med en positiv nettoladning kan binde til cellemembranen. Derpå kan partiklerne optages via små indsnøringer af cellemembranen ved en proces, der kaldes endocytose.

siRNA-partikler skal frigives fra indsnøringerne til cellevæsken for at have en terapeutisk effekt, og det er tilsyneladende en flaskehals for den nye form for medicin. Især gælder det om at undgå sammensmeltning med organeller i cellen, der kaldes lysosomer, og som nedbryder siRNA. Problemet kan dog sandsynligvis løses ved at koble siRNA sammen med bestemte peptider eller polymerer, som i forsøg har vist en positiv effekt på frigivelsen af siRNA til cellevæsken.

siRNA i forsøgsdyr

Der er efterhånden mange eksempler på effektiv hæmning af udvalgte gener med siRNA i cellekulturer. Men de anvendte fysiske og kemiske metoder til at få siRNA ind i cellerne er dog oftest uegnede til brug i større organismer. Når det gælder dyreforsøg, er det hidtil stort set kun lykkedes at bruge virussystemer og såkaldt hydrodynamisk injektion, hvor siRNA indgives i en vene

sammen med en større mængde væske.

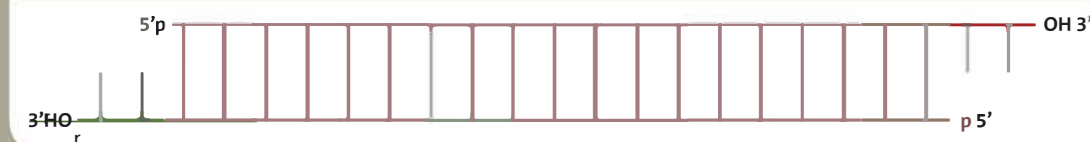
Ved hjælp af disse teknikker er det lykkedes at inducere RNAi i mus, hvilket giver store forhåbninger til anvendelsen af siRNA i mennesker. Virale transportsystemer og hydrodynamisk injektion er dog ikke acceptable til applikation i mennesker. Hvis siRNAs store potentiale som lægemiddel skal udnyttes, er det derfor vigtigt at udvikle klinisk acceptable systemer, som effektivt og helst via blodet kan bringe siRNA hen til målcellerne og ind gennem cellemembranerne.

I biomakromolekylegruppen på Institut for Farmaci arbejder vi på at fremstille og karakterisere transportsystemer til siRNA baseret på lipider og polymerer, der kan målrette siRNA til specifikke celler og væv og sikre opnåelsen af terapeutiske koncentrationer af siRNA i cellevæsken.

Transportsystemerne afprøves både i cellekulturer og i musemodeller, hvor vi undersøger siRNA-effekten, dels på et modelgen og dels på et gen med betydning for udviklingen af leddegigt. Desuden undersøger vi frit siRNA og siRNA-transporters stabilitet i biologisk relevante mediers samt i mus. Undersøgelserne vil forhåbentlig kunne vise, om siRNA i fremtiden kan blive et nyt lægemiddelprincip.

Projektet er en del af en større centerbevilling fra Statens Teknisk Videnskabelige Forskningsråd, der involverer grupper på DFU, Århus Universitet og Utrecht Universitet samt firmaerne Pipeline Biotech A/S og H. Lundbeck A/S. Mere information kan findes på centrets hjemmeside: www.sirna.dk.

HVAD ER siRNA?



siRNA er en forkortelse for små, interfererende RNA-molekyler, der er dobbeltstrengede RNA duplekser. siRNA-molekyler er mest potente, hvis de er 21-23 nukleotider lange, har 2-3 nukleotid 3' overhæng, 5' fosfat og 3' hydroxylgrupper.

Kan peptider hjælpe lægemiddelstoffer ind i cellen?

De fleste lægemidler virker kun, hvis lægemiddelstoffet optages i menneskets celler. Men desværre er optaget ofte utilstrækkeligt, især når lægemiddelstoffet består af store, vandopløselige molekyler som peptider, proteiner, DNA eller RNA. En løsning kan være at bruge membranpenetrerende peptider til at fragte medicinen ind i cellerne.

Af Hanne Mørck Nielsen og Camilla Foged

Biologiske molekyler som peptider, proteiner, DNA og RNA har et stort potentiale til sygdomsbehandling, men ofte er det svært at få lægemiddelstofferne transporteret ind i de celler, hvor medicinen skal virke. Derfor vakte en artikel i det anerkendte tidsskrift Science stor opsigt i 1999. Studiet viste nemlig, at når man gav mus et stort protein sammen med et membranpenetrerende peptid, fandtes proteinet kort tid efter overalt i musens celler. Resultatet var specielt interessant, fordi peptidet ikke så ud til at give bivirkninger eller være giftigt. Siden dengang er der for alvor kommet fokus på muligheden for at anvende membranpenetrerende peptider ved formulering af lægemidler.

Membranpenetrerende peptider er ofte relativt korte sekvenser med 20-30 aminosyrer. De er i stand til at trænge igennem biologiske membraner og i mange tilfælde kan peptidet medtage et andet og større molekyle – f.eks. et lægemiddelstof – uden at medføre toksiske bivirkninger. Det har været svært at kortlægge virkningsmekanismerne, men det ser bestemt ud til, at membranpenetrerende peptider udnytter attraktive principper, som bør undersøges nærmere. Ved en række studier af naturlige og syntetiske peptider har man fundet, at en positiv ladning af

peptidet er vigtig. Desuden ser effekten i nogen grad ud til at være uafhængig af celletypen samt af størrelsen på den last, som peptidet skal bringe ind i cellen.

MAKROMOLEKYLER SOM LÆGEMIDDELSTOFFER

Peptider, proteiner og oligonukleotider er biomakromolekyler; nogle eksempler er væksthormon, insulin og RNA. De to førstnævnte stoffer administreres i dag ved gentagne injektioner, fordi de ikke er stabile nok og ikke optages tilstrækkeligt let i cellerne til at kunne indgives i tabletter. Mulig terapi med f.eks. siRNA er også betinget af, at stoffet optages i cellerne.

Virkningsmekanismen

Uden et membranpenetrerende peptid til at bane vejen optages store, vandopløselige lægemiddelstoffer oftest slet ikke i celler, hvilket normalt gør stofferne virkningsløse. Dog sker optagelse af og til ved endocytose, hvor cellemembranen krænges indad, så lægemiddelstoffet omslutes af en stump af membranen, som derpå afsnøres inde i cellen. Herefter skal lægemiddelstoffet frigives fra indposningen for at udøve en effekt i cellen, hvilket ofte kan være et begrænsende trin.

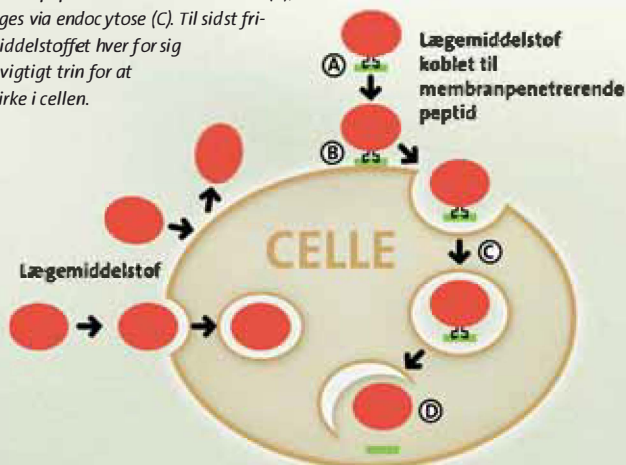
Den seneste model for, hvordan membranpenetrerende peptider frakter lægemiddelstoffer ind i celler, omfatter fire trin:

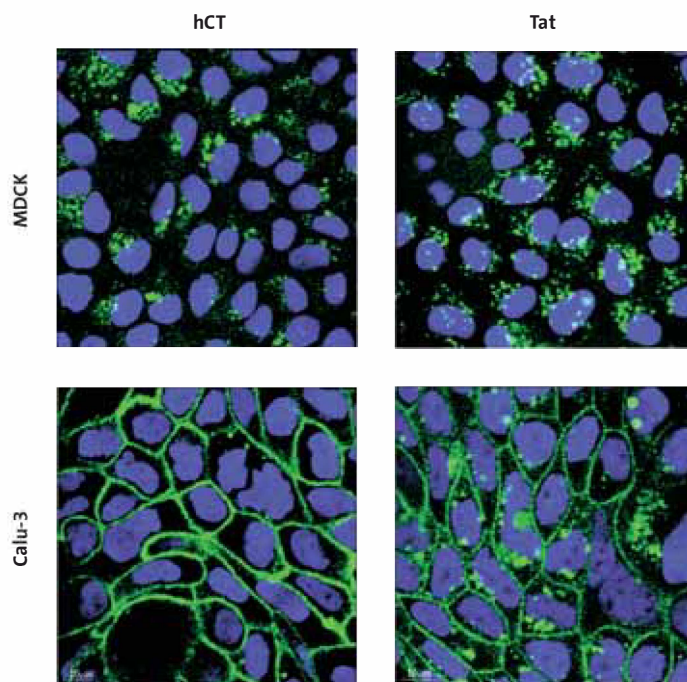
- Peptiderne kobles enten direkte til det biologisk aktive lægemiddelstof ved en kemisk kobling eller associeres ved binding mellem positive og negative ladninger.
- Derpå associerer peptiderne med cellemembranens negativt ladede overflade ved en elektrostatiske binding. Dette understøttes af, at optaget er størst, når peptiderne indeholder mange basiske aminosyrer, dvs. at peptidet er positivt ladet.
- Selve optaget sker ved en hurtig og energiuafhængig mekanisme, der ikke er relateret til tilstedeværelsen af en bestemt receptor. De nyeste resultater indikerer, at de fleste membranpenetrerende peptider - med eller uden et lægemiddelstof - optages via en form for endocytose. Men der er ikke tale om den klassiske form, som medieres via en binding til en receptor i cellemembranen. Dette forklarer til dels, hvorfor effekten af peptiderne ikke synes at være celletypespecifik.
- Til sidst frigives det aktive lægemiddelstof helt eller delvist fra indposningen samt fra de membranpenetrerende peptider, hvilket er afgørende for at opnå den ønskede farmakologiske effekt. Nogle typer peptider påvirker membranen i indposningen og sørger på den måde for fremkalde en frigivelse af lægemiddelstoffet i cellen.

Metoder og modeller

For at forklare mekanismen bag membranpenetrerende peptider og forstå deres effekt er det vigtigt, at man anvender

Store vandopløselige lægemiddelstoffer (røde ovaler) er ofte ude af stand til at trænge ind i celler; i nogle tilfælde sker det dog via endocytose. Optaget kan forbedres (A) ved administration sammen med membranpenetrerende peptid (grønne streger). Først bindes peptidet til cellemembranen (B), hvorpå komplekset optages via endocytose (C). Til sidst frigives peptidet og lægemiddelstoffet hver for sig fra indposningen (D) - et vigtigt trin for at lægemiddelstoffet kan virke i cellen.





Ph.d. Hanne Mørck Nielsen er lektor ved Institut for Farmaci.



Ph.d. Camilla Foged er adjunkt ved Institut for Farmaci.

Konfokalt horisontalt billede i to forskellige celletyper, MDCK og Calu-3, behandlet med to forskellige membranpenetrerende peptider, hCT og Tat. Den blå farve angiver cellekernerne og den grønne farve peptiderne. I MDCK celler lokaliseres begge peptider i afgrænsede punkter nær cellekernen. Billedet er anderledes i Calu-3 celler, hvor hCT primært lokaliseres mellem cellerne, mens Tat lokaliseres både i og udenfor cellerne. Den grønne farve udenfor cellerne kan være enzymatisk nedbrudt peptid. Arbejdet er udført i samarbejde med professor Hans Peter Merkle fra ETH Zürich og Dr. Rachel Tréhin fra ETH Zürich og Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, USA.

relevante modeller. Vi brugte to forskellige cellemodeller og to forskellige peptider til forsøgene.

Det ene peptid er Tat, som også blev benyttet i det banebrydende studie fra 1999, og som er et af de mest lovende og bedst undersøgte membranpenetrerende peptider. Det andet peptid, vi har inkluderet i studierne, er hCT, som er en del af det større peptid calcitonin. De anvendte cellemodeller består begge af et tæt sammenhængende lag af celler, der har været dyrket i laboratoriet i to til tre uger. MDCK-cellerne kommer fra en nyre, mens Calu-3-cellerne har oprindelse i bronkierne. For at visualisere, hvor Tat og hCT lokaliseres i cellerne, er der koblet et grønt fluorescerende stof til peptiderne.

OPRINDELSE AF TAT OG HCT

Tat er et protein fra HIV-1 virus. En del af det funktionelle domæne er isoleret og anvendes som det membranpenetrerende peptid Tat.

Calcitonin er ligeledes naturligt forekommende og bruges som lægemiddelstof i forbindelse med regulering af calciumstofskeft ved Pagets knoglesygdom og osteoporose. hCT består af 75 procent af aminosyrer i calcitonin.

Stabiliteten og strukturen af peptiderne udenfor cellen såvel som i indposningerne inde i cellen har afgørende betydning for succes ved indgift af lægemiddelstoffer.

Perspektiver

Opdagelsen af en række membranpenetrerende peptider har åbnet for nye muligheder i forbindelse med formulering af lægemidler. Der er dog stadig en række udfordringer, som skal undersøges nærmere. Bl.a. er det vigtigt at huske, at lægemiddelstoffet skal frigives for at virke i cellen; det er ikke nok at forøge optaget i cellen.

Derfor bør man supplere med modeller, hvor man måler en farmakologisk effekt og ikke blot konstaterer, om og hvordan membranpenetrerende peptider frakter et lægemiddelstof ind i cellerne. Hvis man ikke kan måle en effekt, er yderligere tiltag nødvendige, f.eks. at stabilisere peptidet, så det ikke mister virkningen efter optag, eller at udbygge peptidet med stoffer, der aktivt sørger for en frigivelse af lægemiddelstoffet i cellen.

På Institut for Farmaci undersøger vi i øjeblikket en række peptider for deres evne til at forøge frigivelse og dermed effekt af korte RNA sekvenser, siRNA, efter optagelse ved endocytose. Vi supplerer med mekanistiske studier for at forklare en eventuel positiv effekt.

CELLEMODELLER

MDCK cellerne (Madin-Darby canine kidney) stammer fra en hundenyre, og ved dyrkning danner de en forholdsvis simpel og velkarakteriseret cellemodel bestående af et enkelt, tæt lag af celler. Calu-3 cellerne stammer fra humane bronkier og udgør ved dyrkning en enkeltlaget cellemodel, med dannelse af mucus og en lang række enzymer, der er kendetegnende for epitel i luftvejene. Calu-3 cellemodellen repræsenterer derfor en model for en relevant administrationsvej.

Tat ser ud til at optages mere effektivt i MDCK celler end hCT. Begge peptider lokaliseres i punkter i cellerne, og det tyder på et optag via endocytose, hvilket vi har verificeret ved andre typer af studier. Men i øjeblikket er det uvist, om peptidet også frigives fra indposningerne. Når man betragter lokaliseringen af peptiderne i Calu-3 cellerne, ser man, at hCT næsten ikke optages, men befinder sig mellem cellerne. Det gælder også i nogen grad for Tat, men her ses der dog noget optag. Ved at tage andre metoder i brug fandt vi, at grunden til de forskellige resultater er en højere koncentration af bestemte enzymer i Calu-3 cellerne end i MDCK cellerne. Vi fandt også, at Tat var mere stabilt overfor disse enzymer end hCT.

