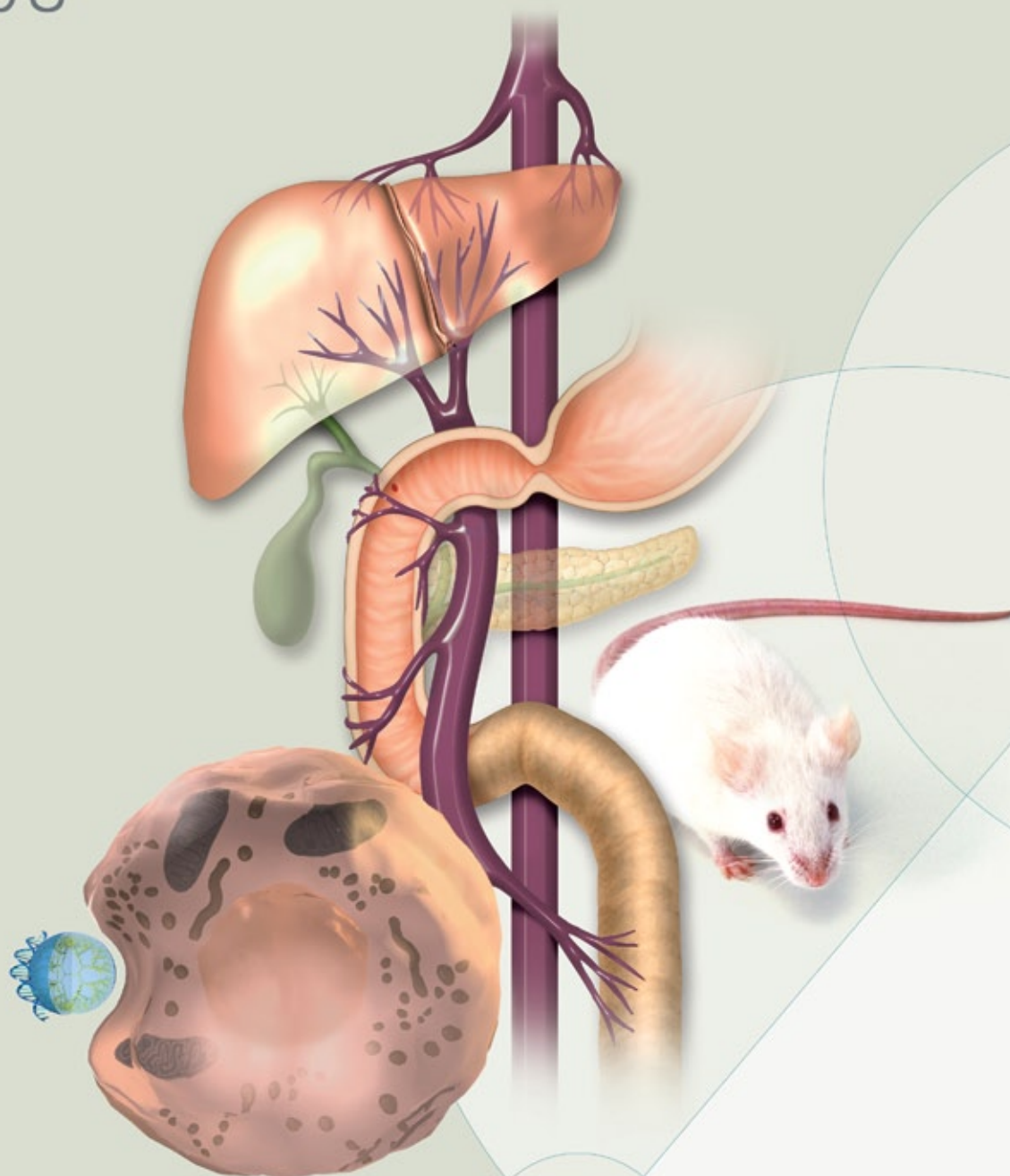




Lægemiddelforskning

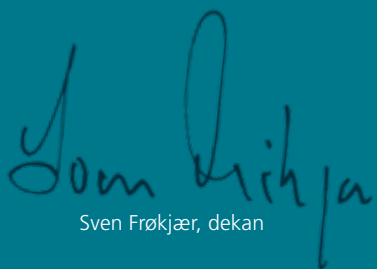
2008



Et godt helbred er livsvigtigt for det enkelte menneske – og borgernes sundhed og en effektiv sygdomsbehandling er samtidig af afgørende betydning for samfundet som helhed. Derfor spiller såvel udvikling af nye lægemidler som optimal lægemiddelanvendelse en stor rolle i dagens Danmark.

Det Farmaceutiske Fakultet på Københavns Universitet har som den eneste uddannelsesinstitution i landet lægemidler i fokus for forskning og uddannelse. I et tæt samarbejde med andre fakulteter på Københavns Universitet, den farmaceutiske og bioteknologiske industri, apotekervæsenet, hospitalsvæsenet og den øvrige offentlige sundhedssektor arbejder vi konstant på at udvikle de farmaceutiske videnskaber til gavn for studerende, ansatte og den samlede sundhedssektor.

Det er vores håb, at nærværende udgave af Lægemiddelforskning illustrerer nogle af vigtige udfordringer, der ligger inden for lægemiddelområdet og samtidig giver en bredere kreds af læsere et indblik i en række af de spændende forskningsprojekter, der udspringer af Det Farmaceutiske Fakultet.



Sven Frøkjær, dekan

Gymnasieklassebesøg

Formålet med besøgsordningen er at give eleverne mulighed for at se, hvordan kemi og biologi i gymnasiet anvendes i lægemiddelforskningen på Det Farmaceutiske Fakultet. Det sker i et møde med både studerende, forskere og undervisere på Det Farmaceutiske Fakultet, og derved håber vi at kunne give inspiration til den daglige undervisning. Et besøg består to faglige foredrag, en rundvisning og et studenteroplæg om farmaceutuddannelsen og universitetslivet. I øjeblikket er vi i gang med at udbygge gymnasiebesøgsordningen med tilbud om laboratorie- og regneøvelser. Læs mere på www.farma.ku.dk/gymnasier

På www.farma.ku.dk/lmf kan man hente inspiration i de tidligere årgange af Lægemiddelforskning. Her kan du også finde en emnefortegnelse og foretage fuldttekstsøgning i årgangene 1999-2008.

På www.farma.ku.dk optræder – i forbindelse med Det Farmaceutiske Fakultet's tre institutter – en gennemgang af Fakultetets forskningsområder.

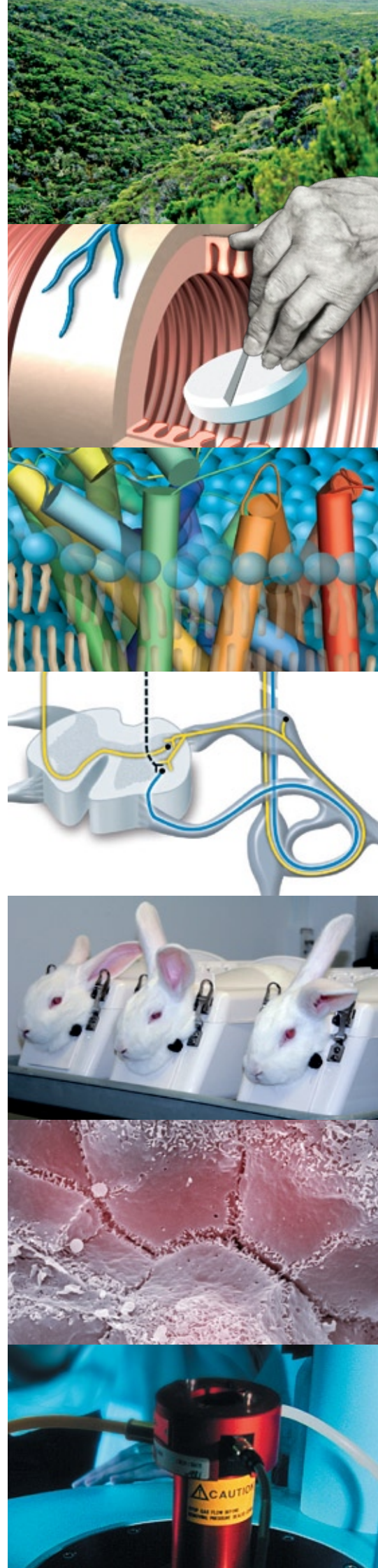
På www.farma.ku.dk/farmaceut er der information om farmaceutuddannelsen og dens mange erhvervsmuligheder.

Ønskes yderligere trykte eksemplarer af Lægemiddelforskning?

Send din bestilling til bestil@farma.ku.dk

Indhold

1 Lægemidler fra naturstoffer: fortid eller fremtid? <i>Af Jerzy W. Jaroszewski, Søren Brøgger Christensen, Henrik Franzky, Dan Stærk og Hanne L. Ziegler</i>	4-6
2 Ø-planter: Unik evolution – spændende indholdsstoffer <i>Af Anne Adersen og Henning Adersen</i>	7-9
3 Protein-protein interaktioner – et nyt mål for udvikling af lægemidler <i>Af Anders Bach, Marie Gottschalk, Anders S. Kristensen og Kristian Strømgaard</i>	10-12
4 Dendritiske nanostrukturer som transportører af genetisk medicin <i>Af Linda Boye Jensen, Hanne Mørck Nielsen og Camilla Foged</i>	13-15
5 Metode til screening af modificerede proteinlægemidler under opbevaring <i>Af Charlotte Petersen, Lene Jørgensen, Susanne Hostrup, Jens Thstrup Bukrinsky og Sven Frøkjær</i>	16-18
6 Fra SIMS til Biosims – et computerspil om lægemiddelstoffers biotilgængelighed <i>Af Bente Steffansen og Luise Kvisgaard Gram</i>	19-21
7 GABA-transportører – håb om bedre epilepsibehandling <i>Af Karsten Kirkegaard Madsen, Rasmus Prætorius Clausen, Orla M. Larsson og Arne Schousboe</i>	22-24
8 Ny human GABA-transportør – et muligt mål for behandling af epilepsi <i>Af Bolette Christiansen, Trine Kvist, Anders A. Jensen og Hans Bräuner-Osborne</i>	25-27
9 Computeren viser vejen til et nyt potentielt lægemiddel <i>Af Kasper Harpsøe, Birgitte H. Kaae, Thomas Balle, Darryl S. Pickering og Jette S. Kastrup</i>	28-30
10 Risiko for hjerteflimmer afsløres med computermodel <i>Af Olivier Taboureau, Søren Brunak og Flemming Steen Jørgensen</i>	31-33
11 Forbrugernes rapporter giver ny viden om lægemiddelbivirkninger <i>Af Lise Aagaard, Doris I. Stenver og Ebba Holme Hansen</i>	34-36
12 Har apotekerne tjek på inhalationen? <i>Af Susanne Kaae, Birthe Søndergaard og Lotte Stig Haugbølle</i>	37-39
13 Forsøg med leverceller kan redde menneskeliv <i>Af Lassina Badolo</i>	40-42
14 Nedfrysning af immunceller kan overflødiggøre forsøgskaniner i lægemiddelkontrol <i>Af Michael Timm, Lise Moesby og Erik Wind Hansen</i>	43-45
15 Nye depotlægemidler til injektion i gigtramte led: kan laboratoriemodeller reducere antallet af dyreforsøg? <i>Af Anna Buus Frost, Susan Weng Larsen, Jesper Østergaard og Claus Selch Larsen</i>	46-48
16 Ufølsomme hjerter i livsfare <i>Af Marie Louise Muus Ghorbani, Bjarne Fjalland, Majid Sheykhzade og Niels C. B. Nyborg</i>	49-51
17 Modelstoffer – forskning i selens kræftforebyggende mekanismer <i>Af Charlotte Gabel-Jensen og Bente Gammelgaard</i>	52-54
18 Lægemidlers effekt på fedtnedbrydning kan måles i rotter <i>Af Signe Mølhøj, Kjell Malmlöf, Thue Johansen og Harald S. Hansen</i>	55-57





Lægemidler fra naturstoffer: fortid eller fremtid?

Billedet viser en NMR-magnet, som udgør hoveddelen af HPLC-SPE-NMR-apparatet på Det Farmaceutiske Fakultet. Højtrykssvæskrokromatografi (HPLC) bruges til at adskille stoffer i komplekse blandinger, fx ekstrakter af naturlig oprindelse. Stofferne isoleres ved hjælp af fastfaseekstraktion (SPE), og NMR-spektroskopi anvendes til at opklare strukturen af de rene naturstoffer. Det kombinerede HPLC-SPE-NMR-apparat kan analysere komplekse ekstrakter på få dage.

Naturen har traditionelt været den vigtigste kilde til nye lægemidler, men efterhånden er screening af ekstrakter af mikroorganismer og planter erstattet af screening af syntetiske stofbiblioteker. Men krisen kradser i den farmaceutiske industri. Tiden er inde til at bringe naturstoffer tilbage på banen.

Af Jerzy W. Jaroszewski, Søren Brøgger Christensen, Henrik Franzyk, Dan Stærk og Hanne L. Ziegler

Den globale lægemiddelindustri er i krise. Der registreres overraskende få nye lægemidler, og ofte er der tale om nye anvendelser eller modifikationer af gammelkendte stoffer. Krisen kompliceres yderligere af, at et stigende antal lægemiddelkandidater må forkastes på et så sent stadium i udviklingsprocessen, at store investeringer har været spildt. Konsekvensen er, at pipelinen tørrer ud. I de seneste år er der blevet markedsført færre end 20 nye lægemidler per år - en halvering i forhold til 1990'erne.

I de seneste årtier har medicinalindustrien ledt efter nye "mirakelkure" for at opnå øget produktivitet og indtjening, og der er blevet satset stærkt på brugen af teknologiske nyskabelser såsom kombinatorisk kemi, automatiseret screening af store syntetisk fremstillede stofbiblioteker samt biostruktur-baseret design.

Miraklerne er dog udeblevet, og de fordele, som forventedes af sekvenseringen af det humane genom, lader stadig vente på sig. Forsøg på at reducere omkostningerne gennem omfattende fusioner har tilsyneladende heller ikke løst problemerne. Disse alarmsignaler burde anspore medicinalindustrien til at finde nye indgangsvinkler til lægemiddeludvikling eller vende tilbage til tidligere succesfulde veje. En af mulighederne kunne være udvikling af mere effektive metoder til undersøgelse af ekstrakter af bakterier, svampe, planter og andre levende organismer.

Traditionel lægemiddelforskning

Traditionelt har naturstoffer været den vigtigste inspirationskilde til udvikling af nye lægemidler. En tredjedel af alle nye lægemidler baseret på små organiske molekyler, som blev godkendt på verdensplan i perioden fra 1981-2006, var naturstoffer eller derivater af naturstoffer. Blandt antibiotika og anticancermedier er andelen endnu højere. Selv om naturstoffer i mange tilfælde kan bruges som lægemidler direkte eller efter en kemisk modifikation - såkaldt semisyntetiske stoffer - skal de ofte gennemgå en lang videreudvikling, hvor medicinalkemikere fremstiller et mere effektivt lægemiddel med færre bivirkninger. Medtager man disse rent syntetiske stoffer fremstillet med inspiration i en naturstofstruktur, kan ca. to tredjedele af samtlige lægemidler markedsført i ovenstående periode spores tilbage til naturstoffer.

I lyset af ovenstående er det bemærkelsesværdigt, at naturstofforskning praktisk taget er ophørt i de store veletablerede medicinalvirksomheder, så den nu kun varetages af akademiske miljøer og mindre, ofte nystartede, virksomheder.

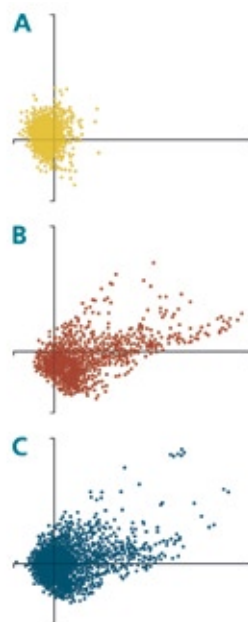


Illustration af kemisk diversitet af forskellige stofbiblioteker. Øverst syntetiske stoffer fremstillet ved hjælp af kombinatorisk kemi, i midten naturstoffer og nederst anvendte lægemidler. Der ses stor lighed mellem de to sidste grupper, hvorimod syntetiske stoffer udfylder en mindre del af det "kemiske rum".