Nye metoder til studier af lægemiddelfordeling

Det er ikke nok, at et lægemiddel har den ønskede farmakologiske effekt. Lægemidlet skal også være i stand til at nå frem til virkningsstedet i organismen. Nye, hurtige og effektive metoder til at forudsige fordelingen af lægemiddelstoffer i kroppen er under udvikling.

Af Henrik Jensen, Anne E. Thomsen og Jesper Østergaard

Ved udvikling af nye lægemidler er det vigtigt at have et godt kendskab til, hvordan lægemiddelkandidaterne absorberes af organismen, hvordan de fordeler sig, hvordan de nedbrydes, og hvordan de udskilles af kroppen.

Når et nyt potentielt lægemiddelstof syntetiseres, er det første trin på vejen til et færdigt lægemiddel derfor at fastlægge en række fysisk-kemiske parametre, som har betydning for lægemidlets skæbne i kroppen. Det er langt fra givet, at et lægemiddelstof havner på apotekerens hyld, selvom det er velegnet til at behandle en sygdomstilstand et sted i organismen. Ofte viser det sig nemlig, at være svært at få stoffet transporteret hen til virkningsstedet.

En af de fysisk-kemiske parametre, der har stor betydning for transporten af lægemiddelstoffer i kroppen, er fordelingskoefficienten for stoffet mellem olie og vand. Koefficienten bestemmes som forholdet mellem stoffets koncentration i olie og vand og er et mål for, hvor lipofilt eller hydrofilt lægemiddelstoffet er. Lipofile molekyler befinder sig godt i fedtholdige miljøer og skyer vand, mens det forholder sig lige omvendt med hydrofile molekyler.

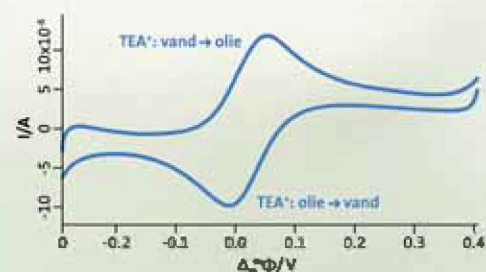
Ud fra fordelingskoefficienten kan man få en idé om, hvor godt et stof optages via mavesækken og tarmene, gennem huden, over cellemembraner eller fra blodbanen ind i hjernen. For eksempel har meget lipofile stoffer ofte svært ved at trænge gennem tarmvæggen, mens hydrofile stoffer kan have problemer med at passere de fedtholdige cellemembraner.

En simpel, men desværre ret tidskrævende metode til bestemmelse af fordelingskoefficienten, er udrystning af lægemiddelkandidaten i et to-fase system, som består af en vandig væske og en olie. I nogle tilfælde kan det også være et problem, at metoden kræver en relativt stor mængde lægemiddelstof, som det kan være kostbart at fremstille. Endelig har metoden begrænsninger, hvis lægemiddelstoffet er stærkt lipofilt eller hydrofilt, da det kan være vanskeligt at kvantificere små stofmængder i den ene fase.

Elektrokemiske studier

I forskningsgruppen for Farmaceutisk Fysisk Kemi ved Institut for Analytisk Kemi arbejder vi i øjeblikket på at udvikle nye, hurtige og effektive teknikker til at forudsige fordelingen af lægemiddelstoffer i kroppen. En af metoderne er baseret på elektrokemiske studier af fordelingen af lægemiddelstoffer mellem to væsker, som ikke er blandbare.

ET MODELEKSPERIMENT

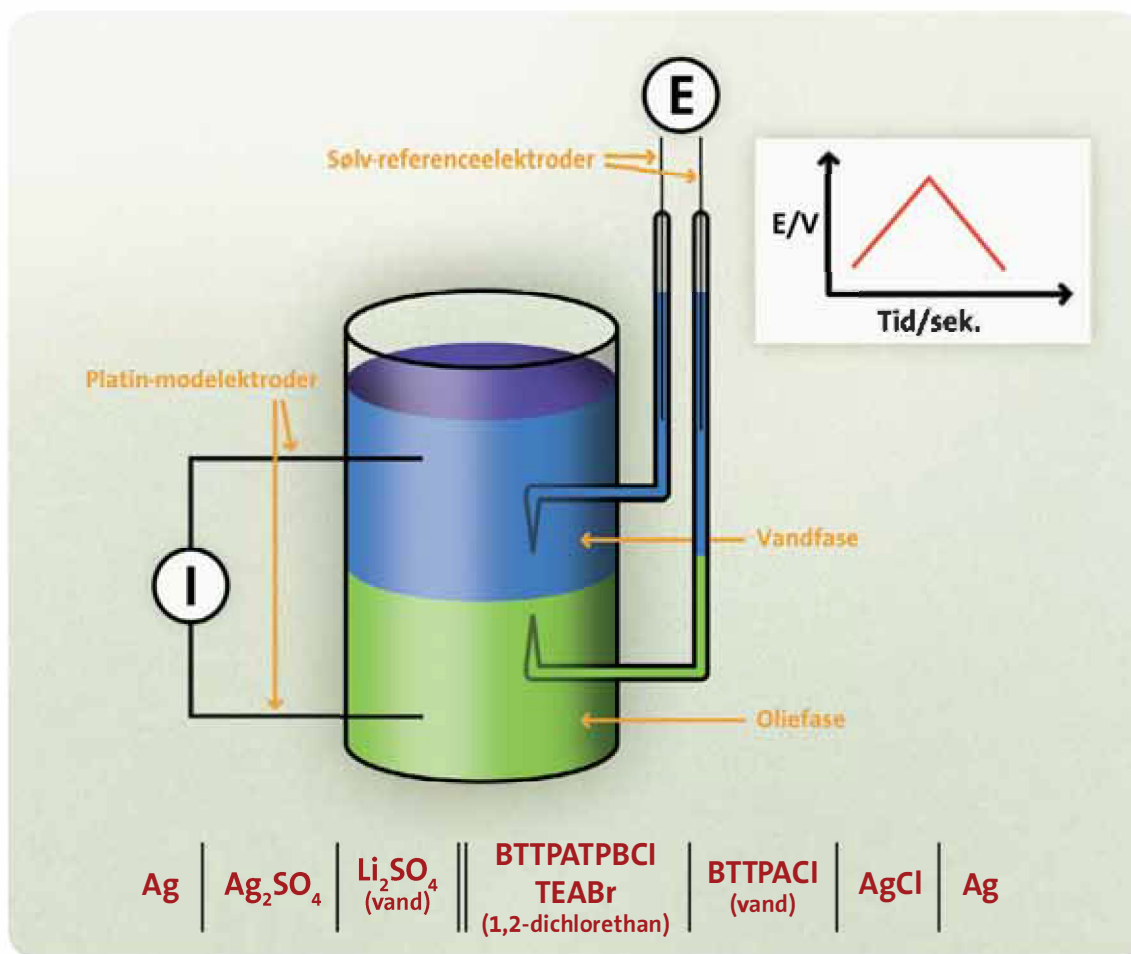


Figuren viser resultatet af et modelforsøg med tetraethylammoniumionen (TEA). I forsøget blev spændingsforskellen mellem vandfasen og oliefasen varieret lineært samtidig med, at strømmen af ladede stoffer mellem de to faser blev målt. Resultatet er et cyklisk voltammogram, fordi spændingsforskellen først blev øget og derpå sænket, inden målingen blev afsluttet ved udgangspotentialiet.

Ved lave spændingsforskelle, som er vist i den venstre side af voltammogrammet, er potentialvinduet begrænset af overførslen af sulfationer fra den vandige opløsning til olien. I midten af vinduet ses signalet fra TEA, der overføres fra vand til olie ved 20 mV, som er et gennemsnit af de to toppotentialer. Ved højere spændingsforskelle overføres TEA ionen spontant fra vand til olie.

Ved spændingsforskelle på over 400 mV overføres lithiumioner fra støtteelektrolytten fra vand til olie, hvilket begrænser mulighederne for at anvende teknikken i dette område. På vejen tilbage til udgangspotentialet ses først overførslen af lithiumionen fra olie til vand, dernæst overførslen af tetraethylammoniumionen fra olie til vand og endelig signalet fra sulfationen, der føres tilbage til vandfasen tæt ved udgangspotentialiet. Det præcise spændingsniveau for overførslen af TEA er direkte relateret til ionens fordelingskoefficient. For det konkrete system svarer det målte overførselspotential på 20 mV til en fordelingskoefficient på 0.46, hvilket betyder, at TEA er relativt hydrofil. Havde koefficienten været større end 1 ville TEA være blevet placeret i gruppen af lipofile stoffer.

Eksemplet repræsenterer en simpel ladningsoverførsel mellem to ikke blandbare væsker, men ofte vil signalet være påvirket af syre-base ligevægte af lægemiddelkandidaten i vandfasen eller f.eks. kompleksbinding af lægemiddelkandidaten med molekyler i oliefasen. Teknikken kan derfor også bruges til at bestemme lægemiddelkandidatens syrestyrke og binding til andre molekyler. Det er således muligt at opnå vigtig information om flere afgørende fysisk-kemiske parametre for udviklingen af nye lægemidler med den samme eksperimentelle teknik.



En elektrokemisk celle til cyklisk voltammetri. Elektroderne er forbundet til en computerstyret potentiostat, som kontrollerer spændingsforskellen mellem referenceelektroderne, E, og som måler den elektriske strøm gennem modelelektroderne, I. Potentialet varieres lineært over tid, hvilket er vist i den indsatte graf. Nederst ses et cellediagram, som angiver indholdet af de forskellige faser og referenceelektroderne beskaffenhed. Støtteelektrolytten i oliefasen er det lipofile salt bis(triphenyl)phosphoranylidendammonium tetrakis(4-chlorphenyl)borat.

Til studierne bruger vi en elektrokemisk celle, som øverst indeholder en vandig opløsning og nederst en olie. Ved hjælp af en elektrode i vandet og en anden i olien skabes der en regulerbar spændingsforskel mellem de to faser, som får elektrisk ladede lægemiddelstoffer til at bevæge sig mellem dem. Strømmen måles med to andre elektroder.

Generelt gælder det, at positivt ladede lipofile ioner overføres fra vand til olie ved lave spændingsforskelle, mens positivt ladede hydrofile ioner overføres ved høje spændingsforskelle. For negative ioner forholder det sig omvendt. Ved analysen bestemmes strømmen af ioner mellem olien og vandet. Signalets beliggenhed afhænger af ionernes tendens til at fordele sig mellem vand og olie samt af deres ladning.

Videreudvikling

For visse stoffer indikerer de elektrokemiske målinger i virkeligheden, at cellen snarere bør betragtes som et tre-fase system, fordi mange kemiske forbindelser vekselvirker kraftigt med grænsefladen mellem vand og olie. Derfor er det ofte nærliggende at betragte grænsefladen som en fase i sig selv. Netop vekselvirkningen med grænsefladen har særlig biologisk relevans, da grænsefladen mellem vand og olie kan bruges som en model for f.eks. cellemembraner.

Vekselvirkningen med grænsefladen kan studeres med en særlig elektrokemisk teknik, hvor man anvender et oscillerende elektrisk felt. Strømsignalet vil svinge med en tilsvarende fre-

kvens. Det elektrokemiske udstyr er indrettet således, at det er muligt at frasortere alle andre strømsignaler end netop dem med samme frekvens som det elektriske felt. Det betyder, at signalstøjforholdet bliver dramatisk forbedret, hvilket gør det muligt at undersøge biomolekyler og lægemiddelstoffers vekselvirkninger med grænsefladen. For eksempel kan man se, om stofferne binder sig til grænsefladen, hvilket kan have betydning for deres farmakologiske effekt. Desuden hænger bindingen til grænsefladen af specielt proteiner ofte nøje sammen med proteinets stabilitet, som er en afgørende parameter i udviklingen af proteinbaserede lægemidler.

I øjeblikket bruger vi en relativt stor elektrokemisk celle, der kræver mellem 1 og 2 ml olie og vand. Et af vore mål er at udvikle et miniaturiseret system, som kan arbejde med mindre prøver og dermed mindre mængder af lægemiddelstof. Desuden arbejder vi med at koble yderligere analysetrin med teknikken.

Små og alsidige analysesystemer er specielt relevante ved analyser af store biologiske molekyler som proteiner, der ofte kun er til rådighed i meget små mængder eller i blandinger med andre stoffer. I den farmaceutiske industri er der desuden et stadigt stigende behov for at kunne analysere mange nye lægemiddelkandidater på kort tid. Et miniaturiseret analysesystem vil være i stand til at udføre en sådan opgave meretilfredsstillende. I sidste ende vil det betyde, at udviklingsprocessen for nye lægemidler bliver væsentlig kortere end i dag.



Ph.d. Henrik Jensen er adjunkt ved Institut for Analytisk Kemi.



Ph.d. Anne E. Thomsen er adjunkt ved Institut for Analytisk Kemi.



Ph.d. Jesper Østergaard er adjunkt ved Institut for Analytisk Kemi.

Erstatning af radioaktivitetsmåling i lægemiddeludvikling

I den tidlige fase af lægemiddeludvikling skal lægemidlets optagelse, fordeling, omdannelse og udskillelse undersøges. Normalt mærkes lægemiddelstoffet med en radioaktiv isotop, hvorpå stoffet og dets omdannelsesprodukter kan genfindes i urin og fæces efter indgivelse til f.eks. mus eller rotter. Metoden er både kostbar og tidskrævende. ICP-MS er et muligt alternativ som detektionsmetode.

Af Berit Packert Jensen, Bente Gammelgaard, Steen Honoré Hansen og Jan Vanggaard Andersen

Ved udvikling af nye lægemidler skal det dokumenteres, hvordan lægemidlet omdannes i kroppen. Omdannelsesprodukterne – metabolitterne – kan have samme virkning som det oprindelige lægemiddelstof, være virkningsløse eller være giftige. Derfor skal såvel identiteten som mængden af de individuelle metabolitter bestemmes tidligt i udviklingsprocessen, så man ikke på et senere tidspunkt bliver overrasket af manglende effekt eller af bivirkninger, der kunne have været forudset.

En meget anvendt metode er at mærke lægemiddelstoffet radiokemisk. Her udskiftes et af atomerne i stoffet med en radioaktiv isotop. Derefter indgives det mærkede lægemiddelstof til mus eller rotter, og urin og fæces opsamles løbende over en periode på nogle døgn. Næste trin er at måle den totale mængde af radioaktivitet i de opsamlede prøver og beregne, hvor stor en del af det indgivne lægemiddelstof, der er blevet udskilt. På den måde får man et mål for, om lægemiddelstoffet opho-

RADIOKEMISK DETEKTION

Lægemiddelstoffet mærkes med radioaktive isotoper som supertung brint, tritium (^3H) eller kulstof-14 (^{14}C), som udsender elektroner. Prøven blandes med en scintillationsvæske, som indeholder molekyler, der udsender lys, når de anslås af elektronerne. Antallet af radioaktive henfald frembringer en mængde lys, som er proportional med mængden af det radioaktivt mærkede stof.

bes i kroppen. Den radioaktive mærkning er dog både kostbar og tidskrævende.

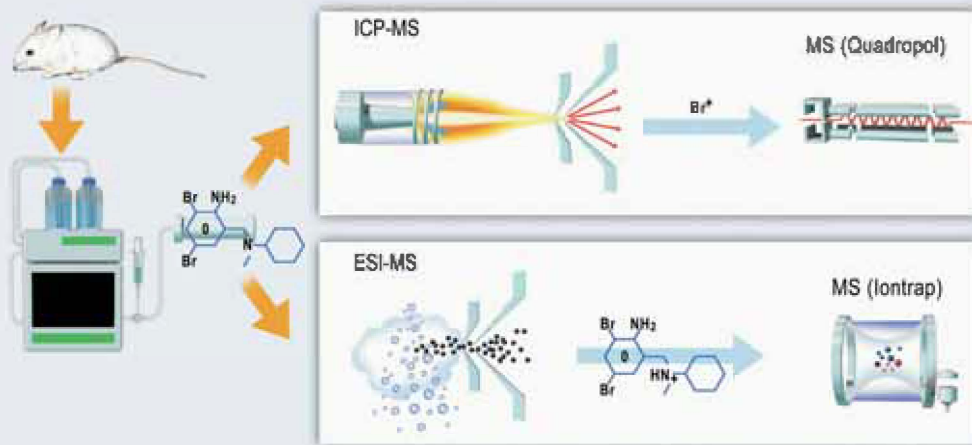
Den radiokemiske detektor kan kobles til en kromatografisk separationsmetode (HPLC), hvor de enkelte metabolitter separeres fra det oprindelige lægemiddelstof og fra de naturligt forekommende forbindelser, der er til stede i urin. Det resulterende kromatogram viser, hvor mange forskellige metabolitter, der dannes, og hvor store mængder prøverne indeholder af den enkelte metabolit. Metoden giver ingen oplysninger om identiteten af metabolitterne. En ulempe ved teknikken er, at den del af molekylet, der indeholder den radioaktive mærkning, kan falde af under metaboliseringen, hvorved den pågældende metabolit ikke opda-

Identitet og mængde af metabolitter

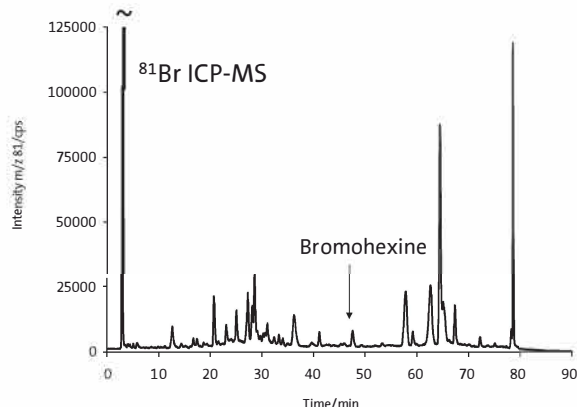
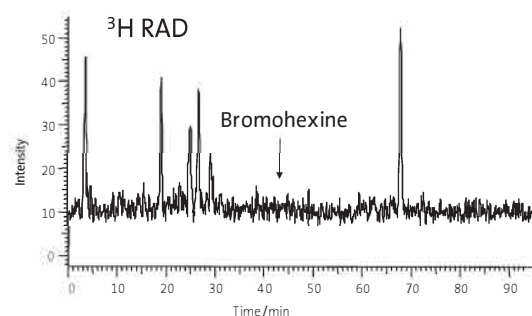
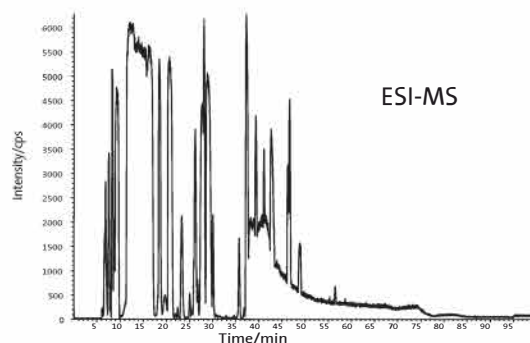
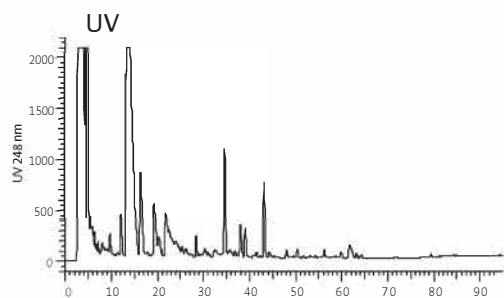
Identiteten af metabolitterne bestemmes oftest ved kobling af HPLC med en kombination af UV-spektrofotometri og elektro-spray ioniserings massespektrometri, ESI-MS samt MS/MS (tandem-massespektrometri).

Ulempen ved begge detektionsmetoder er, at signalet er afhængigt af strukturen af det molekyle, der måles på. Ved metaboliseringen af lægemiddelstoffet kan det ske, at den struktur, der giver anledning til UV-absorbansen, ændres. Samtidig kan metabolittens evne til at lade sig ionisere blive forandret, så den enten ioniseres meget lettere eller eventuelt slet ikke ioniseres. Ionisering er en forudsætning for, at man kan bruge massespektrometri til at identificere metabolitterne.

For at opnå pålidelige bestemmelser af mængden af metabolitterne kan man derfor ikke nøjes med at sammenligne med signalet fra en standard af lægemiddelstoffet – det er nødvendigt at have standarder af alle metabolitterne, og det har man



Opstilling, hvor udløbet fra HPLC-separationen deles mellem en ICP-MS detektor og en ESI-MS detektor. Ved denne opstilling kan identiteten af den enkelte metabolit bestemmes ved ESI-MS samtidig med at mængden bestemmes ved ICP-MS.



Kromatogrammer af en urinprøve fra en rotte opsamlet det første døgn efter indgivelsen af tritiummærket bromhexin, detekteret med de forskellige detektionsmetoder. ICP-MS signalet viser alle de forbindelser, der indeholder brom, mens det radiokemiske signal viser alle de forbindelser, der indeholder tritium, ^3H . De to uspecifikke teknikker, UV-spektrofotometri og ESI-MS, viser en skov af signaler, som ikke nødvendigvis indeholder hverken ^3H eller brom. Det høje signal ved 80 minutter, som ses i ICP-MS detektionen, optræder ikke i nogen af de andre kromatogrammer – her er altså en bromholdig metabolit, som har tabt sin radioaktive mærkning, og som ikke ville være blevet opdaget med de øvrige teknikker. Metabolitten ved 65 minutter ses både radiokemisk og ved ICP-MS detektion, men ikke ved de andre metoder. Ved sammenligning af den radiokemiske detektion og ICP-MS detektionen ses desuden, at støjen på basislinjen er meget mindre ved ICP-MS teknikken. Det betyder, at der kan måles ca. 100 gange lavere koncentrationer med denne teknik.

UV-SPEKTROFOTOMETRI

De fleste stoffer absorberer lys i UV-området. Molekylet bestråles med lys af en given bølgelængde, og absorbansen er et mål for, hvor stor en del af det indsendte lys molekylet har absorberet. Absorbansen er afhængig af molekylets struktur og direkte proportional med koncentrationen. Metoden er uspecifik, da mange stoffer absorberer ved samme bølgelængde.

ESI-MS

ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry. Ved ioniseringen tilføres eller fjernes en proton fra det neutrale lægemiddelstof og de neutrale metabolitter. Herved dannes der molekyllære ioner, hvis masse-ladningsforhold kan detekteres i massespektrometret. Da ionen har samme masse som det oprindelige stof ± 1 , giver målingen oplysning om molekylets vægt og ved efterfølgende eksperimenter, hvor molekyllationen slås i mindre stykker (tandem-massespektrometri), kan strukturen ofte udledes.

meget sjældent på et tidligt tidspunkt af lægemiddeludviklingen.

ICP-MS – et alternativ

Ved anvendelse af ICP-MS kan én enkelt standard anvendes til at kvantisere alle de ukendte metabolitter, fordi signalet ved denne detektionsteknik er uafhængigt af molekylets struktur. Det skyldes, at alle de separerede forbindelser afbrændes under ioniseringen og kun de atomare ioner af de oprindelige stoffer tælles i detektoren. Dette kræver imidlertid, at lægemiddelstof-

fet indeholder et grundstof, som kan måles ved denne teknik, som primært er udviklet til bestemmelse af metaller. Alle metalholdige forbindelser kan måles, men også klor, brom, jod, fosfor og svovl, som en del lægemidler indeholder, kan detekteres.

Metabolisk profilering

Vi har sammenlignet ICP-MS teknikken med de øvrige teknikker til metabolisk profilering på lægemidlet bromhexin – et velkendt hostestillende middel, som danner et stort antal metabolitter.

ICP-MS signalet viser alle bromholdige forbindelser, som er adskilt ved HPLC. Blandt andet finder vi et højt signal efter 80 minutter, som ikke ses i nogen af de andre kromatogrammer – her er altså en bromholdig metabolit, som har tabt sin radioaktive mærkning, og som ikke ville være blevet opdaget med de øvrige teknikker. Sammenligning af den radiokemiske måling og ICP-MS detektionen viser desuden, at ICP-MS teknikken kan påvise ca. 100 gange lavere koncentrationer end den radiokemiske måling. ICP-MS teknikken kan derfor være et alternativ eller et væsentligt supplement til de øvrige metoder ved metabolisk profilering.

ICP-MS

Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Prøven indføres i et argonplasma med en temperatur på ca. 8000 grader Kelvin, hvor den atomiseres og ioniseres til atomare ioner inden detektionen i massespektrometret. Signalet er derfor helt uafhængigt af strukturen af molekylet, men giver heller ikke oplysning om strukturen. Teknikken er elementspecifik, så man måler kun på ét grundstof ad gangen, mens resten af ionerne i prøven ikke ses i den pågældende måling. Dette gør signalet simpelt sammenlignet med ESI-MS.



Cand.pharm. Berit Packert Jensen er ph.d.-studerende ved Institut for Analytisk Kemi.



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



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



Ph.d. Jan Vanggaard Andersen er specialkemiker ved Novo Nordisk A/S.

Computeren kan forudsige lægemidlers omdannelse

Mange lægemidler omdannes og nedbrydes i bl.a. leveren af cytochrome P450-enzymmer. Computerbaserede studier af enzymernes tredimensionelle strukturer kan lede til en bedre forståelse af lægemidlers skæbne i organismen.

Af Lars Olsen, Rikke Bergmann og Flemming Steen Jørgensen

Mange lægemidler nedbrydes – metaboliseres – i leveren af en familie af enzymer, der kaldes cytochrome P450 (CYP). Omdannelsen er en del af en proces, der har til formål at uskadeliggøre fremmede stoffer i kroppen ved at gøre dem mere vandopløselige, så de bedre kan udskilles med urinen.

Processen kan være problematisk for lægemiddelstoffer, fordi de risikerer at blive omdannet, inden de når frem til virkningsstedet i kroppen. I enkelte tilfælde er omdannelsesproduktet farmakologisk virksomt, men i mange tilfælde er det inaktivt,

og i værste fald er omdannelsesproduktet giftigt. F.eks. er et af CYP-enzymerne ansvarlig for, at det smertestillende lægemiddelstof paracetamol omdannes til en giftig forbindelse i leveren. Omvendt sørger et andet CYP-enzym for, at lægemidlet codein delvist omdannes til morfin, som er det egentlig virksomme stof. Derfor er det utrolig vigtigt at vide, hvordan CYP-enzymerne omdanner lægemiddelstoffer.

3D-strukturer

Kendskab til 3D-strukturen af CYP-enzymerne er et vigtigt skridt på vejen mod at kunne forudsige, om en mulig lægemiddelkandidat vil blive omdannet af enzymet. Ud fra form og aminosyreopbygning af den reaktive del af enzymet vil det i bedste fald være muligt at forudsige, hvilken type stoffer der vil kunne binde hertil. Dermed vil udviklingen af lægemiddelstoffer kunne optimeres, så de opnår de ønskede metaboliske egenskaber.

Hidtil er kun få 3D-strukturer af de humane CYP-enzymet blevet bestemt eksperimentelt. Blandt de strukturer, der er publiceret til dato, er der en klar strukturel lighed på trods af, at aminosyresekvensen i mange tilfælde er ret forskellig. Vi har derfor ved hjælp af computerbaserede metoder kunnet konstruere 3D-modeller af ukendte CYP-strukturer på baggrund af de kendte strukturer. Disse homologimodeller kan undersøges på samme måde som eksperimentelt bestemte enzymstrukturer.

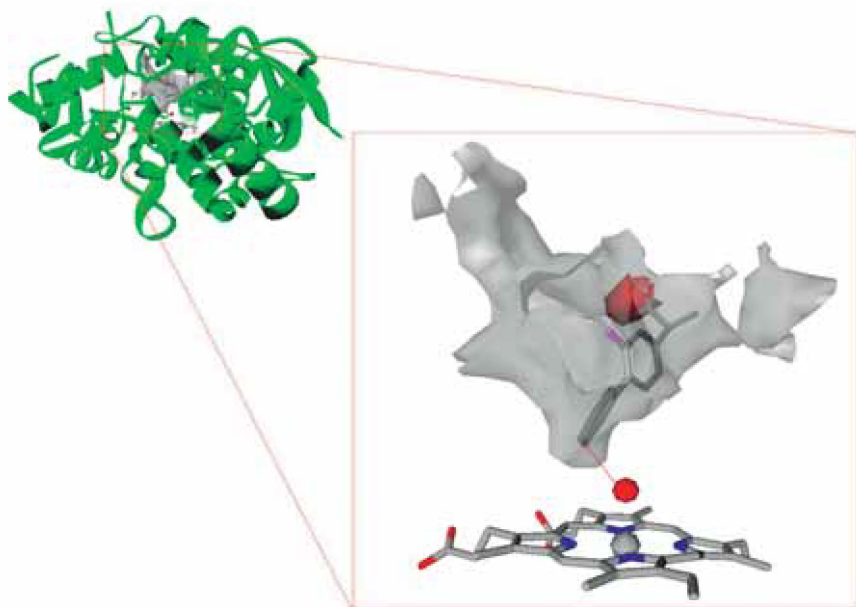
En af de store fordele ved at bruge 3D-strukturer af CYP-enzymet er, at det er muligt at teste hypoteser om omdannelsen af lægemiddelstoffer på computeren, før tidskrævende og kostbare eksperimentelle forsøg sættes i gang.

I bindingslommen

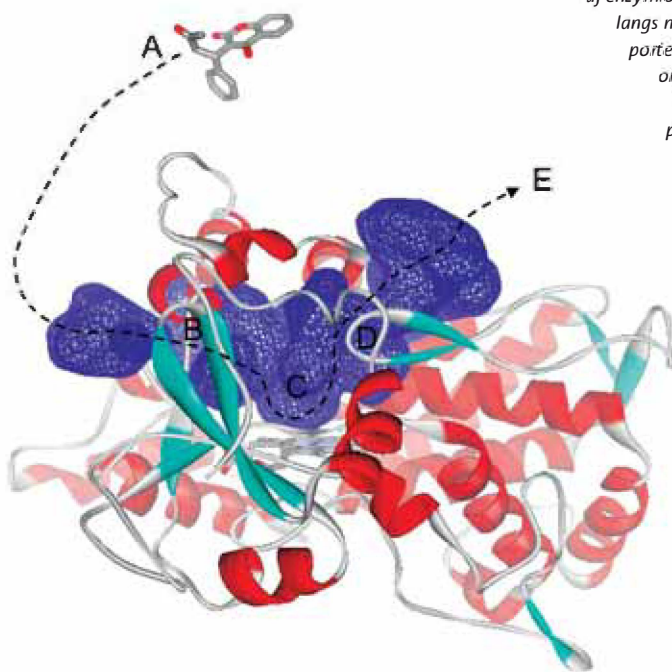
Lægemiddelstoffet skal genkendes af CYP-enzymet for at kunne blive bundet og omdannet. Faconen og andre egenskaber inde i bindingslommen er bestemmende for, hvilke lægemiddelstoffer, der kan binde, samt hvordan og hvor godt de binder. F.eks. vil det kræve en stor bindingslomme at binde et stort lægemiddelstof, og indeholder stoffet en negativt ladet gruppe, vil det som regel kræve, at en del af lommen er en positivt ladet. Man kan tale om komplementaritet mellem lægemiddelstoffet og bindingslommen.