Grunden til den ringe interesse for naturstofbaserede *drug discovery*-programmer i de store farmaceutiske selskaber er antagelig praktiske vanskeligheder såsom problemer med at teste naturlige ekstrakter i moderne systemer til *high-throughput screening*. Dette skyldes bl.a., at naturlige ekstrakter som regel indeholder store mængder polyphenoler og lipider, som giver anledning til vildledende resultater.

Kemisk diversitet fra naturen

En meget anvendt metode til opdagelse af nye lægemidler er at undersøge, om stoffer i et stofbibliotek har farmakologisk aktivitet. Disse stofbiblioteker kan karakteriseres ved deres kemiske diversitet, som afspejler, i hvor høj grad stofferne enten ligner eller er forskellige fra hinanden, og i hvilken grad stofbiblioteket repræsenterer de teoretiske muligheder,

JAGT PÅ NYE LÆGEMIDDELSTOFFER I INDUSTRIEN

En række højteknologiske metoder har medført, at den farmaceutiske industri har satset massivt på udvikling af syntetiske lægemiddelstoffer:

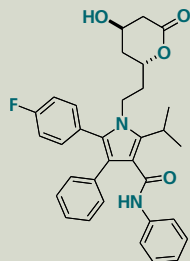
Kombinatorisk kemi er hurtig syntese af store stofsamlinger. Metoden går ud på at kombinere et antal små molekyler på alle mulige måder. Fx vil 10 forskellige aminosyrer kunne kombineres på $10 \times 10 \times 10$ måder og danne 1000 forskellige tripeptider. Hovedbegrænsningen i kombinatoriske stofsamlinger er ringe kemisk diversitet, fordi de fremstillede stoffer oftest er nært beslægtede.

High-throughput screening er farmakologisk testing af stofsamlinger i stor skala. I robotbaserede anlæg kan tusindvis af stoffer testes i løbet af én dag.

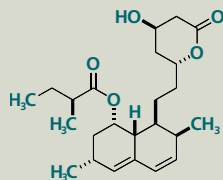
Biostrukturbaseret design er design af lægemiddel-molekyler baseret på tilpasning til strukturer af kendte receptorer eller andre proteiner, der fungerer som mål for lægemidler.

VERDENS BEDST SÆLGENDE LÆGEMIDDEL HAR OPRINDELSE I NATURSTOFFER

Atorvastatin, udviklet af Pfizer og bl.a. markedsført under navnet Lipitor®, er verdens bedst sælgende lægemiddel – det indtjener ca. 13 milliarder dollar om året.



Atorvastatin, et milliard-dollar molekyle. Atorvastatin hæmmer biosyntesen af kolesterol og anvendes imod forhøjet kolesterolniveau og heraf afledte hjertesygdomme.



Lovastatin – et naturstof produceret af *Aspergillus terreus* og andre svampe – gav sammen med beslægtede stoffer, såkaldte statiner, inspiration til fremstilling af atorvastatin.

hvorpå atomerne kan arrangeres.

De kombinatoriske stoffbiblioteker, som kemikere skaber i laboratoriet, udviser imidlertid kun en ringe del af den kompleksitet, som naturen tilbyder. Ved statistiske metoder er det muligt at sammenligne naturstoffers molekylære egenskaber med kombinatoriske stofsamlings og anvendte lægemidlers. En sådan sammenligning (se side 5) viser, at eksisterende lægemidler og naturstoffer ligner hinanden meget, hvorimod syntetiske stoffer fremstillet ved hjælp af traditionel kombinatorisk kemi udfylder en mere afgrænset del af det kemiske rum.

Nye teknologier i naturstofforskning

En af de store udfordringer ved opdagelse af nye biologisk aktive naturstoffer er, at en organisme kan producere forskellige naturstoffer under varierende forhold, dvs. at kemodiversiteten i en organisme påvirkes af det ydre miljø. Dette skaber flere udfordringer. Dels kan kemisk udforskning af en bestemt organisme rammes af manglende reproducerbarhed, dels vil en undersøgelse foretaget under visse forhold kun afsløre en brøkdel af den mulige kemodiversitet i form af nye naturstofstrukturer.

Øget kendskab til biosyntesen af naturstoffer og dens genetiske styring har åbnet nye muligheder, specielt for stoffer som produceres af bakterier og svampe. Ved genetisk manipulation af mikroorganismernes biosynteseveje er det muligt at opnå nye og uventede naturstofstrukturer. Der er allerede fremstillet hundredvis af nye "unaturlige naturstoffer" ved hjælp af

kulturer af mikroorganismer dyrket i laboratoriet. Samtidig udforskes nye naturlige miljøer – økologiske nicher – for organismer, som kan producere ukendte og spændende naturstoffer under de særlige forhold, der hersker i disse nicher.

Småt er godt ved strukturoptælling

For at kunne udforske ovennævnte nye muligheder må man være i stand til at strukturoptællare selv små mængder naturstoffer i meget komplekse blandinger. Ved at anvende nye strukturoptællingsteknikker, der kun kræver små mængder biologisk materiale, undgås tidskrævende og kostbar dyrkning eller indsamling i større skala. Samtidig bliver anvendelsen af sjældne organismer eller udryddingstruede planter både praktisk muligt og økologisk acceptabelt.

Den vigtigste metode til strukturoptælling af naturstoffer er kernemagnetisk resonansspektroskopi (NMR). Traditionelt har NMR-spektroskopiske analyser krævet flere milligram stof, men isolering og oprensning af milligram-mængder af rene naturstoffer kræver ofte måneders arbejde samt store mængder af det naturlige udgangsmateriale. Sidst, men ikke mindst resulterer arbejdet tit i isolering af allerede kendte naturstoffer, hvilket oftest er spild af tid.

Naturstofgruppen på Det Farmaceutiske Fakultet udvikler nye NMR-metoder, som gør det muligt på få dage at skabe udførlig viden om selv de naturstoffer, som kun er til stede i meget ringe mængde i naturlige ekstrakter – endda uden at isolere stofferne i traditionel forstand. Dette er muligt ved at kombinere NMR med væskechromatografi (HPLC), der adskiller stofferne, samt fastfaseekstraktion (SPE) i én integreret arbejdsproces, som er hurtig og effektiv. Arbejde, der før tog måneder, kan nu gennemføres på få dage. Derved ydes der også et tiltrængt bidrag til den ellers langvarige dereplikation – en proces i udforskningen af biologisk aktive prøver med henblik på at identificere og eliminere allerede kendte bestanddele.

HPLC-SPE-NMR er således en af de teknologier, som kan være med til at bringe naturstoffer tilbage til *drug discovery*-programmerne i den farmaceutiske industri.

Brug for flere strenge

Naturstofgruppen udvikler også andre teknologier, som kan medvirke til at effektivisere jagten på nye lægemiddelkandidater. Således arbejder vi med avancerede metoder til syntese af naturstofanaloger, automatiserede syntesemetoder til at danne stoffbiblioteker med øget kemodiversitet, udvikling af forbedrede testsystemer til bestemmelse af biologisk aktivitet samt moderne analysemetoder til karakterisering af naturlægemidler. Alle disse metoder er små brikker i et større puslespil, som samlet skal give naturstoffer en hovedrolle i udviklingen af de næste generationer af lægemidler.

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

Ph.d. Søren Brøgger Christensen er docent på Institut for Medicinalkemi.

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

Ph.d. Dan Stærk er professor i bioorganisk kemi på Det Biomedicinske Fakultet på Københavns Universitet. Frem til den 1.9.2008 var Dan Stærk lektor på Institut for Medicinalkemi.

Ph.d. Hanne L. Ziegler er ansat på Novo Nordisk A/S. Frem til den 1.10.2008 var Hanne L. Ziegler adjunkt på Institut for Medicinalkemi.

Ø-planter: Unik evolution – spændende indholdsstoffer



Bjergregnskoven på Réunion er voksested for Embelia angustifolia. Planten benyttes i traditionel medicin og har vist sig at indeholde ACE-hæmmere, som virker blodtrykssænkende.

Planter fra oceaniske øer indeholder ofte interessante sekundære indholdsstoffer. Studier af planterne ligger i grænseområdet mellem medicinalkemi, botanik og evolutionslære, og resultaterne kan give spændende bidrag til alle fagene.

Af Anne Adersen og Henning Adersen

Planter har været de vigtigste lægemidler fra de tidligste kulturer hos så godt som alle folkeslag. Årsagen er, at mange plantearter ved udvortes eller indvortes brug har en biologisk virkning på grund af deres sekundære indholdsstoffer. I nogle tilfælde skyldes effekten et enkelt eller få stoffer, men ofte beror virkningen på et samspil mellem mange indholdsstoffer i planten. I dag indgår mange rene lægemiddelstoffer isoleret fra planter i konventionel medicin, mens mange planter og planteekstrakter anvendes i naturlægemidler og kosttilskud.

Den potentielle medicinske anvendelse af de aktive stoffer har forårsaget en veritabel jagt på nye forbindelser i planter. Der er stadig mange planter, som ikke er undersøgt, men efterhånden findes disse planter enten i afkroge af verden eller af planteriget.

Jo længere ud i krogen, desto dyrere bliver plantejagten, så der må lægges en strategi. En mulighed er at undersøge de

planter, som benyttes i traditionel medicin – den etnofarmakologiske strategi. Eller man kan lede, hvor der findes mange plantearter – for eksempel i regnskov. Eller man kan koncentrere sig om dele af planteriget, som er betydelig dårligere kendt end blomsterplanter og derfor mangelfuldt undersøgt for indholdsstoffer. Endelig kan man jage potentielle lægemiddelstoffer på steder, hvor der vokser mange arter, som ikke findes andre steder i verden.

Vælger man den sidstnævnte strategi, er det en god ide at søge på oceaniske øer, som aldrig har været en del af fastlandsskolen. Floraen på sådanne øer har sin oprindelse i arter, der har haft evne eller held til at passere oceanet og etablere en levedygtig bestand. Det gælder kun for få af fastlandets arter, og sammensætningen af planter afspejler ikke artsfordelingen på fastlandet. Når der kun er få arter på en ø, skabes der mulighed for udvikling af nye arter. Derfor vokser der mange endemiske arter på oceaniske øer – dvs.



På baggrund af indholdsstofferne i de æteriske olier fra de 15 arter af *Scalesia* er de indsamlede prøver sat op i et ordinationsdiagram. Lille afstand mellem punkterne i diagrammet er et udtryk for, at indholdet i de æteriske olier ligner hinanden meget. De ovale figurer viser, hvordan prøverne ved en anden metode, clusteranalyse, falder ud i 4 naturlige grupper. Den formodede stamform – *Scalesia affinis* (aff) – findes nederst i den grønne cirkel.

SEKUNDÆRE INDHOLDSTOFFER

Sekundære indholdsstoffer i planter er stoffer, som normalt ikke indgår i plantens almindelige stofskifte. En af grundsætningerne i evolutionslære er, at nedarvede træk, der ikke har positiv effekt for en population, før eller siden vil forsvinde ved naturlig selektion. Derfor er det også naturligt at stille spørgsmålet: Hvorfor indeholder planter sekundære indholdsstoffer?

Biologerne har flere forslag til svar. Mange sekundære stoffer, fx alkaloider, indeholder næringsstoffet nitrogen, som ofte findes i utilstrækkelig mængde i naturen. Det ser ud til, at nogle planter bruger disse forbindelser som et lager af nitrogen, der kan mobiliseres, hvis forsyningen svigter. Desuden spiller sekundære stoffer vigtige roller i planternes økologi: Blomsternes duft og farver, som medvirker til at tiltrække bestøvere, skyldes sekundære stoffer; giftige eller skarpt smagende stoffer holder planteædere på afstand; visse forbindelser hæmmer andre planter eller mikroorganismer og modvirker således konkurrence eller infektioner.

arter, som ikke findes andre steder – og disse arter kan være ret forskellige fra selv nære slægtninge på fastlandet. Fx er alle arter i de endemiske slægter af kurvplanter på Galápagosøerne træer eller buske – mens langt de fleste kurvplanter ellers er urter.

For os har strategien med at undersøge øfloraer ligget lige for, fordi det har været muligt at koble plantekemisk og farmakologisk forskning sammen med botaniske projekter. Vi har haft mulighed for at arbejde med floraen på Galápagosøerne i Stillehavet og på Réunion i det Indiske Ocean. På Galápagosøerne findes der ca. 600 plantearter, hvoraf 40 procent er endemer, og på Réunion vokser ca. 1000 arter, hvoraf 50 procent er endemer.

ACE-hæmmere i planter fra Réunion

På Réunion er der en rig tradition for brug af planter som lægemidler, og vi satte os for at undersøge, om de planter, som i den traditionelle medicin er anset for at være vanddrivende og/eller blodtrykssænkende, havde en hæmmende effekt på enzymet ACE (Angiotensin Converting Enzyme). ACE spiller en vigtig rolle i regulering af blodtryk og vandladning, og ACE-hæmmere anvendes i behandlingen af forhøjet blodtryk. Ydermere ville vi undersøge, om der var en højere hit-rate blandt traditionelt anvendte arter end blandt arter uden traditionel anvendelse.

Vi indsamlede 80 plantearter, hvoraf 54 blev anvendt traditionelt. De resterende 26 arter var alle endemiske arter uden traditionel anvendelse relateret til for højt blodtryk. Af de traditionelt anvendte arter var 44 procent aktive – dvs. de

Indsamling af bladmateriale af Scalesia divisa på Galápagosøerne under Galathea-ekspeditionen i 2007. Blomstrende skud af Scalesia baurii – en anden af i alt 15 endemiske arter på øerne.

hæmmede aktiviteten af enzymet med mindst 50 procent – mens 31 procent af arterne, der ikke blev brugt traditionelt, var aktive. Resultatet understøtter den traditionelle medicinske brug af 44 procent af arterne, et højt tal, ikke mindst i betragtning af at den påståede virkning ikke nødvendigvis skyldes en ACE-hæmmende effekt. Resultaterne viser også, at en indsamlingsstrategi baseret på både traditionel anvendelse og endemiske arter kan være et godt udgangspunkt i søgen efter nye lægemiddelstoffer.

I forbindelse med ph.d.-studier og specialestudier er der isoleret flere stoffer, såvel kendte som nye, med ACE-hæmmende aktivitet fra flere af de endemiske arter, der viste sig aktive i screeningen.

Evolution på oceaniske øer

Det er et karakteristisk træk for evolutionen på oceaniske øer, at artsdannelsen i mange tilfælde sker som en voldsom forgrening, der leder til mange nærtstående arter med en fælles stamfar, som på et eller andet tidspunkt er immigreret til øen eller øgruppen. Således er 469 endemiske plantearter på Hawaii fordelt på kun 20 planteslægter, og selv om der kan være sket flere immigrationer indenfor samme slægt, er der tale om en imponerende radiativ artsdannelse.

Oftentimes er det svært at udrede, hvorledes stamtræerne er udviklet, for selv om der i mange tilfælde er betydelig morfologisk eller økologisk forskel mellem arterne, så er variationsbredden inden for den enkelte art tit så stor, at det er svært at adskille arterne. Man har naturligvis forsøgt sig med DNA-analyser, men det har ofte vist sig, at den store morfologiske variation ikke er ledsaget af tilsvarende markante genetiske forskelle. Derfor kan analyser af sekundære indholdsstoffer være et vigtigt værktøj i taxonomien, som er læren om arternes slægtskabsforhold.

Æterisk olie i Scalesia fra Galápagosøerne

Den endemiske kurvplanteslægt Scalesia fra Galápagosøerne er et godt eksempel på, hvordan analyser af sekundære indholdsstoffer kan belyse slægtskabet mellem forskellige arter. Der findes 15 endemiske arter, og selv om morfologi og udbredelse og krav til omgivelserne er velbeskrevet, har man ikke et overbevisende billede af, hvorledes slægtskabsforholdet er. DNA-analyser har hidtil ikke givet brugbare resultater. Vi har derfor fokuseret på arternes indhold af æterisk olie. Vore tidligere undersøgelser tydede på, at sammensætningen af olien sammenholdt med de tilgængelige morfologiske og molekylære informationer kunne give et fingerpeg



om arternes udviklingshistorie. I forbindelse med Galathea-ekspeditionen har vi indsamlet nyt materiale fra næsten alle arter og har nu et stort materiale, der dækker flere indsamlinger af de enkelte arter fra forskellige lokaliteter og forskellige årstider.