Ved hjælp af computerbaserede metoder har vi kortlagt områder inde i enzymlommen, der er favorable eller ufavorable for forskellige kemiske grupper i et lægemiddelstof. Informationen om disse områder har vi behandlet statistisk og bestemt, hvilke vekselvirkninger mellem lægemiddelstof og enzym, der er unikke for hver enkelt af de undersøgte CYP-enzymet. På den måde kan man undersøge, hvilke typer af stoffer, der binder til og eventuelt nedbrydes af det enkelte CYP-enzym.

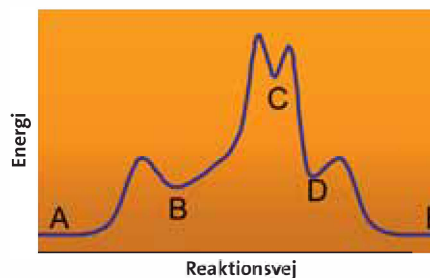
Selve bindingen af lægemidlet i enzymlommen kan også testes på computeren, hvor metoderne i de seneste år har gennemgået en rivende udvikling. Man kan ikke blot undersøge, hvor godt lægemiddelstoffet binder, men også hvad enzymet vil kunne omdanne det til.



Kortlægning af favorable og ufavorable områder inde i CYP-enzymets bindingslomme. Øverst til venstre ses hele CYP-enzymet. Til højre ses et forstørret udsnit af bindingslommen, der er vist som grå overflade. Det røde område i bindingslommen viser et positivt ladet område, hvor negativt ladede grupper i et lægemiddel kan binde. I bindingslommen er også vist en analog af det smertestillende lægemiddel ibuprofen, som nedbrydes ved binding til dette enzym. Lægemiddelstoffet indeholder en negativt ladet carboxylatgruppe, der binder i det positive område af bindingslommen. Fenylingen i lægemiddelstoffet binder til et iltatom i bindingslommen (markeret med en stiplet linie), hvilket viser, at CYP-enzymet kan hydroxylere fenygruppen i denne position.



Molekylærdynamiske metoder kan følge lægemiddelstoffet på vej ind og ud af enzymloommen, hvor omdannelsen sker. Man fremstiller en energiprofil langs med lægemiddelstoffets rute og ser, hvor energikrævende transporten er. Indtil nu har vi undersøgt halvdelen af vejen ind til reaktionscenteret ved C, og analyserne giver en energiprofil langs med lægemiddelstoffets vej. Dette vil vise, hvor meget energi transporten kræver. Selve omdannelsesprocessen ved C studeres med kvantemekaniske metoder. Arbejdet udføres i samarbejde med Patrik Rydberg, Thomas H. Rod og Ulf Ryde på Lunds Universitet, hvor alle beregninger er udført. Beregningerne er meget tidskrævende og har hidtil taget, hvad der svarer til to års nonstop arbejde for en enkelt moderne PC, men udføres i praksis på et cluster af mange PC'er



Ph.d. Lars Olsen er adjunkt ved Institut for Medicinalkemi.



Cand.pharm. Rikke Bergmann er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi.



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

Ind og ud af enzymet

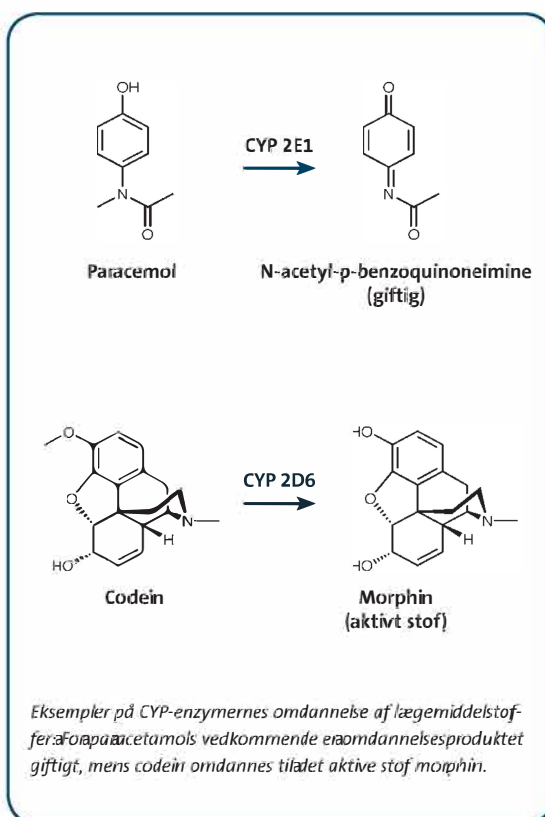
En ting er kompleksiteten mellem lægemidlet og bindingsloommen, men lægemiddelstoffet skal også kunne transporteres ind i loommen og det omdannede produkt ud igen. Hvis lægemiddelstoffet ikke kan komme ind til det reaktive center i enzymet, omdannes det ikke. Ligeledes vil stoffet optage plads inde i enzymloommen og dermed hæmme CYP-enzymets evne til at omdanne andre lægemidler, hvis ikke det kan transporteres ud igen.

Via anvender molekylærdynamiske metoder til at undersøge, hvor energikrævende transporten ind og ud af bindingsloommen er. Selv med nutidens hurtige computere er sådanne undersøgelser meget tidskrævende.

Større fokus i fremtiden

I de senere år er der kommet meget fokus på kroppens evne til at omdanne lægemidler. Det skyldes blandt andet, at de fleste af de nye lægemidler, som er blevet trukket tilbage fra markedet umiddelbart efter deres lancering, netop er trukket tilbage på grund af uacceptable metaboliske egenskaber. Der er altså penge at spare for lægemiddelindustrien og i yderste konsekvens kan en uheldig omdannelse af et lægemiddel koste menneskeliv.

Et andet aspekt er, at mennesker danner forskellige mængder af de forskellige metaboliserende enzymer. Som nævnt tidligere er det et bestemt enzym i CYP-familien, som står for omdannelsen af codein til morfin, men nogle mennesker har ikke dette enzym, og de personer vil derfor ikke opleve den ønskede virkning af codein. Derfor vil der formentlig blive tale om mere individuel medicinering i fremtiden, bl.a. med udgangspunkt i individuelle forskelle i mængden af de forskellige CYP-enzymers.

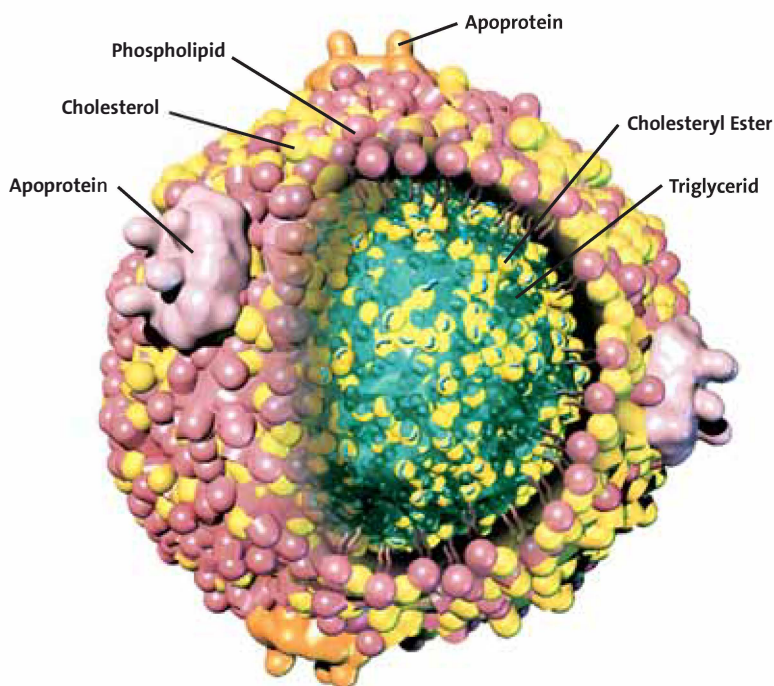


Lymfesystemet kan transportere tungopløselige lægemiddelstoffer

Tungtopløselige, lipofile lægemiddelstoffer har ofte svært ved at blive absorberet og transporteret fra tarmen og hen til virkningsstedet i kroppen. En mulig løsning er at formulere stofferne, så transporten via lymfesystemet øges.

Af Ditte Maria Karpf, Jette Jacobsen, René Holm og Anette Müllertz

Omkring 40 procent af alle de lægemiddelstoffer, som er registreret i den Europæiske Pharmacopée, er tungtopløselige i vand. Stofferne udviser ofte en lav og variabel biotilgængelighed, fordi de kun langsomt opløses i maven og tarmen eller har en lav opløselighed i tarmvæskerne. I de senere år har introduktionen af teknikker som kombinatorisk kemi og hurtig screening af store stofbiblioteker accelereret antallet af tungtopløselige lægemiddelstoffer, som ofte er meget potente. For at få gavn af stofferne er det nødvendigt at udvikle metoder til at få dem transporteret hen til virkningsstedet i kroppen.



Chylomikron. Yderst ses skallen, bestående af phospholipider (pink), kolesterol (gul) og apoproteiner (lys pink). Inderst kerne, der indeholder triglycerider (grøn) og kolesterol estre (gule med blå "hale"). Tungtopløselige lægemiddelstoffer vil finde sig i kernen.

I mange tilfælde er tungtopløselige lægemiddelstoffers optagelse i organismen afhængig af tilstedeværelsen af føde, især fedtstof (lipid) fra føden, og biotilgængeligheden er højere lige efter et måltid. Det skyldes en længere opholdstid i tarmen og især udskillelsen af fordøjelsesvæsker i tolvfingertarmen. Bugspytkirtlen udskiller enzymer, der spalter lipider, bl.a. triglycerider, fra føden. Galdesalte og fosfolipider udskilles via galden og danner miceller. Triglyceriderne nedbrydes til frie fedtsyrer og monoglycerider, der inkorporeres i micellerne. Processerne fremmer opløsningen af tungtopløselige lægemiddelstoffer, som føres gennem det uomrørte vandlag til tyndtarmsepitelet og transporteres ind i tarmcellerne.

Via lymfesystemet til blodet

Fra tarmcellen kan et stof transporteres ind i blodkredsløbet ad to veje; enten direkte eller indirekte via lymfesystemet. En betydelig del af de lipofile lægemiddelstoffer transporteres via lymfesystemet, hvilket er særligt interessant, fordi stofferne herved undgår den første passage gennem leveren, hvor de kan blive omdannet eller nedbrudt. På den måde opnår lægemiddelstoffet en højere og mindre variabel biotilgængelighed og får dermed en bedre effekt.

Et stofs fysiske-kemiske egenskaber bestemmer, hvorvidt det transporteres via lymfen eller sendes direkte ud i blodet fra tarmcellerne. Når det gælder fedtopløselige næringsstoffer som triglycerider, kolesterol og bestemte vitaminer, inkorporeres de i lipoproteiner. Lipoproteinerne dannes i tarmcellerne og transporteres ud i blodet via lymfesystemet. Lipoproteiner består af en hydrofob kerne af lipider og en hydrofil overflade, som er opbygget af proteiner og polære grupper fra f.eks. fosfolipider.

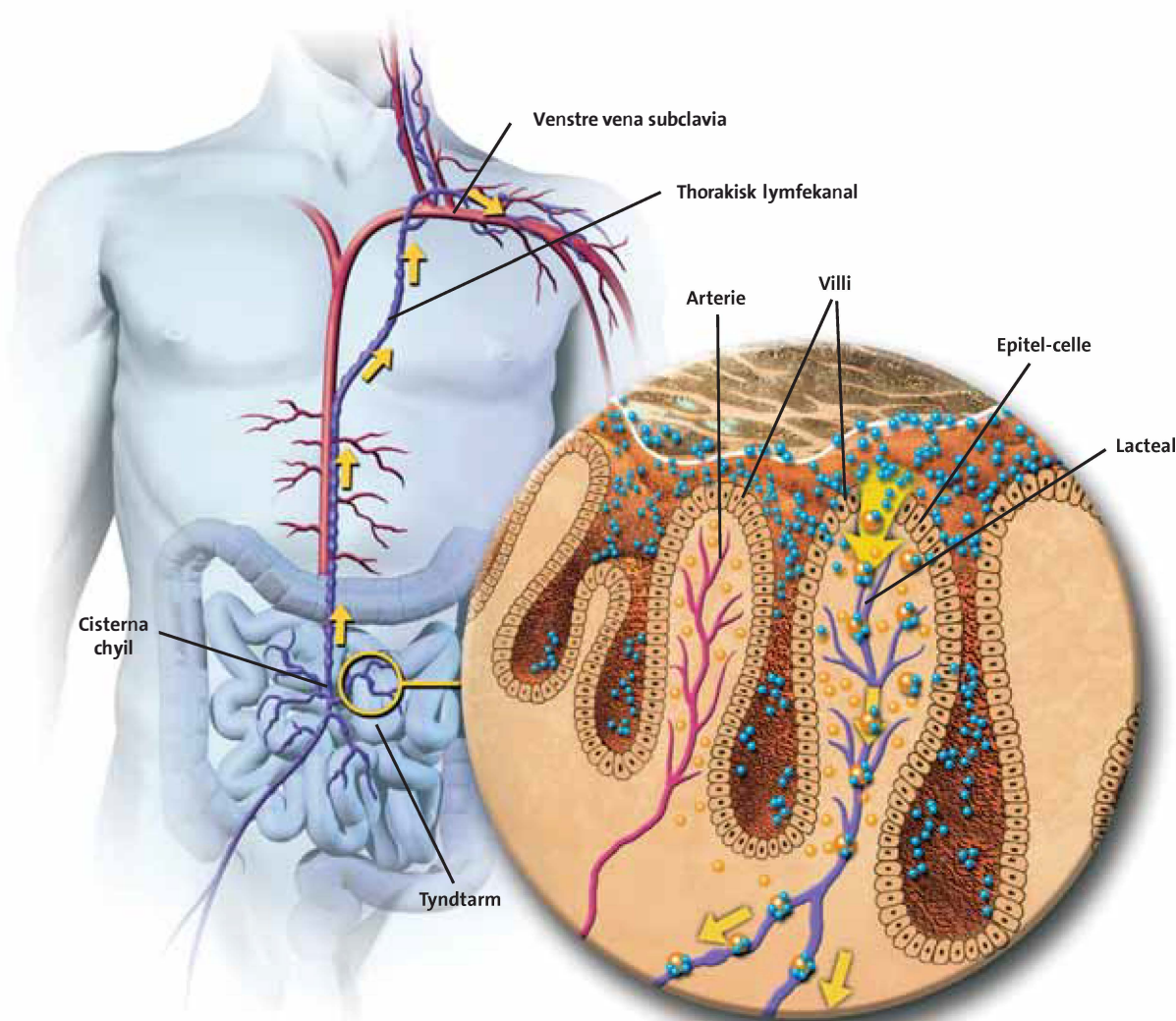
Meget lipofile lægemiddelstoffer, der foretrækker at befinde sig i et fedtholdigt miljø frem for i vand, transporteres med stor sandsynlighed sammen med fedtstofferne fra føden og sendes ud i blodkredsløbet via det lymfatiske system.

Tilstedeværelsen af fedtstoffer fra en lipidbaseret formulering kan øge den lymfatiske transport af et lægemiddelstof. Imidlertid vides der ikke meget om, hvilke lipider der har den største effekt på transporten via lymfesystemet.

Forsøg i cellekulturer

Indtil nu er der primært blevet brugt dyremodeller til studier af den lymfatiske transport. I dyreforsøg er det nødvendigt at lægge et kateter ind i lymfegangen, og denne form for mikrokirurgi er meget tidskrævende og har en lav succesrate, selv for øvede kirurger. Desuden er det ikke muligt at bruge dyremodeller til at undersøge de mekanismer, der ligger bag den lymfatiske transport.

Derfor er det interessant at etablere en model baseret på en cellekultur, så man kan estimere omfanget af den lymfatiske transport af et givet lipofilt lægemiddelstof i dyr og mennesker, til at supplere dyremodellerne. Modellen kan også anvendes til at undersøge effekten af farmaceutiske hjælpesoffer som over-



Lymfatisk transport: Fra tarmvæggen (indsat) til blodet. De gule pile viser stoffets vej fra tarmlumen, gennem tarmcellen til lymfekanalerne i tarmen. Derfra dirigeres lymfen gennem cisterna chyli til den thorakiske lymfekanal og drænes ud i blodet ved den venstre jugulære vene. Herved undgås første passage metabolisme i leveren.

fladeaktive stoffer, og endelig opnår man at reducere antallet af forsøgsdyr i forskningen.

Caco-2 cellekulturen er i stand til at producere lipoproteiner og er derfor ofte anvendt til at undersøge omsætningen af lipider i tarmceller, ligesom den også bruges til at undersøge aktivtransport af hydrofile lægemiddelstoffer. Imidlertid er der ikke meget viden om anvendeligheden af Caco-2 celler til undersøgelse af transport af tungtopløselige lægemiddelstoffer.

Det er ofte problematisk at præsentere cellerne for tungtopløselige stoffer, fordi de ikke opløses i de medier, der normalt anvendes til transportforsøg. Derfor opløses stofferne i biorelevante medier, der indeholder galdesalte, fosfolipider, fedtsyrer og monoglycerider i et forhold, der efterligner forholdet i tarmene. Men desværre kan nogle af medierne være toksiske for cellerne i visse koncentrationer og under visse inkubationsforhold. Derfor er identificeret biorelevante medier, som ikke er toksiske for cellekulturen, hvorefter Caco-2 kulturen blev karakteriseret med hensyn til udskillelse af chylomikroner.

Styring af lymfatisk transport

Formålet med projektet er at evaluere sekretionen af lipoproteiner fra Caco-2 celler som en markør for lymfatisk transport

af tungtopløselige stoffer. Effekten på lipoprotein dannelse af farmaceutisk ofte anvendte overfladeaktive stoffer som Cremophor, Pluronic, Tween 80 og lecithin er nu blevet undersøgt i modellen.

Cremophor og Pluronic viste sig at nedsætte lipoproteinsekretionen af tungtopløseligt modelstof, mens Tween 80 og lecithin øgede sekretionen. På basis af denne viden kan det være muligt at designe en lipidbaseret formulering af et tungtopløseligt stof, der enten kan øge eller mindske den lymfatiske transport.

I en lipidbaseret formulering, f.eks. en olieopløsning eller en emulsion, vil det tungtopløselige lægemiddelstof være i opløsning. Processen hvorved fordøjelsesvæskerne nedbryder formuleringen og frigiver stoffet til transport ind i tarmcellen er meget dårligt belyst. Den fortsatte forskning vil bl.a. fokusere på at karakterisere hvilke parametre, der er vigtige for denne proces. Ud fra denne viden vil man på et rationelt grundlag kunne udvikle lipidbaserede formuleringer af et tungtopløseligt lægemiddelstof.



Cand.pharm. Ditte Maria Karpfer ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci.



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



Ph.d. René Holm er farmaceutisk forsker ved H. Lundbeck A/S.



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

Cellulært stressrespons - nøglen til celledød i hjernesygdomme?

Det cellulære stressrespons er vigtigt for cellernes evne til at overleve, og desuden sørger stressresponset for kontrolleret celledød under hjernens udvikling, hvor nogle celler skal gå til grunde, når de har udspi- let deres rolle. Men systemet er et tveægget sværd. Fejlregulation kan medføre alvorlige hjernesygdomme.

Af Aase Frandsen

Normal udvikling og funktion af pattedyrs og menneskers hjer- ner er betinget af neurotransmission, der formidles af det stimu- lerende signalstof glutaminsyre. Signalprocesserne involverer vigtige kognitive funktioner, som er centrale for bevidstheden, samt forskellige neurotrofiske og neurotoksiske funktioner.

Forstyrrelser i regulationen af én eller flere af disse processer er involveret i de celledødsforstyrrelser, der observeres i akutte neurologiske sygdomme som slagtilfælde, neurodegenerative sygdomme som Alzheimers syge og psykiatriske sygdomme som skizofreni.

Ingen af sygdommene kan på nuværende tidspunkt behan- des tilfredsstillende med deraf følgende store menneskelige og samfundsmæssige omkostninger. Det skyldes ikke mindst, at det endnu ikke er muligt at fjerne de uønskede patologiske effekter uden samtidigt at påvirke de essentielle fysiologiske funktioner på en uacceptabel måde.

Nyt udstyr muliggør dynamiske studier af de involverede processer. Sådanne studier vil fremme muligheden for at finde terapeutiske strategier til udvikling af effektive lægemidler med færre bivirkninger.

Calciumbalancen

En fællesnævner for de umiddelbart meget forskellige sygdom- me er forstyrrelser i den intracellulære calciumbalance, som bl.a. påvirkes af glutaminsyre. En central rolle spilles af det endoplasmatiske reticulum, et intracellulært organe, som simultant er involveret i cellens deponering og signalering af og med calcium samt med syntese og transport af proteiner, der skal bruges inde i og udenfor cellen. Det endoplasmatiske reticulum har tætte fysiske og funktionelle kontakter til andre intracellulære orga- ner eller til cellemembranen, og interaktionerne mellem disse strukturer er essentielle for, at cellen fungerer korrekt.

Vores arbejdshypotese er, at en regulatorisk eller funktionel fejlfunktion i systemet fører til et tofaset cellulært stressrespons, som er nært knyttet til det endoplasmatiske reticulum. Den før- ste fase er et adaptivt stressrespons, der fører til aktivering af et spektrum af stressgener, hvis funktion er at forøge cellens modstandskraft og overlevelsesmuligheder. Den anden fase er et sidste beredskab – en slags cellulær selvmordsknap – som kan aktiveres, hvis det adaptive stressrespons ikke er tilstrækkeligt til at sikre cellens overlevelse. Aktivering af dette beredskab fører til cellens tilintetgørelse på en kontrolleret vis. Herved undgås det, at cellen går til grunde på en katastrofisk måde, som medfører skader på de omkringliggende, sunde celler, på vævet og i sidste

ende på individet. Der er således en vis grad af kommunikation mellem de to systemer.

Et tveægget sværd

Det cellulære stressrespons er evolutionært velbevaret og findes i alle dyreceller, lige fra rundorme til mennesker, og det aktive- res blandt andet ved uønskede udefrakommende påvirkninger. Desuden aktiveres systemet under hjernens udvikling, hvor nogle af cellerne skal gå til grunde for, at et velordnet netværk mellem nervecellerne kan opbygges. Det cellulære stressrespons er en meget vigtig mekanisme for celler, organer og individers udvikling og tilpasningsevne - og dermed for overlevelsen.

Problemerne opstår, hvis regulationen af systemet kommer ud af kontrol, så det aktiveres på forkerte tidspunkter eller i en for lang periode. Dette kan medføre udviklingsmæssige skader, som menes at være tilfældet ved skizofreni, eller direkte cel- leskader, som kendes fra de neurodegenerative sygdomme. En sådan uhensigtsmæssig aktivering af cellernes stressrespons gør fysiologi til patologi. Vores forskning sigter på at afklare, hvornår og hvordan dette sker.

Biokemiske parametre

Vi anvender dyrkede nervecellekulturer fra forskellige dele af musehjerne som modelsystemer, der er særligt velegnede til mekanistiske undersøgelser på molekylært niveau. Dette skyl- des bl.a. kulturernes monotypiske karakter, der tillader separate studier af de enkelte celletypers respons.

Vi har gennem mange år karakteriseret den toksicitet og de celledødsforstyrrelser, som forårsages af glutaminsyre, og i særdeleshed de ændringer i calciumbalancen, som er af afgørende betydning for udviklingen af toksiciteten. Vi har i de senere år endvidere inkluderet studier af ekspresionen af en gruppe proteiner, som er relateret til det endoplasmatiske reticulum. Proteinerne er involveret i det adaptive stressrespons og spiller formentlig en vigtig rolle i regulationen af calciumbalancen. Herved har vi opnået et detaljeret kendskab til mange af de enkelte biokemi- ske parametre, der ændres ved påvirkning af nervecellerne med glutaminsyre, herunder også kvantitative målinger af nervecel- lernes overlevelse efter de forskellige påvirkninger.

Et dynamisk helhedsbillede

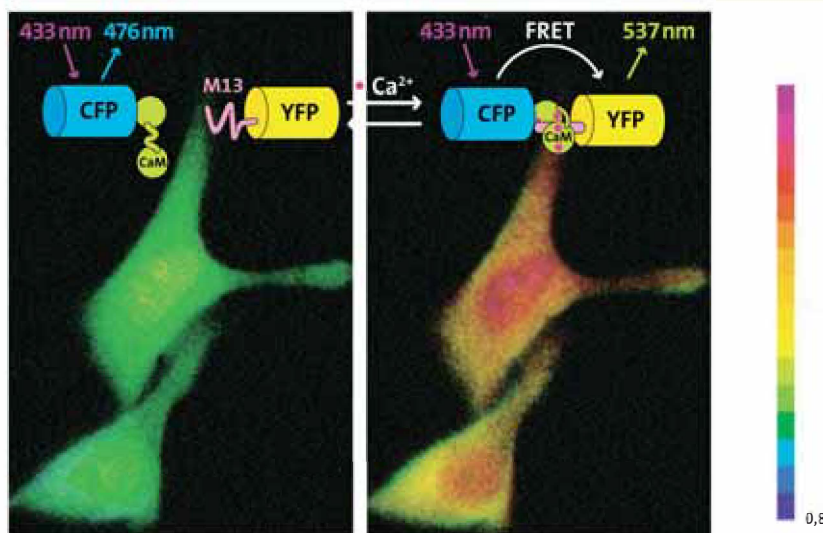
Imidlertid har vore og andres undersøgelser vist, at der ikke eksisterer nogen simpel sammenhæng mellem størrelsen af ændringer i calciumbalancen og graden af celledød, ligesom de biologiske konsekvenser af de øvrige molekylærbiokemiske forandringer heller ikke kan forudsiges. Dette er specielt vigtigt i nærværende sammenhæng, dels fordi mange fysiologiske, nor- malt fungerende signaleringssystemer inde i cellen involverer ændringer i calciumbalancen og stressresponset, og dels fordi glutaminsyre medierer både ønskede og uønskede processer.

Det er således af stor vigtighed at kunne afgøre på hvilken måde en given molekylær ændring påvirker cellens funktionio-



Dr. scient. Aase Frandsen
er lektor ved Institut for
Farmakologi.

FRET – DET NYE KONFOKALE MIKROSKOP



Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) er en afstandsafhængig interaktion mellem de elektronisk exciterede tilstande i to farvemolekyler i hvilken excitationen overføres fra et donormolekyle til et acceptormolekyle under emission af en foton.

FRET er velegnet til at studere afstande, der er sammenlignelige med dimensionerne i biologiske makromolekyler, og FRET er derfor specielt velegnet til at studere biologiske fænomener, der producerer ændringer i molekylær nærhed. Anvendes FRET som en kontrastmekanisme, kan man lave co-lokalisationsstudier af proteiner og andre molekyler med en rumlig opløsning, der overstiger konventionel optisk mikroskopi.

Det betyder kort sagt, at man har belyser (exciterer) ét fluorescerende molekyle, der udsender lys med en bestemt bølgelængde, som belyser et andet fluorescerende molekyle, hvis det sidste sidder tæt nok på det første. Emissionen fra det sidste molekyle, som har en anden bølgelængde, registreres. Man kan nu omregne det samlede

lysmønster til dynamiske aspekter mellem de to biologiske molekyler, man har koblet de fluorescerende molekyler til.

Disse fluorescerende molekyler er ofte varianter af molekyler, dybhavsdyr bruger. For at få de fluorescerende molekyler ind i cellerne, konstruerer man et genelement, der koder for den biologiske struktur, man ønsker at studere; f.eks. calmodulin (CaM), som er en del af calciumsignaleringsmaskineriet. Genet for calmodulin sættes sammen med generne for henholdsvis ét fluorescerende molekyle (f.eks. CFP) på den ene side, et linkerprotein og et andet fluorescerende molekyle (f.eks. YFP) på den anden side.

Dette konstruerede gen udtrykkes i cellen. Genet for calmodulin kobles til genet for et fluorescerende molekyle, som har en konformation, når det er frit og en anden, når det binder frie calciumioner. I den ubundne form er CFP og YFP så langt fra hinanden, at de ikke kan mærke hinanden, men når calciumionen bindes, nærmer de sig hinanden, og FRET opstår. Dette er illustreret i figuren.

nalitet. Dette testes ved en ultimativ funktionalitetstest for en nervecelle i evnen til at frisætte sit signalstof som kommunikationsmiddel i det neurale netværk, hjernen udgør.

Hidtil har det udelukkende været teknisk muligt at studere de enkelte parametre separat og statisk. Sådanne øjeblikksbilleder tillader ikke samtidige analyser af den beskrevne problematik, som udelukkende kan belyses ved hjælp af en avanceret form for konfokal mikroskopi, som tillader måling af op til tre parametre samtidigt i den samme celle. Et sådant udstyr har vi netop fået bevilliget fra Carlsberg Fondet i samfinansiering med DFU.

Apparatet muliggør meget detaljerede studier i levende celler både med hensyn til rumlig og tidsmæssig opløsning. På den måde bliver det muligt at bestemme de dynamiske aspekter af calciumsignaler og mange andre parametre. Desuden er det muligt at opnå en direkte kobling mellem molekylære ændringer og det cellulære respons i form af overlevelse eller celleskader. Vi har således nu fået enestående muligheder for at studere samspillet mellem parametre, der hidtil udelukkende har kunnet studeres enkeltvis.

Et mere detaljeret kendskab til de enkelte processer og i særdeleshed om rækkefølgen af dem vil bidrage til den grundlæggende forståelse af både de fysiologiske og de patologiske processer, signaltransduktionen relaterer sig til. En sådan viden vil udover den grundvidenskabelige interesse formodentligt forbedre mulighederne for at udvikle stoffer, der selektivt hæmmer de patologiske

mekanismer uden at påvirke de normale fysiologiske funktioner, hvorved bivirkningsprofilen for de nye potentielle lægemidler vil forbedres.