De foreløbige resultater af analyserne viser, at der er et arts-specifikt mønster i sammensætningen af den æteriske olie, og at de 15 arter kan grupperes i fire grupper. Undersøgelsen antyder, at Scalesia affinis kunne være nærmest stamfaderen, og at de andre arter var udviklet herfra.

Tværfaglige resultater

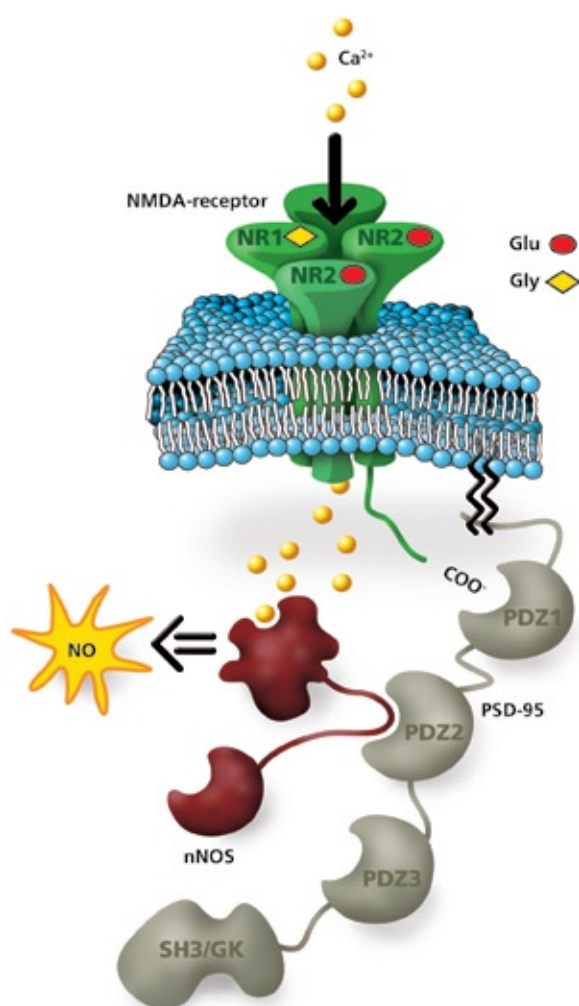
Studier af sekundære indholdsstoffer i planter fra øer har altså givet resultater på flere felter. Undersøgelserne på Réunion har bidraget med nye medicinskemiske data, og undersøgelserne på Galápagosøerne er med til at kaste lys over artsdannelsen på de øer, som var en vigtig inspirationskilde for Darwin i hans formulering af arternes oprindelse. Studierne ligger i grænseområdet mellem medicinskemi, botanik og evolutionslære, og resultaterne kan tages til indtægt for, at tværvideenskabeligt samarbejde kan give spændende bidrag til alle de indgående discipliner.

Cand.pharm. Anne Adersen er lektor på Institut for Medicinskemi.

Cand.scient. Henning Adersen er lektor på Biologisk Institut, Det Naturvidenskabelige Fakultet på Københavns Universitet.

Protein-protein interaktioner

– et nyt mål for udvikling af lægemidler



Store mængder calcium kommer ind i cellen, når NMDA-receptoren stimuleres af for meget glutamat. Herved overaktiveres enzymet nNOS, der danner stoffet nitrogen oxid (NO), som i store mængder dræber hjernecellerne. Proteinet PSD-95 er bindeleddet mellem receptoren og nNOS. Ved at hæmme vekselvirkningen mellem receptoren og PSD-95 kan man potentielt stoppe de skadelige virkninger af glutamat uden at ødelægge den normale funktion af NMDA-receptoren.

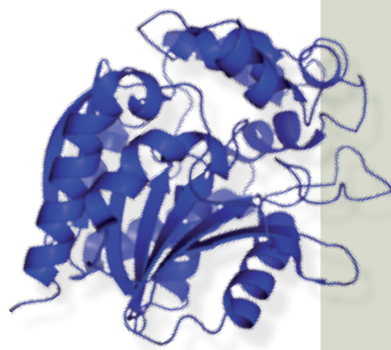
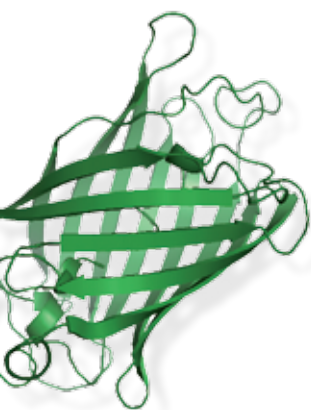
Lægemidler virker typisk ved at binde sig til proteiner – fx receptorer, som er involveret i en sygdomsproces – og stoppe deres skadelige funktioner. Desværre medfører strategien ofte bivirkninger. En ny metode går ud på at påvirke receptorernes samspil med proteiner inde i cellerne. Dette princip åbner for udvikling af lægemiddeltoffer til behandling af hjerneskader som følge af slagtilfælde.

Af Anders Bach, Marie Gottschalk, Anders S. Kristensen og Kristian Strømgaard

Lægemidler virker primært ved at binde til et eller flere af kroppens mere end 20.000 forskellige proteiner; især de proteiner der fungerer som receptorer eller enzymer. Efter bindingen aktiverer eller hæmmer medicinen proteinet afhængig af, hvilken sygdom der behandles. De fleste af nutidens lægemidler binder til proteiner, som sidder i cellernes membraner, hvor de fungerer som receptorer for kroppens signalstoffer og hormoner. Selv om denne metode hidtil har været succesfuld, er der i dag et stort ønske om at finde alternative strategier for udvikling af lægemidler.

Et af problemerne ved den traditionelle tilgang er nemlig, at den sygdomsrelevante receptor kan være så vigtig for kroppens almindelige funktioner, at en medicinsk blokering af receptoren fører til alvorlige bivirkninger. I de senere år er der derfor opstået stor interesse for en alternativ strategi, hvor lægemidlet ikke påvirker receptoren direkte, men i stedet ændrer de vekselvirkninger, som receptoren har med proteiner inde i cellen. Et eksempel på sådanne vekselvirkninger er protein-protein interaktioner, hvor to proteiner binder sig til hinanden for at udøve en fysiologisk effekt.

Protein-protein interaktioner finder sted i alle celler og menes bl.a. at være involveret i sygdomme som kræft og hjernesygdomme. I Kemisk Biologi-gruppen på Det Farmaceutiske Fakultet arbejder vi med studier af protein-protein interaktioner som nye mål for lægemidler, og vi sætter især fokus på proteinerne indbyrdes vekselvirkninger i hjernen. For en lang række hjernesygdomme såsom Alzheimers sygdom og slagtilfælde findes der i dag kun utilstrækkelige behandlingsmu-



ligheder, og derfor er der behov for at udvikle nye lægemidler, som kan behandle og afhjælpe disse sygdomme. Ved udviklingen af lægemiddelstoffer mod hjerneskader efter slagtilfælde har man fokuseret på at blokere for de signalstoffer i hjernen, der aktiverer de involverede receptorer. Herved beskyttes receptoren mod overaktivering, men desværre påvirkes receptorens normale funktion også, og det resulterer i uacceptable bivirkninger. Det har vist sig at være endog meget vanskeligt at finde en tilfredsstillende balance mellem den ønskede effekt på sygdommen og bivirkningerne.

Et fundamentalt anderledes princip for behandling af disse sygdomme er derfor at udvikle lægemidler, som forandrer receptorproteinets vekselvirkning med proteiner inde i cellen. På den måde påvirkes receptorens normale funktion ikke, mens den sygdomsfremkaldende effekt potentielt kan stoppes.

Bivirkninger kan undgås

Specifikt fokuserer vi på hjernens primære aktiverende signalstof – glutamat – som påvirker en række receptorer i hjernen, hvoraf en af de vigtigste er NMDA-receptoren. Denne receptor findes i membranerne på mere end 90 procent af alle nerveceller, og dens normale funktion er at lede calcium ind i nervecellen, når receptoren aktiveres af glutamat. Når et område i hjernen bliver skadet under et slagtilfælde, bliver indstrømningen af calcium via NMDA-receptoren imidlertid et problem. Det skyldes, at store mængder glutamat frigives fra de døde hjerneceller, hvorved signalstoffet overaktiverer NMDA-receptorerne i det omkringliggende raske væv, hvilket medfører et for højt niveau af calcium inde i cellerne. Resultatet er en giftig kædereaktion, som kan føre til, at cellerne dør, hvorved den akutte hjerneskade spredt sig voldsomt. De biokemiske processer bag celledøden kendes relativt godt. En afgørende mekanisme er, at calcium inde i cellen aktiverer enzymet nNOS, som danner stoffet nitrogen-oxid. Nitrogen-oxid er uhyre giftigt i store mængder, og der er påvist en direkte sammenhæng mellem forhøjet aktivitet af NMDA-receptoren, frigivelse af store mængder nitrogen-oxid og hjerneskader.

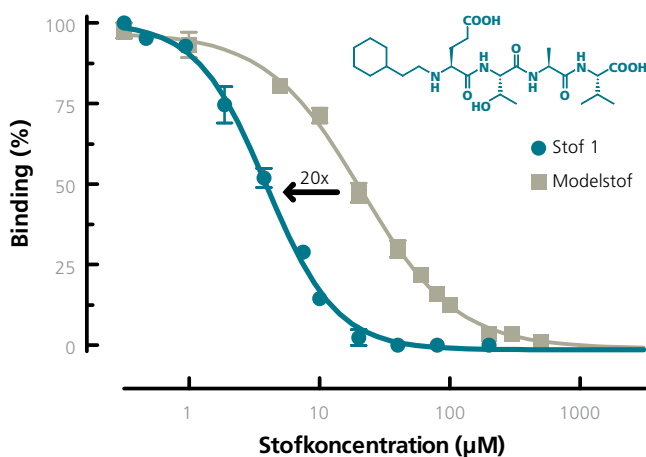
SIGNALSTOFFER, RECEPTORER OG SLAGTILFÆLDE

Signalstof: Signalstoffer (neurotransmittere) er kemiske forbindelser, som bruges af hjerneceller (neuroner) til at kommunikere med hinanden. Signalstofferne frigives af én celle og binder til en anden celledes receptor.

Receptor: Disse proteiner sidder i cellemembranen. Når et signalstof binder til en receptor, aktiveres receptoren, og et elektrisk signal opstår inde i cellen. Dette signal kan så kommunikeres videre til andre celler.

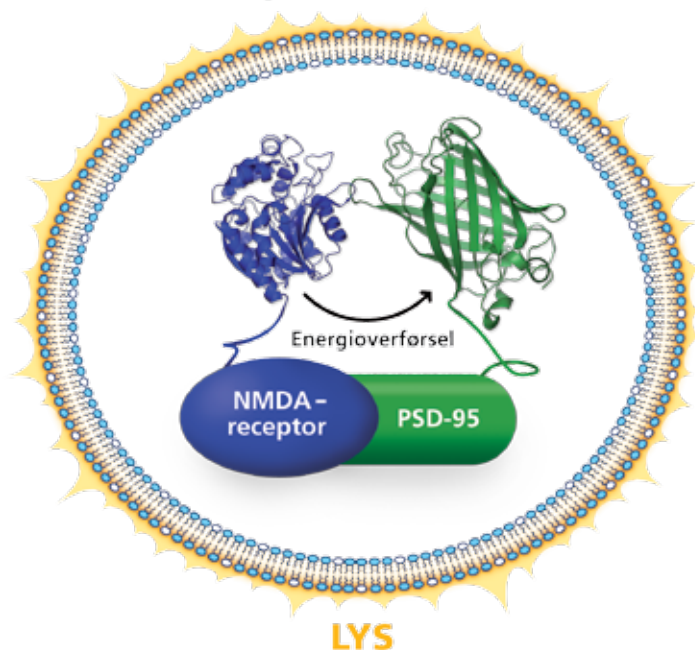
Glutamat: Aminosyren glutamat er det primære aktiverende signalstof i hjernen, og det udøver sin effekt ved at binde sig til glutamat-receptorer; deriblandt den type, som hedder NMDA-receptorer.

Overaktivering: Under et slagtilfælde kommer glutamat-holdige hjerneceller ud af kontrol og frigiver for meget glutamat. Derved overaktiveres glutamat-receptorerne på andre hjerneceller, og det sætter en kædereaktion i gang, som i sidste ende medfører, at cellerne dør. Denne proces menes at være årsag til de hjerneskader, der som regel opstår i forbindelse med slagtilfælde.

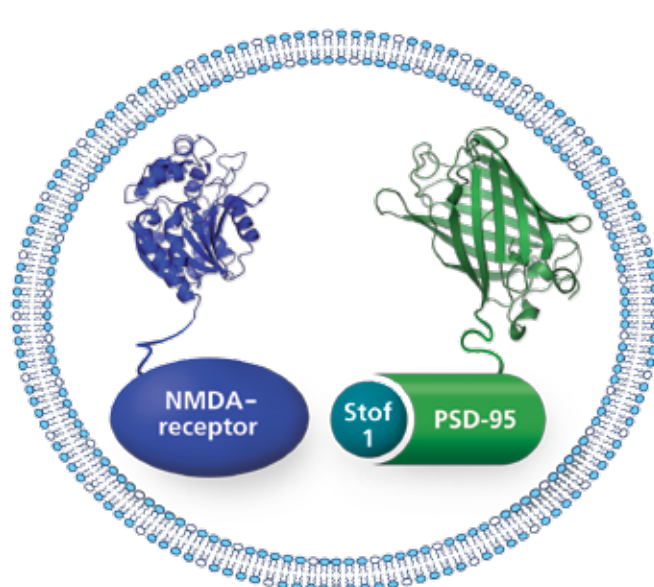


Med udgangspunkt i den kemiske struktur af den del af NMDA-receptoren, som binder til PSD-95, er det lykkedes at designe og fremstille en række stoffer, som binder meget potent til proteinet. Det bedste – stof 1 – binder 20 gange bedre til PSD-95 end NMDA-receptoren selv.

Protein-protein interaktion



Blokeret interaktion



Ved hjælp af metoden bioluminescence resonance energy transfer (BRET) kan man se, om lysende proteiner binder til hinanden inde i en levende celle. Når proteinerne er bundet til hinanden, kan energi overføres imellem dem, hvilket påvirker deres evne til at udsende lys. Ved at måle intensiteten af det udsendte lys, kan man således bestemme, i hvor høj grad stof 1 hæmmer protein-protein interaktionen mellem NMDA-receptoren og PSD-95.

Enzymet nNOS skal fysisk være tæt på NMDA-receptoren for at blive aktiveret og danne nitrogen-oxid. Den tætte kontakt opnås ved hjælp af proteinet PSD-95, som danner en bro mellem receptoren og enzymet. Der er allerede udviklet et modelstof, som kan bryde forbindelsen mellem enzymet og NMDA-receptoren, og en række forsøg har vist, at stoffet kan formindske skaderne efter et slagtilfælde, uden at den normale funktion af NMDA-receptoren påvirkes. Modelstoffet er et peptid, der kan trænge ind i cellen, og dette peptid er nu i klinisk udvikling for behandling af hjerneskader. Peptider er dog ikke optimale lægemidler, fordi de hurtigt nedbrydes i kroppen. Vores mål er derfor at udvikle stabile stoffer, som binder sig til PSD-95 og forhindrer, at proteinet kan danne bro mellem enzymet og NMDA-receptoren.

For at kunne finde stoffer, som kan frakoble PSD-95 fra NMDA-receptoren, har man brug for en metode til at måle, hvorvidt proteinet og NMDA-receptoren binder sig til hinanden. Vi har etableret en sådan metode – fluorescens polarisation – som med stor succes har været benyttet til at finde en række stoffer, som kan bryde interaktionen mellem PSD-95 og NMDA-receptoren. I laboratoriet har vi fremstillet en serie af stoffer, som er op til 20 gange mere potente end det stof, der er i klinisk udvikling. Stofferne er nu ved at blive patenteret.

Lovende lægemiddelstoffer

En ulempe ved metoden er, at NMDA-receptoren og PSD-95 er fjernet fra deres naturlige miljø inde i hjernecellen. Fluorescens polarisation kan således ikke bruges til at vurdere, om de udviklede stoffer kan frakoble proteinet fra NMDA-receptoren i levende celler. For at kunne bestemme dette har vi etableret en anden teknologi – bioluminescence resonance energy transfer – som tillader os at måle vekselvirkninger mellem proteiner, når proteinerne befinder sig inde i en inakt hjernecelle.

Teknologien er baseret på, at proteiner, der kan udsende lys, kan overføre lysenergi til andre proteiner, når proteinerne er meget tæt på hinanden. Derfor kan man ved at måle lysintensiteten fra celler, som indeholder et par lysende proteiner, bestemme, om disse to proteiner binder til hinanden. Desuden kan man måle, om et stof kan hæmme bindingen mellem proteinerne.

Vi har ved hjælp af genmanipulation introduceret lysende versioner af NMDA-receptoren og PSD-95 i levende celler. Vi kan således tilsætte vores aktive stoffer til cellerne og måle, hvor effektivt stofferne er i stand til at bryde vekselvirkningen mellem PSD-95 og NMDA-receptoren. De stoffer, som har en gunstig effekt, kan bruges i det videre arbejde med at udvikle dem til lovende lægemiddelkandidater til behandling af slagtilfælde.

Cand.scient. Anders Bach er ph.d.-studerende på Institut for Medicinalkemi.

Cand.scient. Marie Gottschalk er ph.d.-studerende på Institut for Medicinalkemi.

Ph.d. Anders S. Kristensen er lektor på Institut for Medicinalkemi.

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

Dendritiske nanostrukturer

som transportører af genetisk medicin

Syntetiske dendritiske nanostrukturer er attraktive som transportører af genetisk medicin. Dendrimere kan designes til at indkapsle det genetiske materiale, beskytte det under transporten gennem kroppen og frigive medicinen specifikt til de syge celler. Mange udfordringer skal dog løses, inden de nye lægemidler bliver klar til behandling af alvorlige sygdomme som leddegigt og kræft.

Af Linda Boye Jensen, Hanne Mørck Nielsen og Camilla Foged

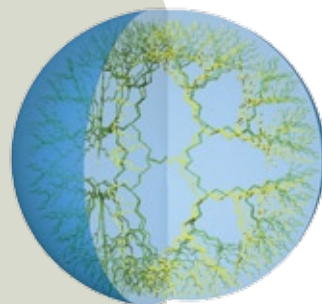
En dendrimer består af kaskader af gentagne strukturer, som udspringer fra en central kerne. Et godt eksempel på den dendritiske struktur er måden, hvorpå et træ fordeler sine grene og blade for at optage mest muligt sollys. Den samme struktur er til stede under jorden, hvor rødderne forgrener sig for at optage den maksimale mængde vand og næring til træet. Evolutionen har frembragt mange dendritiske strukturer i planter, dyr og mennesker. Det gælder også på det mikroskopiske plan; tænk bare på opbygningen af vores blodkar, som sikrer optimal fordeling af ilt til kroppens mange væv.

For godt 30 år siden blev de første dendrimere fremstillet ved kemisk syntese. Dendrimere er en klasse af polymerer baseret på et veldefineret kaskademotiv, og strukturerne blev navngivet ud fra de græske ord *dendron* som betyder træ/ forgrening og *meros* som står for del.

Den dendritiske effekt

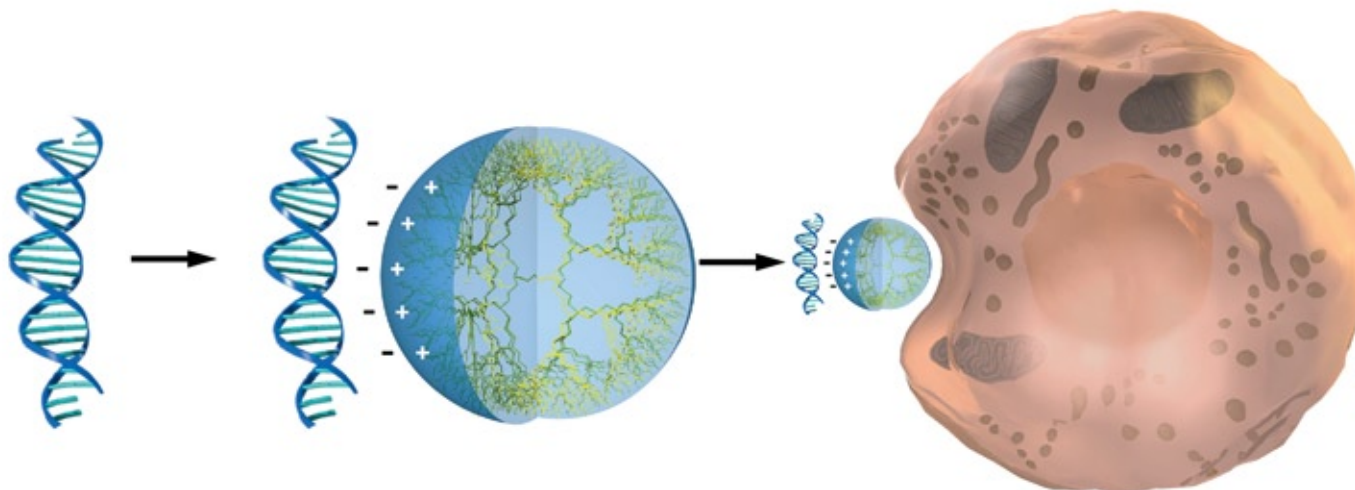
Dendrimers opbygning sikrer maksimal interaktion med omgivelserne, som det er tilfældet i træer og blodkar, hvor den forgrenede struktur øger overfladen med henblik på

Kemisk syntetiserede dendrimere består af en kerne med forgreningspunkter, hvor antallet af forgreninger bestemmer dendrimers størrelse og antal overfladegrupper. Det dendritiske motiv genfindes i træers kroner, som forgrener sig på en måde, så bladene får mest muligt sollys.



optag og fordeling. I nanoskala kan den dendritiske struktur give forbedret binding til en overflade. Eksempelvis er gekkoens fødder beklædt med flere milliarder små hår, som forgrener sig i et dendritisk netværk, der sætter dyret i stand til at stå fast på stort set alle overflader både i vand og luft. Tager man de enkelte hår hver for sig, har de ikke kraft nok til at holde gekkoen fast, men fordi myriader af hår er placeret tæt ved hinanden, opstår der en synergistisk effekt, som medfører, at den samlede kraft er tilstrækkelig. Man kan sammenligne med velcrolukninger, hvor tusinder af små løkker tilsammen har en enorm styrke.

Viruspartikler benytter en tilsvarende metode til at binde med høj affinitet til receptorer på en celled overflade, hvorefter virus kan trænge ind i cellen og sprede sin smitte. Kendskabet til denne smittemekanisme er for nylig blevet udnyttet til at udvikle et dendrimerbaseret lægemiddel mod seksuelt overførte sygdomme som AIDS og herpes. I det nye lægemiddel VivaGel® fungerer dendrimere ved at binde til virus, så viruspartiklerne ikke kan inficere kroppens celler. Det forventes, at produktet snarest kommer på markedet.



Interaktion mellem et siRNA-molekyle og en dendrimer ved elektrostatiske binding. Når kompleksets nettoladning er positiv, kan det binde sig til negativt ladede molekyler på celledens membran og derefter optages i cellen, hvor det genetiske lægemiddel aktiveres.

Genetisk nanomedicin

Genetisk medicin er baseret på DNA eller RNA. Når de genetiske byggesten kommer ind i cellerne, indgår de i cellens normale maskineri, og alt efter strategien bliver de brugt til at danne nye proteiner, som kan gøre cellen rask, eller til at hæmme de af cellens proteiner, som forårsager eller forværrer sygdommen.

Udfordringen for denne type behandling er, at de genetiske byggesten skal ind i cellerne for at virke. Dette er vanskeligt, fordi DNA og RNA er store negativt ladede molekyler, som i fri form hurtigt bliver fjernet af kroppens forsvarsmekanismer.

Desuden kan DNA og RNA på grund af molekyllernes størrelse og ladning ikke selv passere gennem celledens membran. Gruppen på Det Farmaceutiske Fakultet forsker i udvikling af dendrimerer som transportører af små interfererende RNA-molekyler (siRNA). Det er korte dobbeltstrengede stykker RNA, som specifikt og effektivt kan skrue ned for udvalgte gener i en celle. Projektet udføres i samarbejde med Ulrik Boas fra Veterinærinstituttet på DTU samt Michael Pittelkow og Jørn B. Christensen fra Kemisk Institut på Københavns Universitet, og det er en del af et større EU-projekt, MEDTRANS, der skal målrette nanomedicin specifikt til de sygdomme.

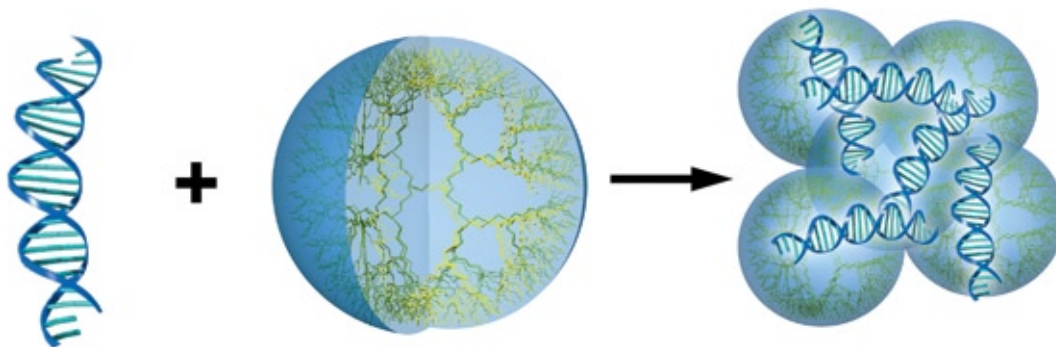
LEDDEGIGT – EN SMERTEFULD KRONISK LIDELSE

Leddegigt (reumatoid arthritis) er en betændelsestilstand, som oftest opstår i fingre, håndled, albuer og skuldre samt tæer, ankler og knæ. 1 ud af 100 voksne personer har sygdommen, som typisk forekommer hos folk over 40 år. Kvinder rammes oftere end mænd.

Leddegigt er en autoimmun sygdom, hvor kroppens eget immunforsvar går til angreb på leddene. Man ved ikke, hvorfor leddene bliver angrebet, men sygdommen forårsager stivhed, smerter og nedsat evne til at bevæge sig. Med tiden kan der dannes gigtknuder under huden nær de betændte led. Desuden kan brusk og knogler blive destrueret, hvilket deformere leddene, så sygdommen kan være direkte invaliderende.

De nuværende behandlinger forsøger at kontrollere symptomerne og forebygge yderligere skader på leddene, og de spænder fra smertestillende og anti-inflammatorisk medicin til kirurgiske indgreb. Målet med genetisk medicin er at nedregulere sygdomsrelaterede proteiner og derved neutralisere sygdommen, så smerte og knogledestruktion stoppes.





Dendriplex dannet ved elektrostatiske interaktion mellem forskellige siRNA- og dendrimermolekyler. Dette er en hypotetisk model, da der endnu ikke foreligger noget bevis for, hvordan dendriplexerne er opbygget molekylært.

domsramte celler via anvendelse af forskellige hjælpstoffer. Projektet fokuserer på behandling af leddegigt og kræft.

Dendrimerer som transportører

Kroppens immunforsvar er specialiseret i at genkende frit DNA og RNA, som kan være et tegn på infektion, og derfor vil terapeutisk RNA hurtigt blive nedbrudt i blodet – medmindre det beskyttes.

De funktionelle grupper på overfladen af dendrimererne kan bruges både til at beskytte siRNA under transporten gennem blodbanen og til at hjælpe den genetiske medicin ind i de sygdomsramte celler. Fx kan en positivt ladet dendrimer binde et negativt ladet siRNA molekyle og samtidig skabe kontakt til celleoverfladen, som også er negativt ladet.

En lovende mulighed er at anvende såkaldte dendriplexer, som kan dannes under veldefinerede eksperimentelle forhold. Dendriplexer er komplekser af flere siRNA-molekyler og dendrimerer. Ved at justere på ratioen af positive og negative ladninger for henholdsvis dendrimer og siRNA kan man danne komplekser, hvor siRNA beskyttes i midten af dendriplexet, mens overfladen er positivt ladet og i stand til at binde sig til cellemembraner.

Størrelsen på dendriplexet kan reguleres via dendrimerernes størrelse. Store dendrimerer med en høj ladningstæthed danner små kompakte dendriplexer med siRNA, mens mindre dendrimerer danner større komplekser med mindre veldefineret struktur. Dette er vigtigt, fordi dendriplexerne skal indsprøjtes i blodbanen, og her er det størrelsen, som bestemmer deres endelige skæbne. Meget små komplekser bliver hurtigt udskilt gennem nyrerne, men når kompleksene har en diameter på 100-200 nanometer, forbliver de i blodba-

nen, og med tiden ophobes dendriplexerne i de betændte led. Hvis kompleksene er endnu større vil de ikke få adgang til de betændte led, og man risikerer, at de sætter sig fast i nogle af de små og tynde kapillærer i kroppen.

Den næste udfordring efter lokalisering til det syge væv er, at dendriplexerne skal transporteres ind i de rette celler, hvor medicinen skal virke. Her kan man udnytte, at de sygdomsramte celler har mange receptorer, som cellerne bruger til at skaffe sig næring. Ved at målrette dendriplexernes overflade mod disse receptorer, så de binder sig til receptorerne, kan vi kopiere viruspartiklers multivalente binding og derved få medicinen sendt ind i de syge celler ved hjælp af den dendritiske effekt.

Fremtidige udfordringer

Dendriplexer er på nuværende tidspunkt lovende kandidater til avanceret medicinsk behandling af leddegigt og andre betændelsessygdomme samt forskellige typer af kræft. Men der er stadig mange udfordringer at arbejde med, før dendrimerbaserede lægemidler kan markedsføres.

På Det Farmaceutiske Fakultet anvender vi et cellulært modelsystem til at belyse struktur-funktions-sammenhænge mellem dendriplexernes karakteristika og deres effektivitet. Næste trin bliver at arbejde med at afskærme dendriplexerne mod de destabiliserende komponenter i blodbanen, så de kan nå frem til de sygdomsramte væv. Målet er at opnå en god beskyttelse af dendriplexerne samtidig med, at dendrimerernes binding til siRNA ikke må være for stærk. For dendriplexerne skal jo i sidste ende være i stand til at frigive lægemiddelstoffet, så det kan virke terapeutisk i de sygdomsramte celler.

*Cand.polyt. Linda Boye Jensen er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.
Ph.d. Hanne Mørck Nielsen er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.
Ph.d. Camilla Foged er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.*

Metode til screening af modificerede proteinlægemidler under opbevaring



Førstegenerations-proteinlægemidler forsøges i dag modificeret bl.a. for at opnå en forlænget virkning, så patienten ikke skal tage sin medicin så ofte. Ved udvikling af de forbedrede lægemidler kan der spares tid og penge, hvis proteins stabilitet under opbevaring kan relateres til let målbare parametre i laboratorieforsøg.

Af Charlotte Petersen, Lene Jørgensen, Susanne Hostrup, Jens Thostrup Bukrinsky og Sven Frøkjær

Før et stof kan anvendes som lægemiddel, skal det formuleres som fx en tablet, en salve eller injektionsvæske. Lægemidlet består således både af det virksomme lægemiddelstof og forskellige hjælpestoffer. Hjælpestoffernes funktion kan være at opløse lægemiddelstoffet, dække over en ubehagelig smag eller lugt, konservere eller stabilisere lægemiddelstoffet samt at gøre det teknisk muligt at fremstille lægemiddelformen.

I proteinlægemidler er det aktive lægemiddelstof et protein. Det er som regel nødvendigt at administrere proteinlægemidler som injektionsvæsker, fordi proteiner nedbrydes i mave-tarmkanalen.