TO PROJEKTER

Molekylære mekanismer for preconditionering: Det er velkendt, at patienter, der oplever forbigående iskæmisk attack (TIA) forud for et slagtilfælde får mindre omfattende skader end de patienter, der ikke har forudgående TIA. Vi studerer fænomenet ud fra hypotesen om, at TIA initierer det adaptive stressrespons og undersøger derfor ændringer i de stressproteiner, som er relateret til det endoplasmatiske reticulum. (Lektor dr.scient. Aase Frandsen, cand. pharm. Pia Birch Nielsen, stud. pharm. Line Thøgersen.)

Neurotransmission og skizofreni: Atypiske antipsykotika har en bedre bivirkningsprofil end de typiske, men virkningsmekanismen er ukendt. Vi arbejder ud fra hypotesen om, at forskellen mellem de to grupper skyldes forskelle i påvirkning af glutaminsyremedierte processer, herunder især regulationen af receptoraktiviteten og dermed også toksiciteten. (Lektor, dr.scient. Aase Frandsen, stud. pharm. Mette Hagen Petersen, overlæge, lektor, dr.med. Henrik Lublin.)

En ny receptor i mennesket

Med udgangspunkt i det humane genom er det lykkedes at identificere og karakterisere en ukendt receptor, som findes i de fleste af kroppens organer. Receptoren er efter alt at dømme biologisk vigtig og kan derfor være farmakologisk interessant.

Af Petrine Wellendorph, Anders Balsgaard, Kasper Bø Hansen og Hans Bräuner-Osborne

Kortlægningen af menneskets totale arvemateriale – det humane genom – blev afsluttet i 2001, og man vurderer, at vi har omkring 30.000 gener fordelt på 23 kromosompar. En stor del af generne er stadig ukendte, og man ved ikke, hvilken funktion de har i den menneskelige organisme.

Derfor er der et stort ønske om at identificere nye og ukendte gener i genomet for at undersøge genernes biologiske funktioner. Gener, der koder for receptorer på overfladen af celler, er særligt interessante ud fra et lægemiddelsynspunkt, fordi receptorerne kan binde hormoner eller signalstoffer på cellens yderside og starte signalkaskader inde i cellen. En lang række kendte lægemiddelstoffer virker netop ved at aktivere eller hæmme receptorer. På den måde kontrollerer medicinen cellens aktivitet og dermed de signaler, som cellen udsender til nabocellerne.

Et detaljeret kendskab til receptorerens funktion er en forudsætning for udvikling af nye lægemidler. I vores projekt har vi med udgangspunkt i kendte receptorerens aminosyresekvenser draget nytte af bioinformatik og udført databasesøgninger for at identificere ukendte receptorgener og bruge dem til at danne og karakterisere de receptorer, som generne koder for.

Gen for ukendt receptor

Med udgangspunkt i medlemmer af den familie af receptorer, der kaldes G-protein koblede receptorer, har vi søgt på internet i offentligt tilgængelige databaser over det humane genom (www.ncbi.nlm.nih.gov), og her lykkedes det at identificere et gen med en hidtil ukendt funktion. Da genet har sekvensmæssig og strukturel lighed med en mindre familie af de G-protein koblede receptorer, kaldet familie C, har genet fået navnet GPRC6A for G-protein koblet receptor, familie C, subtype 6A.

Fra gen til protein

Næstetrin var at lave en molekylær kloning af GPRC6A. Molekylær kloning går ud på at producere den DNA streng, der i organismen koder for et givet protein. Det klonede DNA kan nu indføres i eksperimentelle cellesystemer, hvor genet vil blive oversat til et protein. Derpå kan funktionen af proteinet studeres i laboratoriet ved at tilføre cellerne stoffer med en formodet virkning på proteinet. Før den egentlige molekylære kloning af GPRC6A i laboratoriet var det vigtigt først at forudsige størrelsen af genet samt få en ide om, hvilke organer der udtrykker genet. Derfor indhentede vi informationer fra databaser på internet, og det lykkedes os i laboratoriet at syntetisere en kopi af det stykke DNA, der koder for GPRC6A fra humant nyrevæv. Sekvensen af det syntetiserede DNA stemmer fuldstændig overens med den forudsagte sekvens fra genomet.

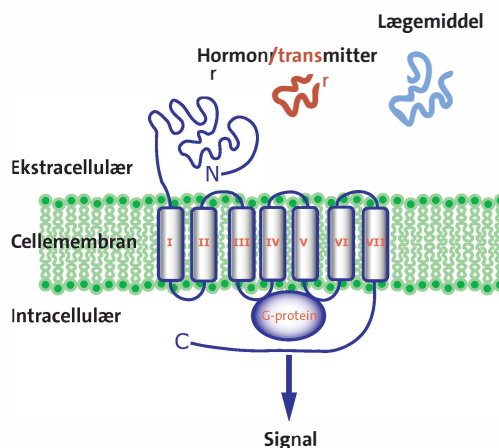
GPRC6A findes ikke blot i nyrerne, men også i mange andre af menneskets organer som f.eks. hjernen, lungerne, leveren, tarmene og musklerne. Dét tyder stærkt på, at receptoren må være biologisk vigtig.

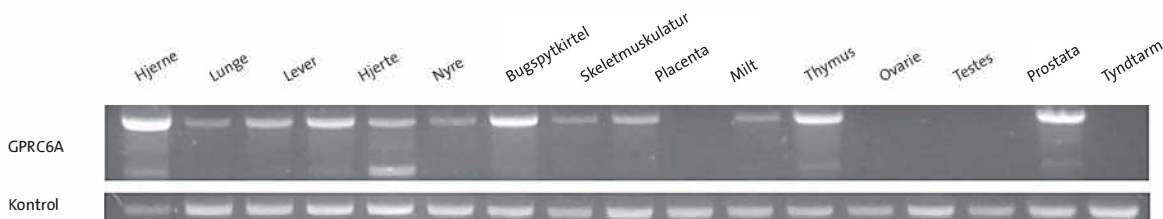
CELLERNES OMSTILLINGSBORD

G-protein koblede receptorer fungerer som omstillingsborde mellem cellers ydre og indre miljø. Receptorerne sidder indlejret i cellemembraner og kommunikerer med G-proteiner inde i cellerne. Når receptorerne stimuleres af et hormon, et signalstof eller et lægemiddelstof, startes en signalkaskade i cellen. G-protein koblede receptorer udgør målmolekylerne for henimod 30 procent af alle markedsførte lægemidler.

Receptorerne består af tre strukturelle byggeklodser:

- En ekstracellulær aminoterminal ende, som hormoner og signalstoffer kan binde sig til.
- Syv transmembrane dele forbundet af intracellulære og ekstracellulære slynger, som fastholder proteinet i cellemembranen og formidler kobling til G-proteinet.
- En intracellulær carboxyterminal ende.





Udbredelsen af GPRC6A i forskellige organer i mennesket.

Karakterisering af GPRC6A

For at undersøge funktionen af en receptor benytter man sig af simple, opdyrkede pattedyrsceller, som tilføres det klonede DNA og derfor er i stand til at producere det tilsvarende protein.

Hvis man er heldig, bliver receptorproteinet straks indlejret i cellernes ydre membran og vil så kunne påvirkes eksperimentelt med stoffer, man tror kan binde til receptoren og aktivere den. Ved at mærke proteinet med et specifikt antistof observerede vi desværre, at GPRC6A ikke umiddelbart udtrykkes på overfladen af de primitive celler, men forbliver inde i cellerne. Det kan skyldes, at GPRC6A fysiologisk set ikke er en overfladereceptor, eller at den tilbageholdes i cellerne af andre årsager.

Kimære receptorer viser vejen

Med henblik på at "tvinge" human GPRC6A op til celleoverfladen konstruerede vi blandingsprodukter – såkaldte kimærer – mellem GPRC6A og en beslægtet receptor fra guldfiskereceptoren. En af de fremstillede kimærer blev transporteret til celleoverfladen.

Vi har produceret kimærer, hvorefter den aminoterminal del eller den transmembrane plus carboxyterminale del af GPRC6A er udskiftet med de tilsvarende komponenter fra guldfiskereceptoren. En af de fremstillede kimærer blev transporteret til celleoverfladen.

Den kunstigt fremstillede receptor har hjulpet os til at trække den del af GPRC6A op til overfladen, som indeholder bindingsdomænet, og det gør det muligt at afdække, hvilke stoffer der genkendes af receptoren. Identifikation af stoffer, der binder til GPRC6A, er af stor betydning for i fremtiden at kunne udvikle lægemidler rettet mod netop denne receptor.

Binding til GPRC6A

Den kimære receptor indeholder, foruden bindingsdomænet af GPRC6A, det transmembrane signaldomæne fra guldfiskereceptoren. Man ved fra tidligere forsøg, at signaldomænet kan aktivere kloridkanaler i ægceller fra en afrikansk frø, *Xenopus laevis*, og derfor har vi benyttet dette system til at screene stoffer på GPRC6A. Når genet for guldfiskereceptoren indsprøjtes i ægcellen, udtrykkes proteinet på ægcellens overflade, og det samme er tilfældet med den kimære receptor.

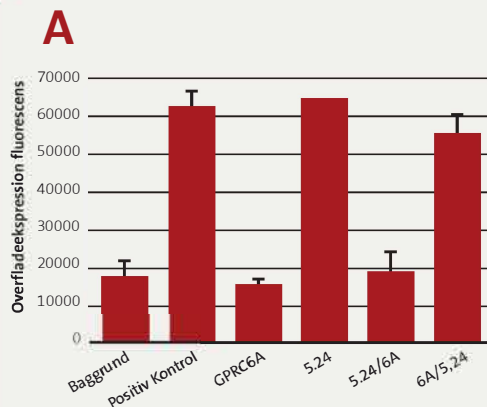
Forsøgene viste, at to naturligt forekommende aminosyrer, arginin og lysin, kan binde sig til kimærreceptoren og føre til åbning af kloridkanalerne. Til sammenligning giver ægceller uden kimærreceptoren intet signal. Arginin og lysin er således indirekte blevet vist at være stoffer, der kan binde sig til GPRC6A. Vi har efterfølgende testet andre aminosyrer og fundet, at ornitin, citrullin, alanin, glycine og serin også kan binde sig til GPRC6A.

Receptoren i andre pattedyr

For at undersøge farmakologien af GPRC6A yderligere har vi klonet en tilsvarende receptor fra mus, som er identisk med den humane receptor på 80 procent af aminosyrerne. I modsætning til GPRC6A udtrykkes musereceptoren på overfladen af pattedyr-

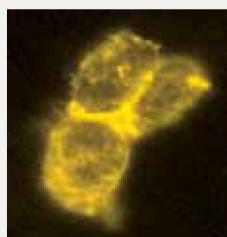
cellerne. Ved at sammenligne GPRC6A i menneske og mus håber vi at kunne sandsynliggøre, hvilke dele af den humane receptor, der hindrer dens transport til celleoverfladen. Desuden har vi udtrykt musereceptoren i ægceller og har også her kunnet vise, at arginin virker aktiverende.

Vi ved nu, at GPRC6A er en receptor for aminosyrer i flere pattedyr, og det styrker troen på, at receptoren er biologisk vigtig. Da aminosyrer findes naturligt i organismen og har stor betydning i både proteinsyntesen og stofskiftet, kan det tænkes, at GPRC6A spiller en vigtig rolle i såvel den raske som den syge organisme. Vort projekt tjener i et større perspektiv til at bane vejen for en detaljeret opklaring af GPRC6A's biologiske rolle i sundhed og sygdom - og som potentielt mål for udvikling af nye lægemidler.



Receptorer udtrykt i cellemembranerne i en pattedyrscellelinie vist med antistofmærkning.

B



Proteinet for den kimære receptor er udtrykt i den ydre membran af celler; her vist ved mærkning med et fluorescerende antistof.



Cand.pharm. Petrine Wellendorph er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi.



Cand.pharm. Anders Balsgaard var specialestuderende på projektet.



Cand.scient. Kasper Bø Hansen er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi og H. Lundbeck A/S.



Dr.pharm. Hans Bräuner-Osborne er professor ved Institut for Medicinalkemi.

Uudnyttet potentiale i den mikrobielle jungle?

Bakterier skal have en utrolig tilpasningsevne for at overleve. Studier af de genetiske aspekter af bakteriers tilpasningsevne kan bruges til at forbedre de bakteriekulturer, der anvendes til produktion af protein- og peptidbaserede lægemidler.

Af Anders Fuglsang

Livet i den mikrobielle jungle er på ingen måde en skovtur. Er man så uheldig at være en bakterie dér, så gælder det om at være forberedt på stort set alle tænkelige lumpne tricks fra naboerne. Hvis ikke man skynder sig at vokse og dele sig, så gør naboen det i sådan en fart, at man selv risikerer at blive kvalt. Måske udskiller naboen enzymer, der ødelægger den næring, man gerne vil bruge, hvorved dens vækst kan stoppe. Måske benytter naboer sig ligefrem af slag under bæltetstedet og smider kradse kemikalier efter en i et forsøg på at komme først og blive størst. Og som om det ikke var nok, kan miljøet pludselig skifte totalt, så man på

få øjeblikke skal indstille sig på at bruge en anden næring til sin funktion og vækst. Den, der ikke er tilpasset, dør!

På Institut for Farmakologi er vi for nylig begyndt at interessere os for teoretiske studier af de genetiske aspekter af bakteriers tilpasning. Til formålet anvender vi software, som vi selv udvikler. Forskningsområdet har navne som bioinformatik eller det engelske "genomics".

Siden slutningen af 1990'erne er et stort antal bakterier blevet sekventeret, hvilket vil sige, at man har kortlagt samtlige byggesten, nukleotider, i genomet, og sekvenserne er offentligt tilgængelige. Men selv om man kender alle nukleotiderne i en organisme, så er det ikke sikkert, at man ved særlig meget om betydningen af dem. Det er her, bioinformatikken kommer ind i billedet.

Anvendelse af codons

Et af de genetiske aspekter, som er et godt studie værd, er bakteriers anvendelse af codons. Codons er tripletter med tre nukleotider, som oversættes fra DNA til RNA og derfra videre til de aminosyrer, som bruges til at bygge et protein.

Der findes 20 aminosyrer og 64 codons, så de fleste aminosyrer kan dannes ud fra mere end et codon. Nogle aminosyrer dannes dog kun ud fra ét bestemt codon. Et eksempel er aminosyren tryptofan. I skarp kontrast hertil kan man nævne aminosyren leucin, som kan dannes ud fra seks forskellige codons.

Det har vist sig, at der absolut ikke er lige mange af de seks codons, uanset hvilken organisme man taler om. Dette skyldes til dels det såkaldte mutationstryk, hvor kemiske forhold i bakteriernes miljø f.eks. medfører, at aminosyrerne guanin og cytosin med tiden ændres til adenin og thymin, således at AT-rige codons generelt foretrækkes. Meget tyder imidlertid på, at der også er tale om en tilpasning til forholdene i den mikrobielle jungle.