Modificering af proteiner

Når et proteinlægemiddel injiceres, vil proteinet cirkulere i blodet en vis tid, som i nogle tilfælde kan forlænges ved at modificere proteinet. Fordelen er, at lægemidlet vil virke i længere tid, hvorfor patienten ikke skal tage sin medicin så hyppigt. Proteinets cirkulationstid i blodet kan fx øges via PEGylering eller acylering, hvor henholdsvis en polymer eller en fedtsyrekæde bindes til proteinet.

En tredje form for modifikation er glycosylering, som er en naturligt forekommende modifikation, hvor en sukkergruppe kobles til proteinet. Humane proteiner, der anvendes medicinsk, fremstilles normalt i cellekulturer med gensplejede bakterieceller, gærceller eller pattedyrsceller, som har fået indsat det humane gen, der koder for proteinet. De sukkergrupper, som kobles på proteinet under produktionen, vil dog variere fra værtselle til værtselle, og derfor kan suk-

kergrupperne på et protein i et lægemiddel være anderledes end sukkergrupperne på det naturligt forekommende protein i raske mennesker.

Det er imidlertid ønskeligt, at proteiner, der gives som lægemidler, minder mest muligt om de naturligt forekommende menneskelige proteiner, og derfor benytter den farmaceutiske industri i stigende omfang humane celler til fremstilling af medicinske proteiner. Det kan betyde, at sukkergrupperne på andengenerationslægemidler er forskelligt fra sukkergrupperne på førstegenerationslægemidler.

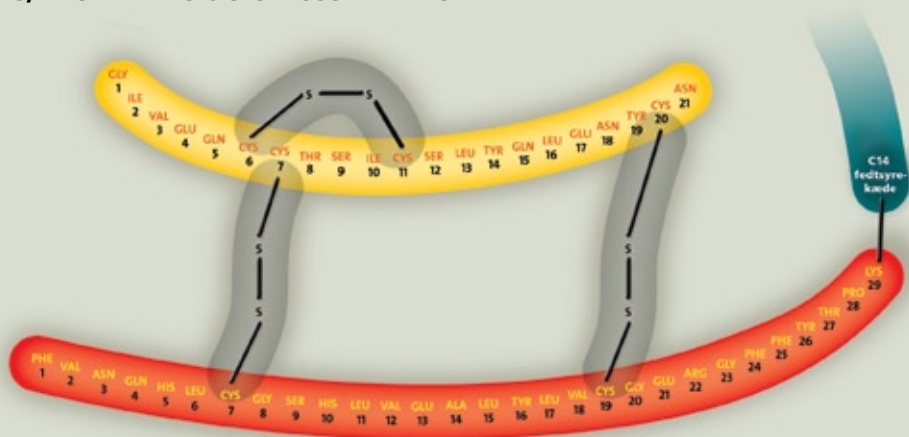
PROTEINER OG PROTEINLÆGEMIDLER

Proteiner er cellernes arbejdsheste og byggesten, og de er essentielle for alle levende organismer. Vore celler kan indeholde tusindvis af forskellige proteiner med mange forskellige funktioner. Nogle proteiner udgør de strukturelle dele af celler og væv, mens andre er hormoner eller fungerer som antistoffer eller som enzymer, der katalyserer en masse forskellige reaktioner.

Raske mennesker danner selv de proteiner, som kroppen har brug for, mens syge mennesker kan være ude af stand til det. Et eksempel er personer med type 1-diabetes, som ikke kan danne proteinet insulin. Insulin er med til at sørge for, at vores celler kan optage glukose, og insulin er derfor et meget vigtigt protein. Proteiner er opbygget af 20 naturligt forekommende α -amino-syrer, som sættes sammen i en lang polymerkæde som perler på en snor. Der kan være flere tusinde aminosyrer i polymerkæden. I ethvert protein folder kæden sig sammen på en helt bestemt måde, hvilket giver proteinet en unik rumlig struktur, som er afgørende for, at det kan fungere korrekt.

Det er en stor udfordring at formulere proteinlægemidler, fordi proteins tredimensionelle struktur er meget følsom overfor varme, rystelser, pH, hjælpestoffer og temperaturændringer.

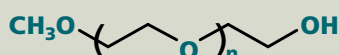
ACYLERING, PEGYLERING OG GLYCOSYLERING



Ved **acylering** bindes en fedtsyre kæde til proteinet. Formålet er typisk at opnå en længere virkningstid. Acyleringen øger proteinets affinitet til serum albumin i blodet, og det medfører, at proteinets cirkulationstid i blodbanen øges. I nogle tilfælde inducerer acylering også selvassociering, hvor proteinet danner komplekser med sig selv, hvilket vil forøge virkningstiden yderligere.

Eksempelvis øger fedtsyrekæden C14 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$) insulins cirkulationstid i blodbanen.

Ved **PEGylering** bindes en polymer af polyethylenglycol (PEG) til proteinet. Det PEGylerede protein udskilles langsommere gennem nyrerne, fordi molekylet er større, og desuden beskytter polymeren proteinet mod nedbrydning i kroppen.



Strukturformel for polymeren af polyethylenglycol, der kobles til proteiner for at øge proteiners cirkulationstid i blodet. Eksempelvis øger PEGylering Interferon- α s cirkulationstid i blodbanen.

Ved **glycosylering** kobles sukkermolekyler til proteinet. Glycosyleringsmønstret afhænger af, hvilken type organisme proteinet fremstilles i.

EPO er et eksempel på et proteinlægemiddel, der først blev produceret med sukkergrupper, som er forskellige fra de humane, men som nu produceres som humant EPO.

Proteinadsorption

Proteiner består af både hydrofile (vandelskende) og hydrofobe (vandskyende) aminosyrer, hvilket gør dem grænsefladeaktive. En grænseflade opstår, når en opløsning kommer i kontakt med et fast stof, en gas eller en væske, som ikke er blandbar med opløsningen.

De hydrofile dele af proteinet vil helst befinde sig i vand, mens de hydrofobe dele helst vil opholde sig ved grænsefladen for at undgå kontakt med vandet. Derfor søger proteiner i vandig opløsning normalt mod grænseflader, hvor de adsorberes og akkumuleres. Den primære drivkraft bag proteinadsorption til en hydrofob overflade er vekselvirkningen mellem proteinets hydrofobe aminosyrer og grænsefladen, men tiltrækningen mellem modsat rettede ladninger på proteinet og grænsefladen har også betydning.

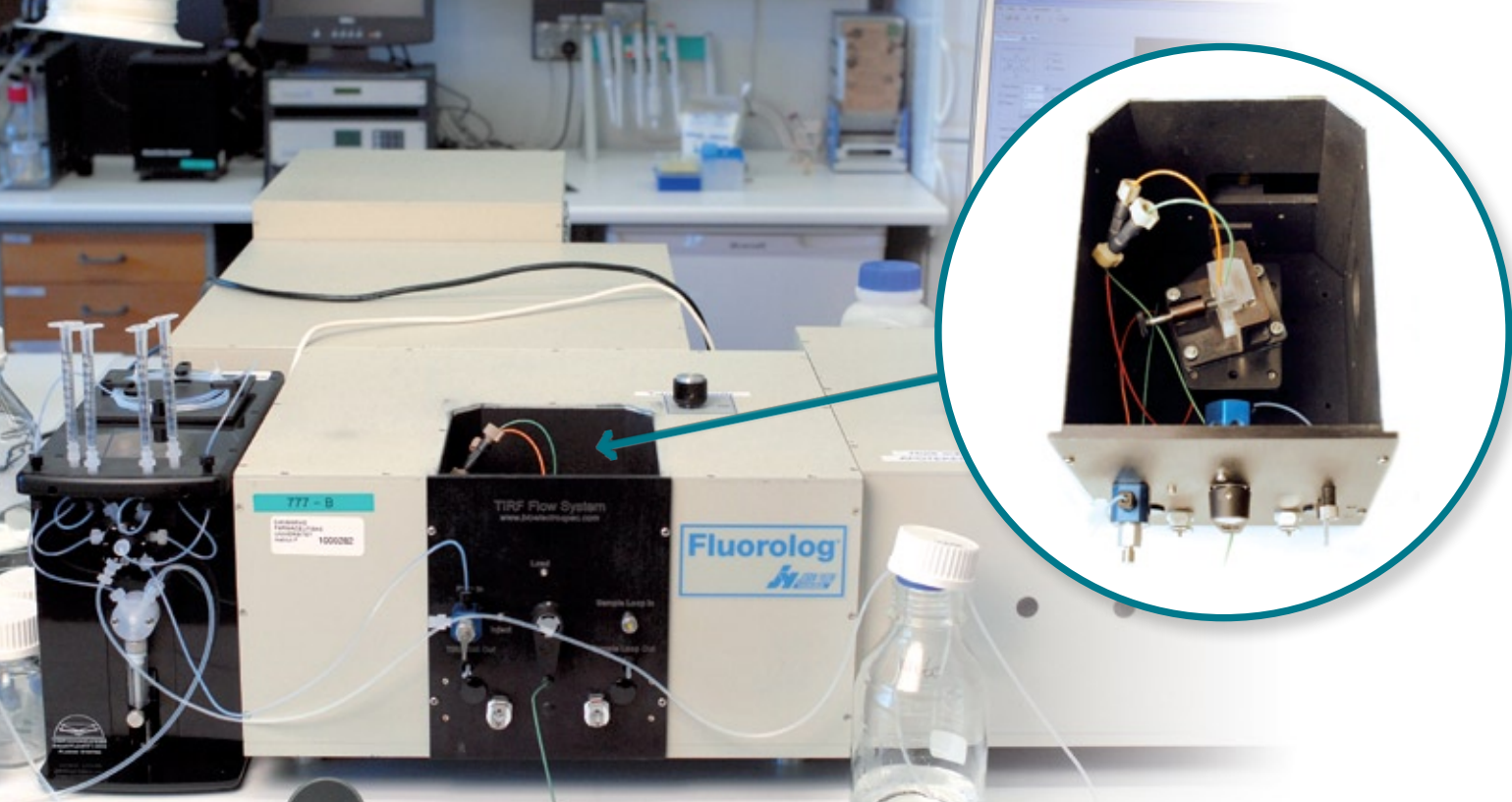
Adsorption af proteiner i en lægemiddelbeholder vil føre til et fald i koncentrationen af det terapeutiske protein i beholderen – og dermed også i blodet efter administration. Det er uønsket, da det er vigtigt, at patienten får den tilsigtede mængde lægemiddelstof. Et andet problem i forbindelse med adsorption er, at proteiners rumlige struktur typisk æn-

dres. Det skyldes, at proteinet ofte udfolder sig en smule ved grænsefladen for at øge kontaktfladen mellem de hydrofobe aminosyrer og den hydrofobe overflade. Hvis de adsorbere proteiner i lægemiddelbeholderen udbyttes med proteiner fra opløsningen, kan det resultere i, at der kommer proteiner med en ændret rumlig struktur ud opløsningen i beholderne. Det kan betyde, at de terapeutiske proteiner bliver biologisk inaktive.

Modificerings effekt på proteinadsorption

I laboratoriet undersøger vi effekten af acylering, PEGylering og glycosylering på adsorption af proteiner fra vandig opløsning til faste overflader. Målet er at udvikle en model, der kan bruges til at forudsige adsorption af proteiner fra vandig opløsning til faste overflader i fx beholdere.

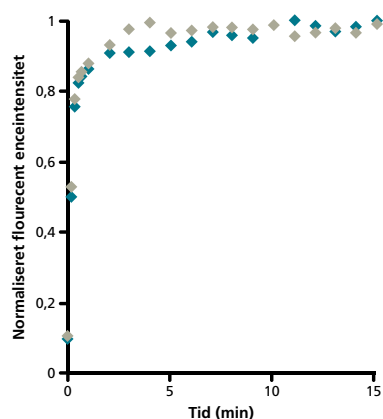
PEGylering vil normalt gøre proteinet mere hydrofilt, og derfor forventes PEGylering at mindske adsorptionen til hydrofobe overflader. Omvendt øger acylering proteiners hydrofobicitet, og derfor forventes acylering at øge proteiners adsorption til hydrofobe overflader. Glycosylering gør ligesom PEGylering normalt proteinet mere hydrofilt, og derfor



TIRF apparatet på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi bestemmer proteins adsorption til overflader ved hjælp af fluorescens. Til højre: Nærbillede af TIRF cellen i prøvekammeret.

forventes glycosylering at mindske proteinadsorptionen til hydrofobe overflader. Mængden af adsorberet protein på en overflade kan måles i laboratoriet ved hjælp af fluorescens – udsendelse af lys ved elektronovergange i molekyler. Vi anvender et specielt eksperimentielt set-up kaldet Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF), som kun belyser proteiner på overfladen. Vi har undersøgt adsorptionen af et protein uden sukkergrupper og et protein med fem påsatte sukkergrupper. Indtil

videre har resultaterne vist, at påsætningen af sukkergrupper ikke påvirker adsorptionen af det anvendte modelprotein. De foreløbige resultater understøtter ikke vores teori. Der er dog så mange faktorer, som kan påvirke adsorptionen, at det er nødvendigt med yderligere forsøg for med sikkerhed at kunne udtale sig om, hvorvidt proteinadsorption vil kunne anvendes som en parameter for proteins stabilitet under opbevaring.



Fluorescensmåling med teknikken Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) er her anvendt til at bestemme adsorption af to varianter af et protein til en overflade. Figuren viser adsorption af proteinet med henholdsvis 0 og 5 sukkergrupper. Koncentrationen er ens for de to varianter. Desto højere fluorescensintensitet desto mere protein er adsorberet.

◆ Grå: 0 sukkergrupper.
◆ Blå: 5 sukkergrupper.

*Cand.pharm. Charlotte Petersen er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.
Ph.d. Lene Jørgensen er adjunkt på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.
Ph.d. Susanne Hostrup er ansat på Novo Nordisk A/S
Ph.d. Jens Thostrup Bukrinsky er ansat på Novo Nordisk A/S
Professor Sven Frøkjær er dekan på Det Farmaceutiske Fakultet.*

Fra Sims til Biosims

- et computerspil om lægemiddelstoffers biotilgængelighed

Computermodeller, som matematisk beskriver alle mulige vekselvirkninger mellem et lægemiddelstof, der indtages i en tablet, og de fysiologiske forhold i mave-tarmkanalen over tid, kan gøre det muligt at simulere i hvilket omfang og med hvilken hastighed lægemiddelstoffet absorberes og når frem til sit virkningssted i kroppen.

Af Bente Steffansen og Luise Kvisgaard Gram



Lægemiddelstoffer, som indtages gennem munden, skal passere tarmvæggen for at nå ud i blodet, der transporterer stoffet hen til virkningsstedet i kroppen. Et komplekst samspil mellem lægemiddelstoffets molekulære egenskaber og de fysiologiske forhold i mave-tarmkanalen afgør, om stoffet sendes ud i blodet eller ej. I dag er det uhyre svært at spå om et givet lægemiddelstofs skæbne, fordi det er forskelligt fra stof til stof, hvilke faktorer og vekselvirkninger, der er afgørende for succes eller fiasko.

Ved udvikling af nye lægemidler og behandlingsstrategier er det imidlertid ønskeligt at blive i stand at forudsige et lægemiddelstofs evne til at passere tarmvæggen – helst på et tidligt tidspunkt i den lange og kostbare udviklingsproces. Derfor udvikles der nu computermodeller, som matematisk kan beskrive alle mulige kombinationer af samspil, der over tid

kan finde sted mellem et lægemiddelstof indgivet via munden som en tablet og de fysiologiske forhold i mave-tarmkanalen. Målet er at kunne simulere et givet stofs biotilgængelighed, dvs. i hvilket omfang og med hvilken hastighed lægemiddelstoffet passerer tarmvæggen og når frem til sit virkningssted.

For at udvikle sådanne computermodeller må man afdække og matematisk beskrive alle involverede faktorer og bestemme, hvilke faktorer, som i deres samspil har betydning for et givet lægemiddelstofs absorption og biotilgængelighed. Næste trin er så at designe en slags "computerspil", som efter input fra "spilleren" kan simulere lægemiddelstoffers absorption og derudfra afgøre, om spekulative forskningsstrategier er relevante for optimering af potentielle lægemiddelstoffers absorption gennem tarmvæggen.

ANTIBIOTIKA OG KEMOTERAPEUTIKA

Mange antibiotika i tabletform, som bruges til at slå infektioner ned, absorberes gennem tarmvæggen til blodet via transportører. Et eksempel på en sådan transportør er den proton-afhængige peptidtransportør (PEPT1), hvis naturlige funktion er at sende de små peptider, som proteiner i føden nedbrydes til, gennem tarmvæggen og ud i blodet.

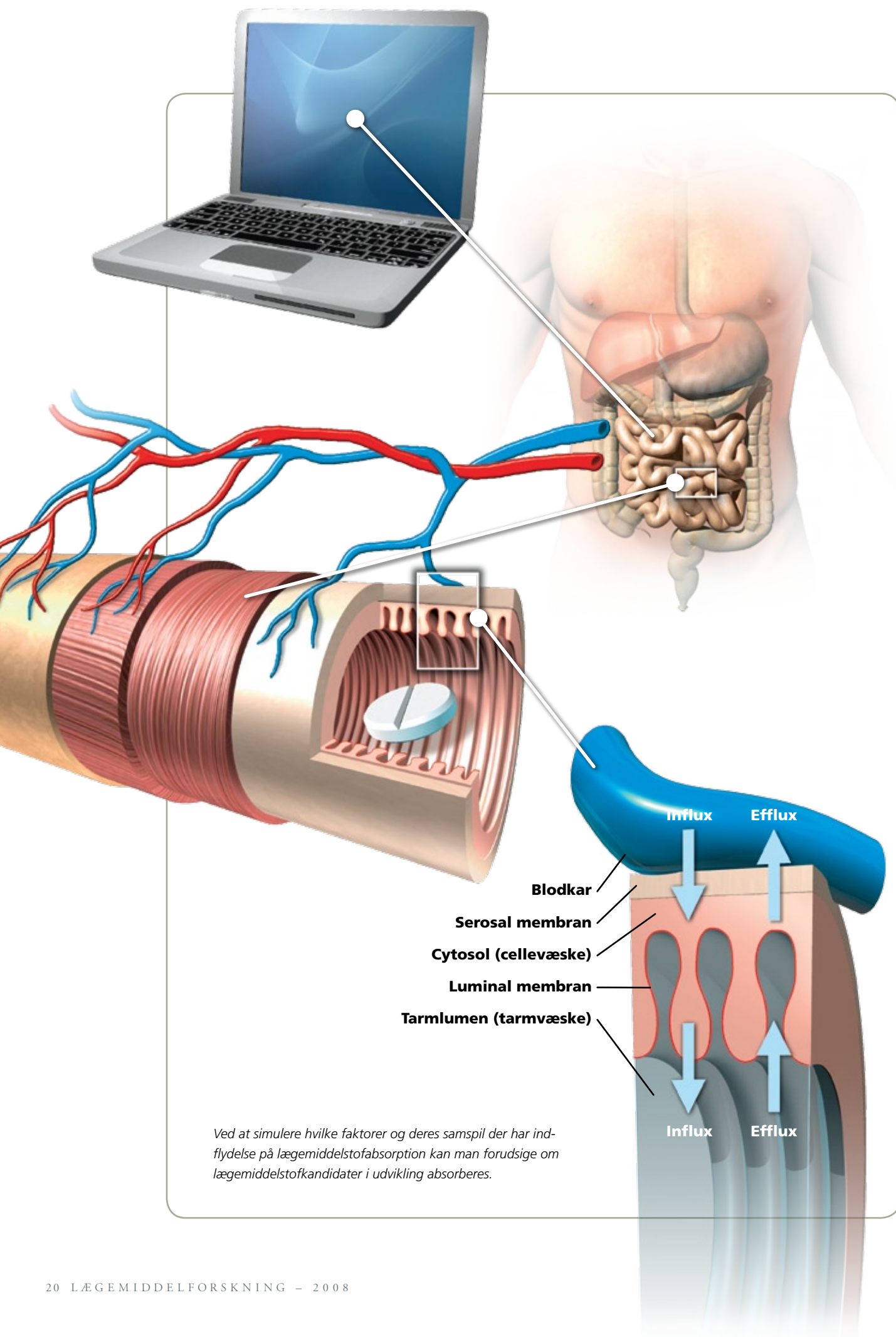
Tarmvæggen indeholder også udsmidningstransportører, der skal beskytte kroppen mod skadelige stoffer, som ikke må cirkulere i blodbanen. Disse transportører sørger for, at stofferne sendes tilbage til tarmvæsken, hvorfra de udskilles med afføringen. I nogle tilfælde sker det samme for lægemiddelstoffer, fx en række toksiske lægemiddelstoffer som anvendes i behandlingen af kræft.

Mange lægemiddelstoffer vil have et samspil med membrantransportører, hvorfor deres absorption og biotilgængelighed kan afhænge af en eller flere transportører. Hvis

to lægemiddelstoffer bliver givet til en patient samtidig, og hvis de begge vekselvirker med samme transportør, kan de påvirke hinandens absorption og biotilgængelighed. Det kan medføre, at patienten ikke behandles optimalt.

Ved at have kendskab til hvilke strukturelle egenskaber hos lægemiddelstoffer, der spiller sammen med bestemte membrantransportører, samt hvor hurtigt og med hvilken kapacitet stofferne transporteres, kan man danne sig et indtryk af de involverede transportørers betydning for lægemiddelstoffernes absorption og biotilgængelighed. Antallet af transportører i tarmen er ikke konstant over tid, men kan opreguleres og nedreguleres, hvilket fx kan være hormonelt styret. Når disse informationer lægges ind i et biosimuleringsprogram, som også indeholder informationer om andre faktoreres indflydelse på absorption og biotilgængelighed, kan man forhåbentlig i fremtiden udvikle mere sikre lægemiddelstoffer både hurtigere og billigere, end man kan i dag.





SAMSPIL MELLEM FAKTORER - OG VEJEN TIL SUCCES

Princippet i biosimuleringsmodeller om lægemiddelabsorption kan sammenlignes med computerspillet Sims. Ved at spille Sims får man et godt indtryk af hvilke faktorer og samspil mellem disse der giver en Sims-familie succes. Ved at bruge biosimuleringsmodeller om lægemiddelstofabsorption får man et godt indtryk af hvad der skal til for at designe et lægemiddelstof som kan absorberes med succes.



Tværfaglig europæisk ekspertise

En god biosimuleringsmodel kræver, at man har et overordentlig godt kendskab til, hvilke faktorer der er af betydning for lægemiddelstoffers absorption og biotilgængelighed. Derfor er det absolut nødvendigt, at mange forskellige eksperter bidrager med deres viden til modellerne. Netop dette er hensigten med det Europæiske Biosimuleringsnetværk, BIOSIM, som består af en lang række forskere fra universiteter og virksomheder i Europa. Vi er så heldige og dygtige at være en del af netværket, som ledes af den danske fysikprofessor Erik Mosekilde fra Danmarks Tekniske Universitet. Mosekilde er højt anerkendt for sin store ekspertise inden for modellering og simulering af en række biologiske processer. Vi bidrager til BIOSIM med eksperimentelt opnået viden om, hvorledes membrantransportører i tarmvæggen påvirker lægemiddelstoffers absorption og biotilgængelighed. Transportørerne er placeret i tarmcellevæggen, enten ind imod tarmvæsken eller ud mod blodbanen, og deres biologiske funktion er at bidrage til optagelsen af næringsstoffer fra tarmvæsken til blodet. Desuden holder transportørerne regnskab med, hvilke stoffer der kan få adgang til blodet, således at stoffer, som kroppen ikke bryder sig om eller tåler, sendes

tilbage til tarmen, hvorfra de udskilles med afføringen.

Biosimuleringsmodeller

Det er muligt at købe de første biosimuleringsmodeller, som kan anvendes til at simulere absorption af lægemiddelstofkandidater: det amerikanske udviklede program GastroPlus og det europæiske udviklede Simcyp. Det er vigtigt, at sådanne programmer hele tiden opdateres, så den nyeste eksperimentelle viden omkring lægemiddelabsorption beskrives og undersøges på en sådan måde, at resultaterne kan implementeres i modellerne.

Det Europæiske BIOSIM-projektet er mere ambitiøst og handler ikke kun om at simulere absorption af lægemiddelstoffer, men også om at simulere forskellige lægemiddelstoffers behandlingseffekt. Således arbejdes der fx på at simulere, hvorledes man kan optimere behandlingen af cancer med lægemidler ved at undersøge og modellere kræftcellers døgnrytme, fordi man har vist, at behandlingen er mest effektiv på bestemte tidspunkter i cellernes døgnrytme. På verdensplan er det overordnede mål at lave simuleringsprogram, som man kunne kalde det digitaliserede menneske.

*Ph.d. Bente Steffansen er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.
Ph.d. Luise Kvisgaard Gram er farmakokinetiker på Novo Nordisk A/S.*

GABA-transportører

– håb om bedre epilepsibehandling

Epilepsi skyldes overaktivitet i nervecellernes kommunikation. Medicinsk blokering af hjernecellernes GABA-transportører kan indirekte hæmme nervecellers kommunikation, og ny forskning skaber håb om, at mekanismen kan udnyttes til udvikling af bedre lægemidler med færre bivirkninger.

Af Karsten Kirkegaard Madsen, Rasmus Prætorius Clausen, Orla M. Larsson og Arne Schousboe

Epilepsi omfatter adskillige neurologiske sygdomstilstande, der enten fører til kramper eller absencer, som mest kendes fra børn, der bliver fraværende i korte perioder. Behandlingen af epilepsi er ofte livslang og kun symptomatisk – de epileptiske anfald forhindres, men den underliggende årsag til sygdommen forbliver ubehandlet. Selv med grundig kontrol og vejledning kan 30-40 procent af epileptikerne ikke behandles i tilstrækkelig grad til at blive anfaldsfrie, og de betegnes derfor som terapieresistente.

Årsagen til epilepsi menes at være en ubalance i hjernen mellem de signalstoffer, der henholdsvis aktiverer og hæmmer nervecellernes indbyrdes kommunikation. Ubalancen skyldes mangel på hæmmende impulser. Derved bliver for mange nerveceller aktiveret på en gang, og den normale hjerneaktivitet forhindres. I stedet opstår der en ukontrollabel overaktivitet i dele af eller i hele hjernebarken, hvilket resulterer i et epileptisk anfald.

GABA i synapsespalten

Nervecellernes kommunikation sker i synapsespalten mellem cellerne. Nerveimpulserne kommer fra nervecellen på den pre-synaptiske side og videregives til nervecellen på den post-synaptiske side. Nerveceller, som udsender det hæm-

mende signalstof GABA, dæmper aktiviteten hos nabonervecellerne.

Efter at GABA har udøvet sin virkning, bliver signalstoffet aktivt transporteret ind i den pre-synaptiske nervecelle eller ind i de omkringliggende gliaceller. Gliaceller er nervecellernes hjælpeceller, som tilfører næringsstoffer til nervecellerne og fjerner affaldsstoffer, og som desuden bidrager til kommunikationen mellem nerveceller. Når GABA er fjernet fra synapsespalten, slutter det inhibitoriske signal, og synapsen er således klar til endnu en signalproces.

Den aktive transport af signalstoffet væk fra synapsespalten sker ved hjælp af proteiner i hjernecellernes membraner, som kaldes for transportører. I mennesket findes der fire GABA-transportører, der betegnes GAT1, BGT1, GAT2 og GAT3. De samme transportører findes også i mus og rotter samt andre dyrearter, og vor viden om GABA-transportørernes placering omkring synapsespalten stammer især fra studier i mus og rotter.

GABA-systemet og epilepsi

Såfremt epilepsi skyldes en for lav mængde inhibitoriske impulser, kan man forsøge at manipulere med GABA-systemet for at øge de inhibitoriske impulser og dermed forebygge epileptiske anfald. Et muligt mål for sådanne lægemidler er de post-synaptiske GABA-receptorer, og her findes der en række stoffer, som direkte kan aktivere receptorerne, uanset om GABA er til stede i synapsespalten eller ej. Disse stoffer øger mængden af hæmmende impulser og modvirker på den måde epileptiske anfald. Men desværre er denne behandlingsstrategi forbundet med mange bivirkninger, fordi den direkte aktivering af GABA-receptorerne giver et for kraftigt inhibitorisk signal.

En indirekte tilgang går ud på at hæmme GABA-transport-

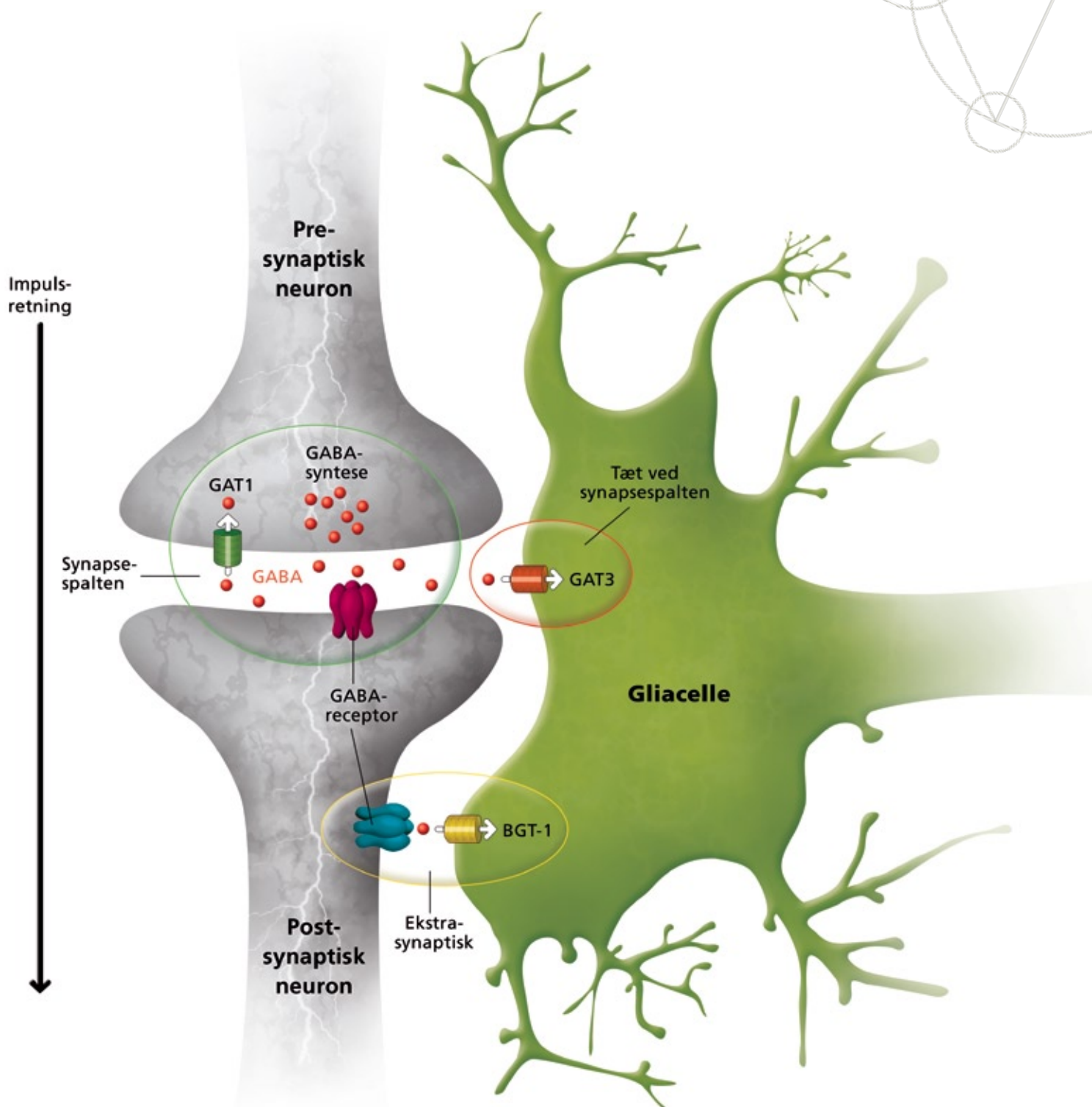
NERVECELLERS KOMMUNIKATION – AKTIVERING OG HÆMNING

I hjernen kommunikerer milliarder af nerveceller i et kompliceret netværk, der ultimativt sætter os i stand til at tænke og handle.