Fra gen til protein

Et gen er opskriften på et protein. Når genet aktiveres, dannes der en enkeltstregen kopi af genet, messenger-RNA (mRNA), der fungerer som en genetisk budbringer. Cellernes proteinfabrikker, ribosomerne, aflæser mRNA'et og indsætter for hvert codon en korrekt aminosyre ved hjælp af transfer-RNA (tRNA), som leverer aminosyrerne til proteinfabrikken. Man siger, at tRNA er ladet, når det har en aminosyre koblet til sig, og uladet, når det har afleveret sin aminosyre til den voksende peptidkæde.

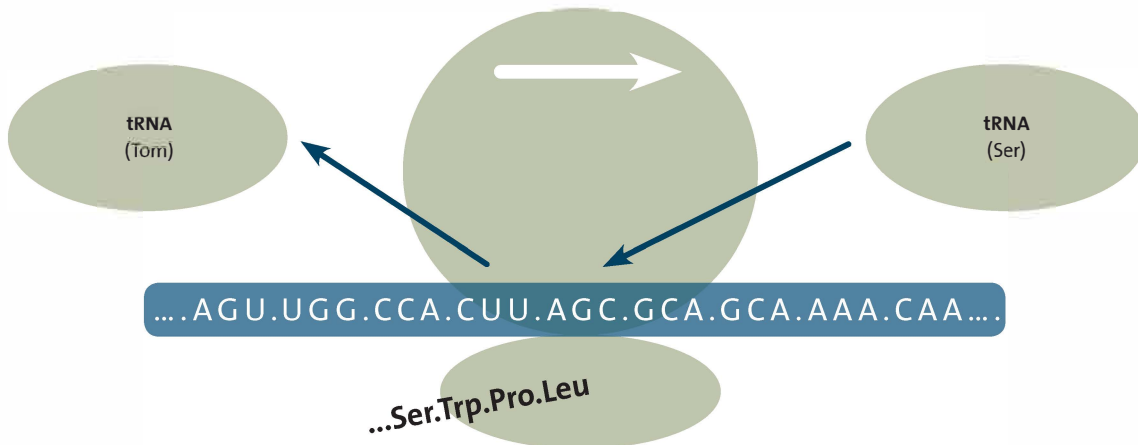
Der er et nøje afstemt forhold mellem hvilket codon, der anvendes for en aminosyre, og ekspressionsniveauet af det pågældende protein; højt udtrykte proteiner anvender ofte et snævert sæt af de 64 codons. Dette skyldes, at niveauerne af tRNA er lave for visse tRNA'er. Processen kan tænkes at forløbe langsomt, hvis den ladede tRNA ikke er umiddelbart til stede, og her er det ikke alle typer af tRNA, som findes i cellevæsken i store mængder. De smarteste bakterier i junglen har tilpasset deres codons, så lave niveauer af bestemte tRNA ikke bliver en flaskehals, der gør, at naboen vokser hurtigere.

Den genetiske kode

Codon	Aminosyre	Codon	Aminosyre	Codon	Aminosyre
GUA	Val	GGA	Gly	ACA	Thr
GUC	Val	GGC	Gly	ACC	Thr
GUG	Val	GGG	Gly	ACG	Thr
GUU	Val	GGU	Gly	ACU	Thr
GCA	Ala	CCA	Pro	UUU	Phe
GCC	Ala	CCC	Pro	UUC	Phe
GCG	Ala	CCG	Pro	UAU	Tyr
GCU	Ala	CCU	Pro	UAC	Tyr
UGU	Cys	CAU	His	CAA	Gln
UGC	Cys	CAC	His	CAG	Gln
AAU	Asn	AAA	Lys	GAU	Asp
AAC	Asn	AAG	Lys	GAC	Asp
UGA	Stop	AUU	Ile	GAA	Glu
UAG	Stop	AUC	Ile	GAG	Glu
UAA	Stop	AUA	Ile	AUG	Met*
				UGG	Trp
UUA	Leu	AGU	Ser	AGA	Arg
UUG	Leu	AGC	Ser	AGG	Arg
CUA	Leu	UCA	Ser	CGA	Arg
CUC	Leu	UCC	Ser	CGC	Arg
CUG	Leu	UCG	Ser	CGG	Arg
CUU	Leu	UCU	Ser	CGU	Arg

* AUG er desuden et typisk startcodon.

Tabellen viser sammenhængen mellem codon og aminosyre; selv princippet i den genetiske kode. Forskellige codons kan kode for samme aminosyre.



Ph.d. Anders Fuglsang er adjunkt ved Institut for Farmakologi.

Translationsprocessen: Et ribosom (grøn) aflæser mRNA'et i pilens retning. mRNA, der er vist som en vandret nukleotidsekvens, indeholder opskriften på et protein. Ribosomet rekrutterer tRNA, som bringer aminosyrerne til fabrikkens samlebånd. En bestemt aminosyre passer til hvert enkelt codon. Aminosyrerne kobles sammen en for en og ender som en kæde af aminosyrer. Herved dannes proteinet. På tegningen er codon^{et} CUU, som koder for aminosyren leucin, netop blevet aflæst, og den tomme tRNA har forladt ribosomet. En ny tRNA med aminosyren serin skal ind og afkodes ved AGC-codon^{et}.

Shine-Dalgarno-sekvenser

En yderligere tilpasning er de såkaldte Shine-Dalgarno-sekvenser, som er små korte sekvenser på 6-7 nukleotider. De findes ca. ti nukleotider oven for et gens startcodon, og de genkendes sekvensspecifikt af ribosomerne. Jo bedre sekvensen genkendes, desto større er chancen for, at den giver anledning til at starte proteinsyntesen for det pågældende gen. Sagt på en anden måde: Shine-Dalgarno-sekvenser kan bruges til at øge udtrykkelsen af et protein.

Det er kun bakterier, der benytter sig af denne form for tilpasning, men evolutionen har ikke tilpasset alle bakterier på denne måde. Det er muligt at finde ud af, om en bakterie benytter sig af Shine-Dalgarno-sekvenser ved hjælp af en sammenlignende metode, en χ^2 -test, der fungerer nogenlunde, som det kendes fra Meade'sk genetik.

χ^2 antager store værdier, hvis det forventede antal af forskellige nukleotider et givet sted i genomet er meget mindre end det observerede antal. Det gælder for Shine-Dalgarno-sekvenser, fordi de er sekvensspecifikke, og fordi tilfældigheden af nukleotidernes individuelle antal er meget lille. *Yersinia pestis*, pestbakterien, er et eksempel på en bakterie, hvor plottet giver en fint afgrænset top omkring ti nukleotider efter genes startcodon, hvilket er en klar indikator for, at bakterien benytter sig af Shine-Dalgarno-sekvenser.

Hvad kan det bruges til?

For tiden er et væld af bakterier ved at blive sekventeret, og samtidigt sættes der stærkt på at udvikle lægemidler, som består af proteiner eller dele af proteiner, som kaldes peptider.

Peptider og proteiner kan ikke syntetiseres kemisk i kolber, men kan kun fremstilles ved at gensplejse mikroorganismer, så de producerer humane peptider eller proteiner. Insulin er et klassisk eksempel på et medicinsk peptid, der fremstilles på den måde, og mange peptid- eller proteinbaserede lægemidler forventes at komme på markedet inden for få år.

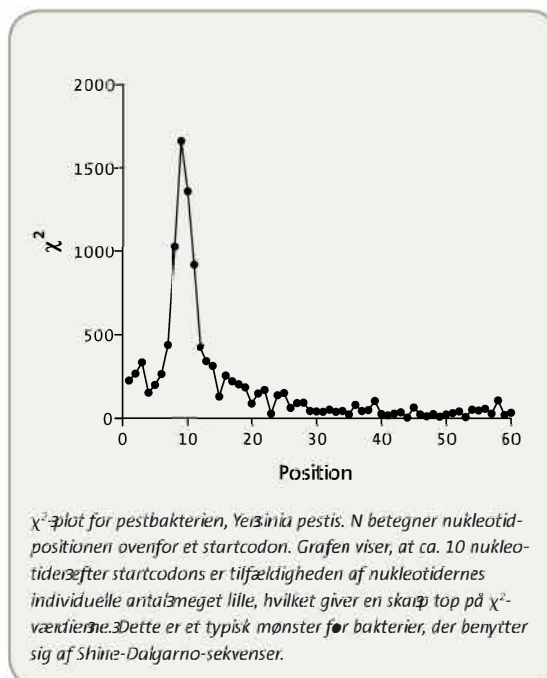
Imidlertid er bakteriekulturer i fermenteringstanke en dyr måde at producere medicin på, fordi oprensningen af et peptid eller et protein fra en bakteriesuppe er særdeles besværlig. Derfor søger man hele tiden at optimere produktionen.

Her kan viden om produktionsorganismens anvendelse af codons og Shine-Dalgarno-sekvenser blive særdeles værdifuld. Hvis man forsøger at udtrykke et gen, der indeholder mange codons, som translateres ved hjælp af tRNA'er, kan kun findes i små mængder, så risikerer man, at processen forløber lang-

somt. Dermed bliver udbyttet ikke så stort, som det ellers kunne være.

I sådanne tilfælde kan man give den gensplejede bakterie en grundig ansigtsvaskning ved simpelthen at udskifte de uønskede codons med foretrukne codons, hvortil der findes tRNA i store mængder. Metoden, som kaldes codonoptimering, ændrer ikke aminosyresekvensen i det udtrykte protein, men øger udelukkende produktionskapaciteten. Samtidig kan χ^2 -plottet give et godt praj om, hvorvidt det kan betale sig at optimere genes ekspres-sionen ved at indsætte en Shine-Dalgarno-sekvens i bakterien.

Et af målene med vores forskning inden for dette felt er netop at fremstille software, der kan bruges til at beregne, hvordan bakteriers genes ekspres-sion kan forbedres ved hjælp af codonoptimering og manipulation af Shine-Dalgarno-sekvenser. Det er et skridt i retning af at kunne drage fordel af det potentiale, som de barske forhold i den mikrobielle jungle har udstyret bakterierne med.



Blandingers toksikologi

Miljø og mennesker eksponeres til blandinger af kemiske stoffer i koncentrationer, som ligger langt under det niveau, hvor de enkelte stoffer er giftige. Det har dog vist sig, at stofferne kan interagere med hinanden og forårsage effekter, som ikke kan forudses ud fra viden om de enkelte stoffer.

Af Franziska K. Birkved, Anne Munch Christensen, Flemming Ingerslev og Bent Halling-Sørensen

Organismer i naturen udsættes ofte for komplekse blandinger af kemikalier. Et eksempel er vandmiljøet omkring dambrug, hvor fra der bl.a. udledes antibiotika fra sygdomsbehandling. Andelen af antibiotika, der optages i fiskene, er ofte meget lille, og overskuddet føres med vandet, der strømmer igennem dambruget, ud i det omgivende miljø.

Økotoxikologiske tests har traditionelt vist, om enkelte stoffer kan påvirke miljøets organismer. Spørgsmålet er dog ofte, om flere stoffer ad gangen kan have endnu større betydning. Dette har vi undersøgt ved hjælp af en testmetode, der måler antibakterielle kemiske stoffers hæmning af bakteriers vækst. Metoden gør det muligt at vurdere blandingers betydning på kvantitativ vis.

To antibiotika, erythromycin og oxolinsyre, er testet i en blandet bakteriekultur ved en række koncentrationer både som rene stoffer og ved forskellige blandingsforhold. I samtlige tilfælde har vi bestemt EC50-værdier og de koncentrationer af henholdsvis erythromycin og oxolinsyre, hvor EC50 opnås. I denne sammenhæng betyder EC50, at bakteriernes vækstrate halveres. Resultatet af eksperimentet viser, at en blanding af stofferne har en større potens end summen af de to stoffers individuelle virkning.

For dambrug peger vores resultater altså på, at blandingseffekter er noget man skal tage hensyn til i forbindelse med betydningen af udledninger af antibiotika.

Ved at anvende metoden kan man få meget præcise data til vurdering af blandingers toksicitet. I det givne eksempel er datamængden af en sådan kvalitet, at det har været muligt at forudsige effekten af at blande de to stoffer i andre forhold, end dem der er undersøgt.

Imidlertid har metoden dog betydelige begrænsninger, bl.a. må man have en test, hvor det kan lade sig gøre at udføre mange forsøg. Desuden kan metoden i praksis kun anvendes, når man undersøger vekselvirkningerne mellem to eller tre stoffer. Endelig er virkeligheden ofte den, at man ikke kender den præcise sammensætning af en blanding af kemiske stoffer i miljøet.

Hormonforstyrrende stoffer

Til illustration af hvordan man i mere komplekse situationer kan undersøge blandingers effekter, har vi valgt et studie af phytoøstrogener, som er plantestoffer med hormonegenskaber. Nogle af stofferne, isoflavonoider, mistænkes for at kunne

BEREGNING AF INTERAKTIONER - ISOBOLMETODEN:

Grundlaget for at kunne foretage kvantitative beregninger af stoffers samvirkende effekter er, at man har et testsystem, som relativt præcist kan beskrive sammenhængen mellem dosis og virkning. Det er nødvendigt, at resultaterne kan sammenfattes kvantitativt, f.eks. i en dosis-responskurve, hvoraf man kan aflæse et tal for stoffets giftighed; f.eks. EC50, som er den dosis hvor 50 procents effekt opnås (EC = Effect Concentration).

Hvis to stoffer blandes i koncentrationer, der svarer til halvdelen af hvert stofs EC50, burde den samlede effekt være EC50. Hvis man tilsvarende har stof 1 i en mængde, der svarer til 25 procents af dets EC50, og stof 2 i hvad der svarer til 75 procent af stoffets EC50, burde man igen få en samlet effekt på EC50. Matematisk kan dette generaliseres for et uendeligt antal stoffer i et interaktionsindeks, CI, som her vises for det simple tilfælde med to stoffer:

$$CI = d1/D1 + d2/D2$$

Hvor:

d1, d2 er koncentration af stof 1, 2 i blandingen ved en given effekt; i dette eksempel EC50.

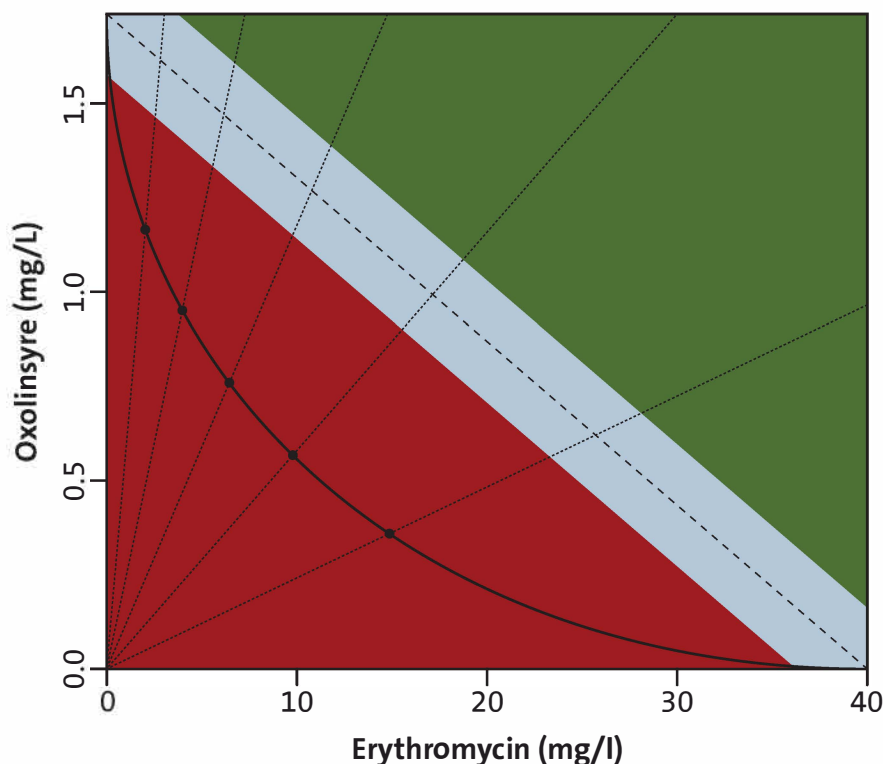
D1, D2 er koncentration af stof 1, 2 der giver anledning til EC50.