Principielt kommunikerer nerveceller på to niveauer; eksitatorisk eller inhibitorisk. De eksitatoriske impulser aktiverer nervecellerne til kommunikation, hvorimod de inhibitoriske impulser hæmmer kommunikationen. En nervecelle får input fra et antal af omkringliggende nerveceller, og det er integrationen af de samlede impulser,

som styrer, hvorvidt den pågældende nervecelle viderebringer kommunikationen.

Kommunikationen sker ved hjælp af kemiske signalstoffer, der syntetiseres i nervecellen og frigives ud i synapsespalten, hvorefter signalstoffet bindes til receptorer på den modtagende nervecelle og derved udøver sin effekt. Signalstofferne glutamat og GABA (γ-aminosmørsyre) medierer henholdsvis aktiverende og hæmmende impulser i størstedelen af hjernen.

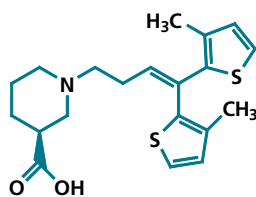


Figuren viser en synapse, hvor GABA fungerer som signalstof. GABA syntetiseres i den pre-synaptiske nervecelle, som frigiver signalstoffet til synapsespalten. Her bindes signalstoffet til GABA-receptorer på den post-synaptiske nervecelle, hvilket giver anledning til et inhibitorisk signal til modtagercellen. Signalstoffet fjernes fra synapsespalten af transportører, der enten sender stoffet ind i den pre-synaptiske celle eller ind i gliaceller. Tre af de fire humane GABA-transportører er indtegnet. GAT1 sidder på den pre-synaptiske nervecelle i synapsespalten, GAT3 sidder på gliaceller tæt ved synapsen, hvorimod BGT1 sidder på gliaceller udenfor synapsen.

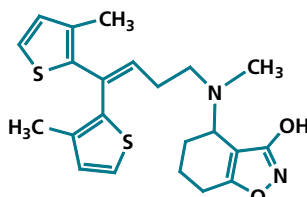
SCREENING AF POTENTIELLE LÆGEMIDDELSTOFFER

Lægemiddelstoffer til behandling af epilepsi kan identificeres i relevante screeningsmodeller i mus og rotter, og nogle modeller kan endda fortælle os, om et potentielt lægemiddelstof vil virke mod en bestemt type epilepsi i mennesker.

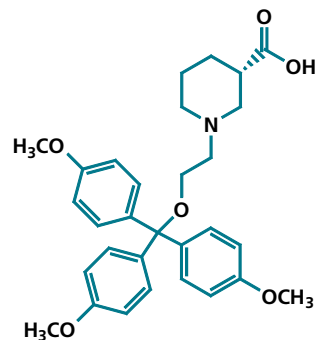
Desværre findes der endnu ikke en valideret screeningsmodel, som kan identificere lægemidler mod terapiresistent epilepsi, hvilket understreger det store behov for kontinueret forskning inden for området.



Tiagabin



(R/S)-EF1502



SNAP-5114

Kemiske strukturer af lægemiddelstoffet Tiagabin samt af modelstofferne EF1502 og SNAP-5114. Tiagabin hæmmer selektivt GAT1. EF1502 hæmmer GAT1 og BTG1. SNAP-5114 hæmmer GAT2 og GAT3.

tørerne på de pre-synaptiske nerveceller, så de bliver mindre effektive til at fjerne signalstoffet fra synapsespalten. Derved stiger koncentrationen af signalstoffet i synapsespalten, og virkningstiden forlænges. Konsekvensen er flere hæmmende impulser og dermed en mulig behandling af epilepsi. Til dette formål har vi gennem tre årtier testet forskellige stoffer for deres hæmmende effekt på transportørerne.

Behandling med GAT-hæmmende stoffer

Lægemidlet Tiagabin, som hæmmer GAT1, er indtil videre det eneste lægemiddel mod epilepsi, som hæmmer GABA-transportører. Nuværende og tidligere studier har fokuseret på at blive i stand til at hæmme andre undertyper af transportørerne, men desværre har det ikke kunnet lade sig gøre at syntetisere specifikke hæmmere af andre undertyper end GAT1. Imidlertid er det lykkedes at udvikle stoffet EF1502, som hæmmer både GAT1 og BGT1, og stoffet SNAP-5114, som hæmmer både GAT2 og GAT3. Det er blevet vist, at EF1502 virker krampestillende i screeningsmodeller.

I kombinationsstudier har vi undersøgt, om effekten af at indgive kombinationer af lægemiddelstofferne har en bedre (synergistisk), ens (additiv) eller ringere (antagonistisk) virkning, end når de indgives separat. Hvis lægemiddelstofferne virker synergistisk, betyder det, at man skal bruge mindre af dem tilsammen, end hvis de indgives hver for sig. Med mindre doser nedsættes risikoen for bivirkninger ved brugen af

lægemidler stærkt. Dette er tidligere observeret, idet kombination af EF1502 og Tiagabin viste sig at give en synergistisk effekt mod kramper, uden at bivirkningerne blev værre.

Bedre effekt – færre bivirkninger

Tiagabin er for nylig blevet undersøgt i et kombinationsstudie med modelstofferne EF1502 og SNAP-5114, der begge virker hæmmende på GABA-transportører. Formålet var at undersøge, hvilke kombinationsmuligheder mellem stofferne, der kunne give en synergistisk effekt i behandlingen af epilepsi.

Tiagabin hæmmer primært GAT1, som er placeret på den pre-synaptiske nervecelle i synapsespalten, EF1502 hæmmer udover GAT1 også BGT1, som sidder på gliaceller udenfor synapsen, mens SNAP-5114 hæmmer GAT3, som findes på gliaceller tæt ved synapsespalten. Det viste sig, at EF1502 og SNAP-5114 tilsammen havde en synergistisk effekt, hvorimod Tiagabin og SNAP-5114 kun havde en additiv effekt.

Sammenfattende kan siges, at hæmning af GAT forskellige steder i og omkring synapsespalten kan hæmme epileptiske anfald. Men det er kun hæmning af den ekstrasynaptiske BGT1, der giver anledning til en markant synergistisk effekt sammen med GAT1 og GAT3 ved synapsespalten. Det mulige potentiale i hæmmere af BGT1 kunne give anledning til lægemidler med færre bivirkninger og bedre effekt, end det vi i dag kender.

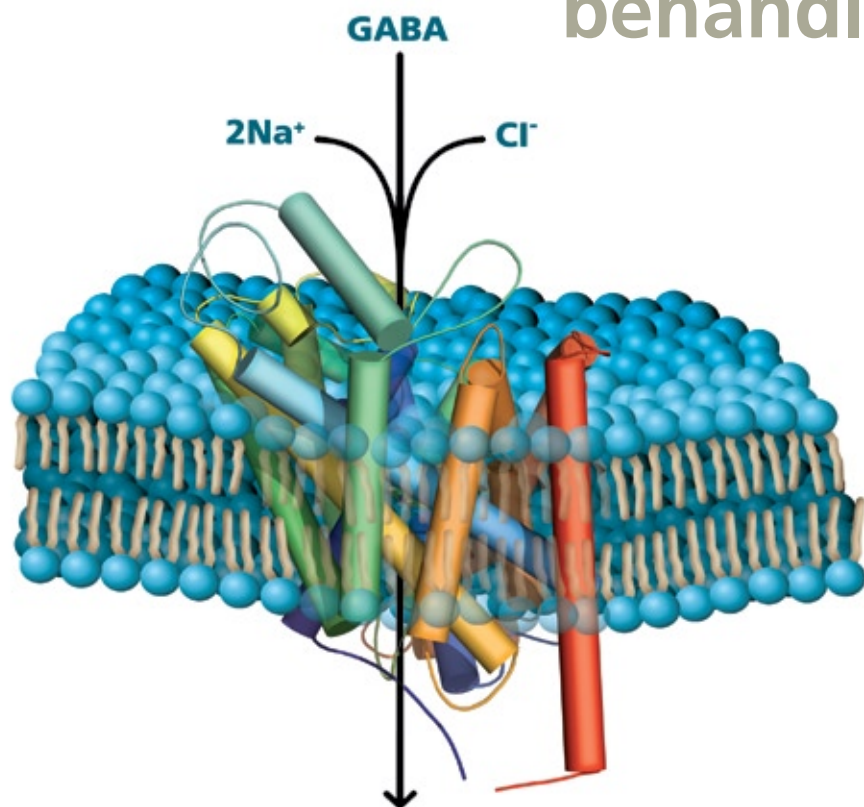


Mus bruges i stor stil ved udvikling af lægemidler, og der er udviklet musemodeller, som efterligner menneskelige sygdomme, bl.a. epilepsi. Disse mus kan benyttes til identificere potentielle lægemidler mod specifikke sygdomme.

Cand.pharm. Karsten Kirkegaard Madsen er ph.d.-studerende på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.
Ph.d. Rasmus Prætorius Clausen er lektor på Institut for Medicinalkemi.
Ph.d. Orla M. Larsson er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.
Dr.scient. Arne Schousboe er professor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Ny human GABA-transportør

– et muligt mål for behandling af epilepsi



Signalstoffet GABA transporteres fra ydersiden af cellen og ind i cellen ved hjælp af en GABA-transportør. Transporten kan kun foregå, hvis der samtidig sker transport af to natriumioner og en chloridion. Strukturelt består transportøren bl.a. af 12 mindre dele, der går igennem cellemembranen. Delene er angivet med forskellige farver. Dette kaldes et 12 transmembran-domæne.

Sygdomme som epilepsi, depression og Parkinsons sygdom skyldes feilkommunikation i hjernen, som bl.a. kan forklares ved uorden i mængden af signalstoffer. Lægemidler kan rette op på denne uorden og behandle symptomerne på sygdommene. Vi har fundet en ny medspiller i hjernen, der kan få en rolle i behandling af epilepsi.

Af Bolette Christiansen, Trine Kvist, Anders A. Jensen og Hans Bräuner-Osborne

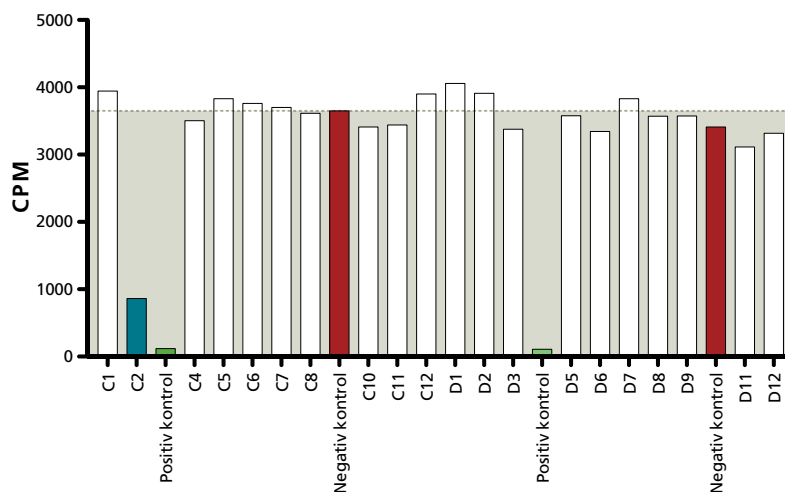
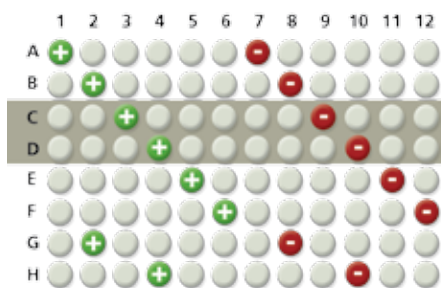
Den menneskelige hjerne består af et kompliceret netværk af celler, der benytter signalstoffer til at kommunikere med hinanden. Der findes både hæmmende og aktiverende signalstoffer, og det er vigtigt for hjernens funktion, at der hele tiden er balance imellem dem. Som et led i opretholdelsen af den hårfine balance benytter hjernen transportører. Det er proteiner, som er indlejret i cellemembranen på cellerne. Transportørerne kan fjerne signalstoffer fra rummet mellem hjernecellerne ved fx at returnere stofferne til de celler, som producerer og udsender dem. På den måde forhindrer

transportørerne, at nabocellerne overstimuleres af for store mængder af et signalstof.

Det vigtigste hæmmende signalstof i hjernen er GABA, også kaldet γ -aminosmørsyre. GABA fjernes fra virkningsstedet i hjernen ved hjælp af GABA-transportører, og derved afsluttes signalstoffets hæmmende signalering. GABA-transportører er proteiner, som specifikt genkender GABA og transporterer signalstoffet fra ydersiden af cellen og ind i cellen. Man kan sammenligne med et security check i lufthavnen. Flypassagerer med et boarding pass kan gå igennem kontrollen og ind i området før gaten, men når de først er kommet igennem, kan de ikke gå tilbage ad den samme vej.

GABA-transportører og epilepsi

GABA-transportører er medicinsk interessante, fordi de er mulige mål for nye lægemidler til behandling af epilepsi. Epilepsi skyldes en overaktivitet i hjernen, som hænger sammen med ubalance mellem to vigtige signalstoffer. Det ene signalstof er glutamat, der medvirker til at øge aktiviteten i hjernen, mens det andet er GABA, der nedsætter aktivitetsniveauet.



Søgning efter hæmmere af GABA-transportøren blev foretaget ved en screening af en samling af 3000 stoffer. Der blev brugt plader med 96 brønde (8 x 12). Her ses et eksempel på en plade samt resultaterne fra række C og D. Der er god adskillelse mellem de positive kontroller (grøn) og de negative kontroller (rød). På pladen fandtes ét stof med effekt på GAT-2, nemlig stoffet i brønd C2 (blå).

Epilepsi kan derfor bl.a. behandles ved at øge mængden af GABA i hjernen. Der findes allerede et lægemiddel, Gabitril® til behandling af epilepsi, hvor det aktive lægemiddelstof specifikt hæmmer en GABA-transportør. Dette lægemiddel forhindrer, at GABA fjernes fra virkningsstedet og medvirker derfor indirekte til at øge mængden af det hæmmende signalstof ved virkningsstedet i hjernen. Resultatet er, at den epileptiske overaktivitet dæmpes.

Opdagelsen af den nye transportør

Fire forskellige GABA-transportører er tidligere blevet klonet fra rottehjerner, og de betegnes GAT-1, BGT-1, GAT-2 og GAT-3. Der er ligeledes fundet fire forskellige GABA-transportører i mus, men fra mennesket har man indtil videre kun klonet tre forskellige transportører, nemlig GAT-1, BGT-1 og GAT-3.

Det undrede os, at GAT-2 ikke var fundet i menneskelige hjerneceller, og vi begyndte derfor at lede efter den manglende humane transportør. En søgning i offentligt tilgængelige databaser over den menneskelige arvmasse – genomet – resulterede i, at vi fandt et gen, der i høj grad lignede genet for GAT-2 fra rotte og mus. Vores efterfølgende undersøgelser viste, at genet ganske rigtigt koder for det protein, som udgør den humane GAT-2-transportør.

GABA-transportører tilhører en familie af Na⁺/Cl⁻-afhængige transportører; dvs. transportører, der kun kan transportere signalstoffet, når der er natriumioner og chloridioner til stede. For at vende tilbage til sammenligningen med et security check kan natriumioner og chloridioner betragtes som boarding pass'et, som er nødvendigt for, at flypassagerer kan få lov til at gå igennem kontrollen.

Strukturelt er disse transportører kendetegnet ved at have et transmembrant domæne, hvor begge ender af proteinet er lokaliseret inde i cellen. En analyse af sekvensen af det fundne genprodukt viste, at dette strukturelle mønster gik igen for GAT-2. Vi kunne også vise, at GAT-2 findes i hjerne, nyre, testikler og lunge, og det tyder på, at GAT-2 har en biologisk og potentielt vigtig funktion i mennesket.

Funktion på molekylært plan

Det næste trin var at vise, at GAT-2 rent faktisk er en transportør, som kan transportere GABA ind i cellen. Det lykkedes os at indføre genet for GAT-2 i et eksperimentelt cellesystem, hvor genet udtrykkes, så vi kan undersøge funktionen af transportøren i cellernes membraner. Vi udviklede derefter to forskellige farmakologiske metoder til at undersøge den nye GABA-transportør.