I de beskrevne eksperimenter kan CI beregnes, og ideelt set gælder det, at en blanding af stoffer er antagonistisk hvis $CI > 1$, additiv hvis $CI = 1$ og synergistisk hvis $CI < 1$.

påvirke reproduktionsevnen og øge risikoen for brystkræft. Der er altså tale om stoffer med flere virkninger; altså en ikke præcist definerbar effekt.

Ved undersøgelse af de enkelte stoffers effekt i udvalgte test-systemer kan man måle stoffernes indvirkning på mange enkeltfaktorer såsom hæmning af visse enzymer og vækstfaktorer, der tilsammen er med til at forklare den øgede forekomst af hormonrelaterede kræftformer og nedsat reproduktionsevne. Billedet er forvirrende, fordi man ikke kan sammenkæde de målte effekter med stoffernes samvirkende påvirkning. Imidlertid kan man ved at måle blandingens samlede virkning på én effekt måske forklare, om blandingseffekter af stofferne har betydning.

Vi undersøgte først den østrogene aktivitet af isoflavonoider i et sojaekstrakt i en cellekultur med humane brystkræftceller. Vi fandt, at de enkelte isoflavonoider udviste østrogenegenskaber i cellekulturen, hvilket også gjaldt for et sojaekstrakt, som er rigt på isoflavonoider, og som anvendes som kosttilskud. Eksperimentet viste klart, at stofferne er østrogene, samt at deres virkning er additiv.



Bestemmelser af de koncentrationer af to antibiotika, der enten alene eller i forskellige blandingsforhold giver anledning til 50% hæmning af bakteriers vækst. Testen er udført med spildevandsbakterier efter isostandarden, ISO15522. Hvert punkt angiver koncentrationen af hvert af stofferne ved 50% hæmning. Punktlinierne illustrerer de forskellige blandingsforhold af de to stoffer (dvs. 100%, 83%, 67%, 50%, 33%, 17% og 0% af oxolinsyre). På figuren ses områderne for synergi (rød), additivitet (grå) og antagonisme (grøn).

Imidlertid er det problematisk at overføre data fra laboratorieforsøg til levende organismer, og derfor undersøgte vi, hvorvidt denne blanding af isoflavonoider kunne have en effekt i rotter ved hjælp af en uterotroftest. I dette assay måles størrelsen af rotters livmoder (uterus), efter at dyrene i deres foder har indtaget de stoffer, der undersøges. Forsøgene viste, at sojaekstraktet var østrogen i rotter, hvilket kunne ses ved, at livmoderens vægt blev øget. Effekten, vi så i cellekulturen, optræder altså også i levende dyr. De valgte doser er relevante for humant indtag i Asien, hvor der spises meget soja, samt for folk, der tager kosttilskud med store mængder isoflavonoider.

Undervurderede effekter

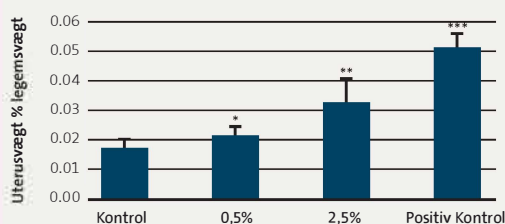
Vore undersøgelsessviser, at eksponering til en cocktail af kemikalier for både miljø og mennesker kan have konsekvenser, som er større og anderledes, end hvad der kunne forventes ud fra viden om de enkelte stoffer. Det kunne påvises, at antibiotika fundet i lave koncentrationer i vandmiljøer kan virke synergistisk og dermed påvirke vandmiljøet og dets organismer i langt højere grad end hidtil antaget. Ligeledes tyder vores undersøgelser på, at udsættelse for en blanding af hormonforstyrrende stoffer i lave doser kan medføre en ikke ubetydelig hormonpåvirkning, der skyldes en addition af effekten af de enkelte stoffer.

ER TO PLUS TO LIG MED FIRE?

Spørgsmålet synes trivielt, men er det absolut ikke, når toksikologer blander stoffer. Nogle gange ses en additiv effekt, når stoffer blandes, og deres effekt kan lægges sammen ($2+2=4$). Men der kan også være tale om antagonisme, hvor den resulterende effekt er mindre end summen af enkeltstofferne ($2+2<4$). Andre gange er effekten af stofferne større end det, der kan beregnes ved summering (dvs. $2+2>4$), og så taler man om synergi.

På baggrund af vores studier mener vi, at effekter af lavdosisblandinger hidtil har været undervurderet, og det i allerhøjeste grad er påkrævet at undersøge blandingers toksikologi.

Uterotrof-assay



Gråfen dokumenterer isoflavonoiders østrogenaktivitet i rotter i et uterotrof-assay. Rotter, der har fået fjernet ovarierne for at stoppe hovedkilden til deres østrogenproduktion, får et kosttilskud, som er rigt på isoflavonoider. Koncentrationerne svarer til humant indtag i Asien (0,5 %) og fem gange humant indtag (2,5 %). Efter to ugers eksponering igennem foderet måles vægten af livmoderen. Vægten er et mål for et stofs østrogenaktivitet, fordi østrogener øger livmoderens vægt. Både den lave og den høje dosis af kosttilskuddet øgede livmoderens vægt signifikant, hvilket betyder, at stofferne udviste østrogenaktivitet i rotterne, og aktiviteten var stigende med stigende koncentrationer. Den positive kontrol er ethinyløstradiol, et syntetisk steroidøstrogen. Disse resultater tyder på, at disse stoffer udviser den samme additive effekt, som blev set i forsøg med cellekulturer.



Ph.d. Franziska K. Birkved er adjunkt ved Institut for Analytisk Kemi.



Civiling. Anne Munch Christensen er ph.d.-studerende ved Institut for Analytisk Kemi.



Ph.d. Flemming Ingerslev er lektor ved Institut for Analytisk Kemi.



Ph.d. Bent Halling-Sørensen er professor ved Institut for Analytisk Kemi.

Medicinsk teknologivurdering af dosispakket medicin

En medicinsk teknologivurdering af dosispakket medicin viser, at der ikke er dokumentation for helbredsmæssige effekter ved brug af dosispakning. Dosispakninger sikrer ikke alene, at brugeren tager medicinen som anbefalet af de sundhedsprofessionelle.

Af Lotte Stig Haugbølle, Birthe Søndergaard og Anne Lee

De danske apoteker har siden 2001 i følge lovgivningen haft ret og pligt til at tilbyde den medicinske teknologi "dosispakket medicin" til deres kunder. Ti af landets apoteker er i dag godkendt som pakkeapoteker, mens alle landets apoteker udleverer dosisdispenseret medicin.

Ved dosisdispensering forstås, at et lægemiddel på apotek eller sygehusapotek påfyldes en doseringsbeholder, som er tilpasset lægemidlets konkrete anvendelse. Beholderen kan indeholde en eller flere doseringer af et eller flere lægemidler. Lægemidlerne til de enkelte indtagelsestidspunkter skal være klart adskilt fra lægemidler, som skal indtages på andre tidspunkter.

Vor viden om erfaringerne og effekten af dosispakning er begrænset til trods for, at teknologien har været anvendt i mange år i form af manuelt pakket medicin. Derfor har vi lavet en medicinsk teknologivurdering (MTV) af dosispakket medicin.

Medicinsk teknologivurdering er en alsidig, systematisk vurdering af forudsætningerne for og konsekvenserne af at anvende medicinsk teknologi. I Danmark arbejder man med en MTV-model, der består af fire elementer: Patient, organisation, økonomi og teknologi.

Medicinsk teknologivurdering har de senere år vundet indpas i den sundhedspolitiske debat og forskning både i Danmark og internationalt. Baggrunden er de hastigt voksende teknologiske muligheder koblet med begrænsede økonomiske ressourcer og en mere kritisk holdning til anvendelse af teknologi.

Litteraturstudie

Vi har gennemført et litteraturstudie om dosisdispensering både indenfor og udenfor Danmarks grænser. Undersøgelsen bygger på de fire elementer i en medicinsk teknologivurdering. Systematiske søgninger blev gennemført i databaserne Medline, International Pharmaceutical Abstract, Cinahl og Embase. Derudover blev årgangene 2000-2001 af bl.a. Månedsskrift for Praktisk Lægegerning, Sygeplejersken, Ugeskrift for Læger samt Farmaci undersøgt for relevante artikler.

Litteraturstudiet endte med at inkludere 55 undersøgelser. Der blev identificeret ni kontrollerede studier, fire før-efter studier uden kontrolgruppe og 42 deskriptive eller kvalitative studier. Anvendelsen af dosisdispensering som medicinsk teknologi er således mere baseret på erfaring og viden hos sundhedspersonalet end egentligt evidensbaseret. De inkluderede studier omhandler maskinel og manuel dosisdispensering og rummer erfaringer fra apoteker, plejehjem og almen praksis. Undersøgelser fra sygehuse er medtaget, hvis dosisdispenseringen er startet op på hospitalet. Studierne er primært europæiske. Fra den øvrige verden er der inkluderet studier, som bidrager med viden, som ikke er dokumenteret i en europæisk sammenhæng.

Sparsom dokumentation

Resultaterne af litteraturstudiet, som er skitseret i de fire kasser på næste side, viser, man i dag har ringe kendskab til dokumenterede effekter af at indføre og anvende dosispakning i sundhedsvæsenet.

Derfor vil det i fremtiden være en god ide at designe studier, der kan dokumentere effekterne: Bliver folk mindre syge? Indlægges de færre gange på sygehuse? Er der andre kvalitetsforbedringer? Studierne bør være kontrollerede undersøgelser, hvor effekten af maskinel dosispakning testes imod alternativer som ingen dosispakning eller manuel dosispakning.

Det kunne ligeledes være en god ide at gennemføre en grundig økonomisk analyse af indførelsen af maskinel dosisdispensering. Kun to af de studier, der beskæftigede sig med økonomiske vurderinger, var baseret på analyser, hvor man sammenlignede udgifterne før og efter indførsel af dosispakning.

Vi fandt heller ingen dokumentation for, at dosisdispensering i sig selv bidrager til, at brugeren i højere grad tager medicinen som foreskrevet af sundhedspersonalet. Anvendelse af dosis-



Dosispakning på pakkeapotek.

TEKNOLOGIEN:

- Opnåelse af øget sikkerhed som resultat af dosispakning er erfaringsbaseret – der er få konkrete data på området.
- Erfaringsmæssigt medfører dosispakning bedre overblik over medicineringen, større sikkerhed og bedre kontrol med ordinationer.
- Der ses kun ganske få fejl ved udførelse af dosisdispensering.
- Sikkerheden ved dosispakning kan kompromitteres, da der er påvist store uoverensstemmelser mellem medicinjournal og doseringskort. Det gælder i 17-40 procent af tilfældene.
- Mængden af medicinspild og kassation falder ved dosispakning.
- Brugere kan have problemer med håndtering af dosispakker.
- Der er ingen dokumentation for, at dosispakning i sig selv fremmer patienternes rette brug af medicinen.
- Der foreligger ingen beviser for, at dosispakning resulterer i bedre helbred; f.eks. via målinger af antal sygedage, indlæggelser m.v.

ORGANISATION:

- De sundhedsprofessionelle er tilfredse med de forskellige dosispakningsordninger.
- Dosispakninger er organisatorisk tidskrævende, og der opnås kun tidsbesparelser i begrænset udstrækning.
- Organisatoriske barrierer for dosisdispensering: Manglende samarbejde mellem de involverede faggrupper, uklare arbejds- og ansvarsfordelinger, manglende information, utilstrækkelig deling af data, uafklaret økonomi og utilstrækkelige fysiske rammer.

PATIENTER:

- Personer med kognitiv-, mental-, psykisk- og fysisk svækkelse er potentielle brugere af dosispakket medicin, hvori mod alder og boform ikke er indikationer i sig selv.
- Brugere er stort set tilfredse med de forskellige dosisdispenseringsordninger.
- Det er uklart om dosispakning medfører, at patienterne bedre selv er i stand til at håndtere deres medicin på rette vis.



ØKONOMI:

- Der kan være besparelser ved indførelse af dosispakning, primært på reducerede medicinudgifter og eventuelt personalebesparelse.



Ph.d. Lotte Stig Haugbølle er lektor ved Institut for Samfundsfarmaci.



Ph.d. Birthe Søndergaard er lektor ved Institut for Samfundsfarmaci.



Cand.scient.san., sygeplejerske Anne Lee er MTV-forsker ved Center for Anvendt Sundhedstjenesteforskning og Teknologivurdering på Syddansk Universitet.

pakning sammen med reduktion i antallet daglige doseringer, patientuddannelse, medicingennemgang og individuelle mediciningsstrategier kan derimod øge graden af korrekt brug af lægemidlerne.

Organisatoriske konsekvenser

I dag foreligger der kun en begrænset dokumentation på, hvordan dosisdispensering påvirker de organisationer og grupper, som kommer i berøring med teknologien; f.eks. apoteker, praktiserende læger og patienter. Derfor er en tværfaglig projektgruppe med repræsentation fra Syddansk Universitet, Danmarks Farmaceutiske Universitet og Pharmakon i gang med en større

interview- og spørgeskemaundersøgelse blandt de berørte parter omhandlende dette emne. Specielt spørgeskemaundersøgelsen, der udføres blandt de kommuner i Danmark, som er længst mhp. implementering og maskinel dosisdispensering, har et fremadrettet sigte og vil således beskrive de gode løsninger, som den enkelte kommune har fundet for at gøre ordningen til en succes.

Samtidig gennemfører vi en registerundersøgelse, som skal afklare, hvilke patienter der anvender maskinelt pakket medicin, hvilken medicin de bruger, og hvordan deres kontakt til sundhedssektoren er. Undersøgelsen kan også vise, hvor mange potentielle brugere, der egentlig er til denne ordning.

THE DANISH
DANMARKS
UNIVERSITY OF
FARMACEUTISKE
PHARMACEUTICAL
UNIVERSITET
SCIENCES



Lægemiddelforskning

udgives af Danmarks Farmaceutiske Universitet

Redaktion

Mette Rasmussen (ansvarshavende), Jesper Munck, Rolf Haugaard

Grafik/illustrationer

Henning Dalhoff (13, 22, 26, 27); Jens Raadal (6, 8, 9, 18, 20, 21);

Henning Christensen (1), PeterB, www.rundekunst.de (5)

Fotos

Susanne Bendixen (36, 37); Tina Hoff Duedal (7); Dan Stærk (10).

Fotos af artikelforfattere: Annette Houman og Jesper Munck.

Grafisk design og produktion

ProGrafica as

ISSN 0905-0051

Danmarks Farmaceutiske Universitet

Universitetsparken 2

2100 København Ø

Tlf · 35 30 60 00

Fax · 35 30 60 01

E-mail · dfuni@dfuni.dk

Internet · www.dfuni.dk