Ved den første metode brugte vi radioaktivt mærket GABA, som vi tilførte cellerne. Efter et givent tidsrum målte vi mængden af radioaktivt mærket GABA inde i cellerne, og vi kunne derved påvise, at GAT-2 rent faktisk havde transporteret GABA ind i cellen.

Ved den anden metode benyttede vi et fluorescerende farvestof, som kan komme ind i cellen, og som giver et fluorescerende signal, når der sker transport af ioner over cellemembranen. Vi ved, at GABA-transportører kun kan transportere signalstoffer, når der samtidig sker transport af natriumioner og chloridioner. Man kan derfor bruge det fluorescerende signal som et indirekte mål for transport af GABA. Ved denne metode kunne vi også demonstrere transport af GABA via GAT-2.

Hæmmere af GABA-transportører

For tre årtier siden blev nipecotinsyre udviklet på Det Farmaceutiske Fakultet, og stoffet viste sig at være en af de første effektive hæmmere af GABA-transport. Opdagelsen førte til, at Novo Nordisk A/S udviklede lægemidlet Gabitril®, som specifikt hæmmer GAT-1. Der er dog endnu ikke fundet specifikke og effektive hæmmere af de tre andre undertyper af GABA-transportører, heriblandt GAT-2. Vi ønskede derfor at lede efter nye ke-



Til eksperimentel undersøgelse af GABA-transportøren benyttes bl.a. denne fortyndingsrobot. Maskinen kan nemt og hurtigt lave fortyndinger af kemiske stoffer og bruges sammen med farmakologiske metoder til at karakterisere effekten af kemiske stoffer på transportøren.

miske stoffer, der kan hæmme transporten af GABA. Vi har en samling af 3000 stoffer, der alle ud fra deres kemiske struktur anses for at være egnede til fremtidig udvikling af lægemidler. Man kan undersøge effekten af disse stoffer på GAT-2 ved at foretage en screening, hvor man tester hvert stof i én koncentration og ser om det har effekt eller ej. Succesen af en sådan screening afhænger i høj grad af adskillelsen mellem positive og negative kontroller, dvs. om man med sikkerhed kan afklare, om et stof har en virkning. Man ønsker således hverken at få falske negative resultater, fordi man derved går udenom potentielt interessante stoffer, eller falske positive resultater, fordi man så efterfølgende skal udføre et stort arbejde for at afklare, hvilke stoffer der i virkeligheden har en effekt.

Vi etablerede et screeningssystem, hvor der var rigtig god adskillelse mellem de positive og negative kontroller, og derfor kunne vi med høj sikkerhed identificere stoffer med effekt på GAT-2. Ved screeningen fandt vi i alt otte stoffer, som har effekt på GAT-2. Vi er nu i gang med at undersøge, hvil-

ke af disse stoffer der er mest interessante; dvs. hvilke stoffer der både virker specifikt og effektivt på GAT-2.

GAT-2 og sygdomme

Vi mangler endnu at opnå en tilbundsående forståelse af sammenhængen mellem GAT-2 og epilepsi – eller andre hjerne sygdomme, som er relateret til GABA-signaler. Forskere fra Det Farmaceutiske Fakultet har for nyligt været med til at vise, at GABA-transportøren BGT-1 kan have en vigtig rolle i hjernen og muligvis være relevant i behandling af epilepsi. Et kemisk stof, der var udviklet til at kunne hæmme BGT-1 (EF1502, se side 22-24), var årsagen til, at forskerne kunne nå til denne konklusion.

Hvis vi på tilsvarende måde kan finde et kemisk stof, som effektivt kan hæmme GAT-2 vil vi kunne sige meget mere om den fysiologiske funktion af den nyopdagede transportør og afklare, om transportøren kan være vigtig i behandling af sygdomme som fx epilepsi.

Cand.pharm. Bolette Christiansen er ph.d.-studerende på Institut for Medicinalkemi.

Cand.pharm. Trine Kvist er ph.d.-studerende på Institut for Medicinalkemi.

Ph.d. Anders A. Jensen er lektor på Institut for Medicinalkemi.

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

Computeren viser vejen til et nyt potentielt lægemiddel

Mange receptorer i kroppen indeholder flere identiske bindingssteder for lægemiddelstoffer. Ved at sammene-koble to molekyler af et lægemiddelstof kan to bindingssteder påvirkes i ét hug. Det styrker bindingen til receptoren, og virkningen forøges.

Af Kasper Harpsøe, Birgitte H. Kaae, Thomas Balle, Darryl S. Pickering og Jette S. Kastrup

Når et lægemiddelstof binder til en receptor, frigives der en mængde energi, som kaldes bindingsaffinitet. Da bindingen til receptoren er en forudsætning for stoffets virkning, betyder en højere bindingsaffinitet normalt et mere effektivt lægemiddel.

Mange receptorer i kroppen er sammensat af flere ens enheder, som samtidig skal binde et lægemiddelmolekyle for at opnå optimal effekt. Det kræver altså, at fx to lægemiddelmolekyler uafhængigt af hinanden skal finde frem til to forskellige bindingssteder. I nogle tilfælde kan to ens lægemiddelmolekyler forbindes til ét molekyle, en dimer, der samtidig kan binde til de to bindingssteder. Det er lettere for et molekyle at finde frem til det rette bindingssted, end det er for to

molekyler at finde frem til to bindingssteder på samme tid. Derfor kan man forøge bindingsaffiniteten af en dimer op til tusind gange i forhold til monomeren.

En sådan forøgelse af bindingsaffiniteten kan give mere potente lægemidler, og fremstilling af dimere benyttes derfor i forsøget på at udvikle bedre medicin. På trods af flere eksempler på denne strategi er det dog først nu lykkedes at føre et strukturelt bevis for, at den øgede bindingsaffinitet og forbedrede virkning rent faktisk skyldes binding til to identiske bindingssteder. Vi genererede en hypotese ved hjælp af computersimuleringer og har siden bevist hypotesen via en røntgenstruktur og forsøg med cellekulturer.

AMPA-receptorer

AMPA-receptorerne er en familie af receptorer, som er mål for lægemidler. Receptorerne er bl.a. involveret i hukommelse og indlæring, og ved sygdomme som Alzheimers sygdom ses et nedsat antal AMPA-receptorer i hjernen. Hvis impulserne fra de tilbageværende receptorer kan forøges, kan symptomerne måske afhjælpes.

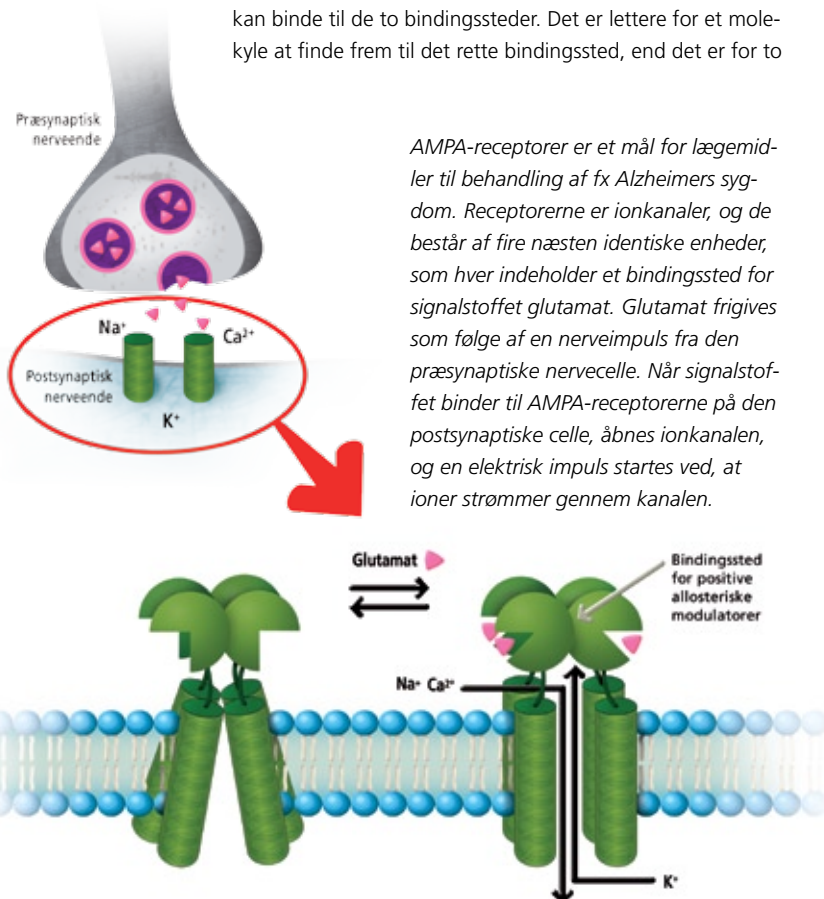
AMPA-receptorer er ionkanaler og består af fire næsten identiske enheder, som hver indeholder et bindingssted for glutamat, som er et af hjernens vigtigste aktiverende signalstoffer. Receptorerne sidder i nervecellernes membraner og er ansvarlige for en stor del af impulsoverførslen mellem de enkelte celler i nervesystemet.

Glutamat frigives som følge af en nerveimpuls fra den præsynaptiske nervecelle, og AMPA-receptorerne på den postsynaptiske nervecelle sørger for, at impulsen sendes videre. Når glutamat binder sig en AMPA-receptor, åbnes ionkanalen, og en elektrisk impuls startes via de ioner, som strømmer gennem kanalen. En gruppe stoffer kaldet positive allosteriske modulatorer forstærker den normale strøm af ioner gennem receptoren og er derfor i fokus som potentielle lægemiddelstoffer.

En god ide

Ideen med at konstruere en dimer af modulatorerne opstod under et ph.d.-projekt i gruppen for Biostrukturel Forskning på Institut for Medicinalkemi. Baggrunden herfor var den første tilgængelige røntgenstruktur af en AMPA-receptor i kompleks med en modulator, kaldet Cyclothiazide (CTZ). Den tredimensionelle struktur viser, at AMPA-receptoren indeholder to ens bindingssteder for CTZ relativt tæt på hinanden i den symmetriske grænseflade mellem to receptorenheder.

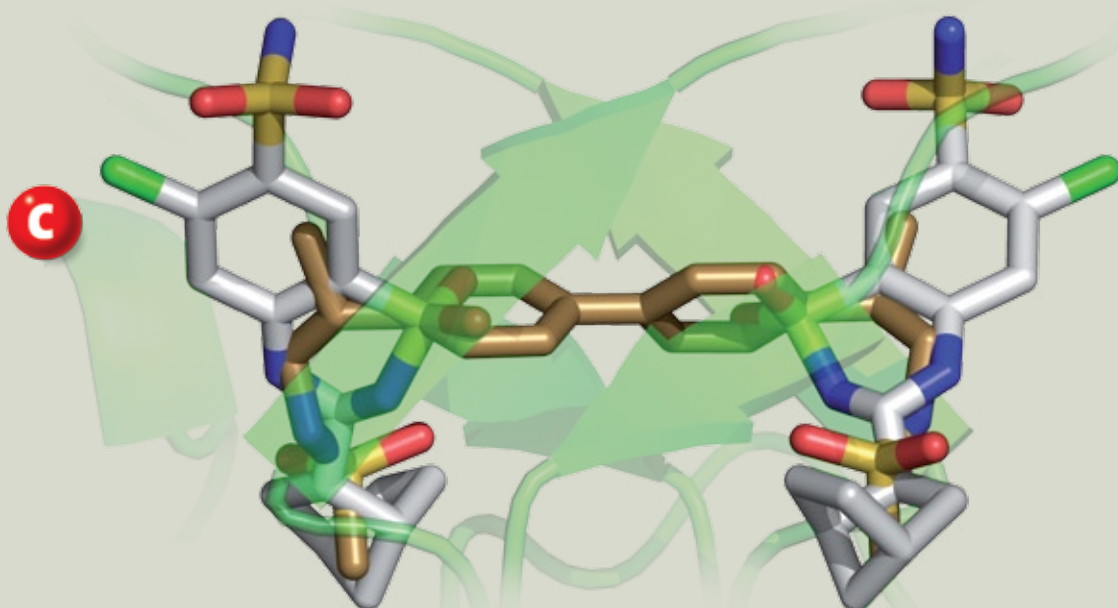
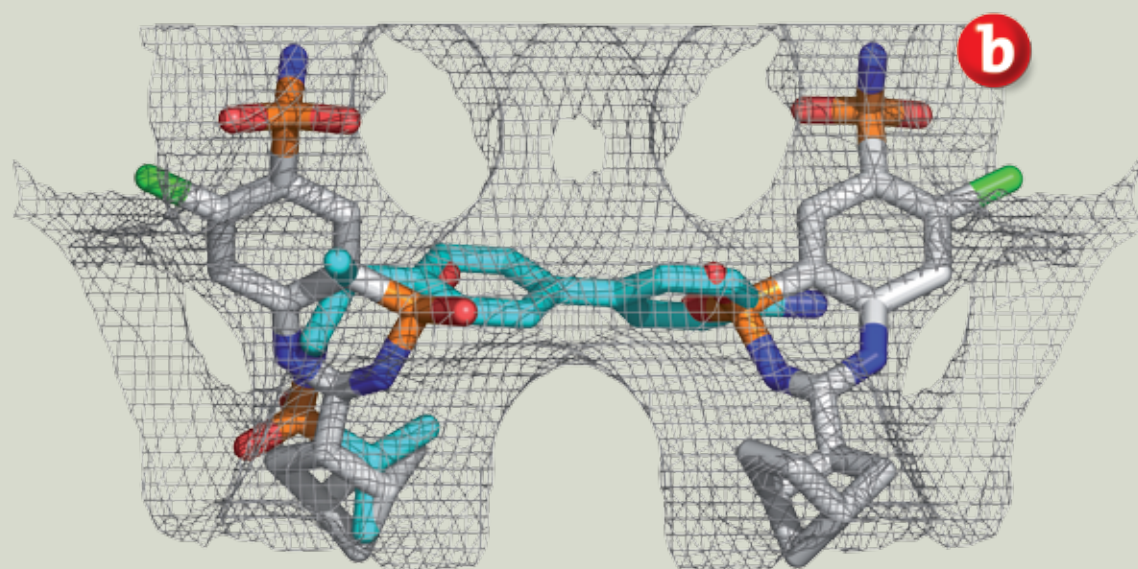
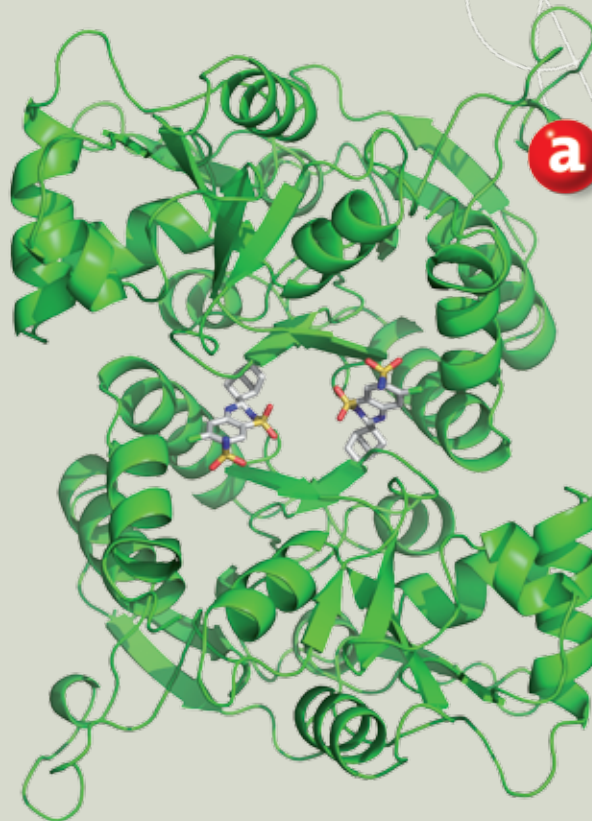
Vi beregnede en overflade af området i receptoren og fandt, at en smal kanal forbinder de to bindingssteder, så de

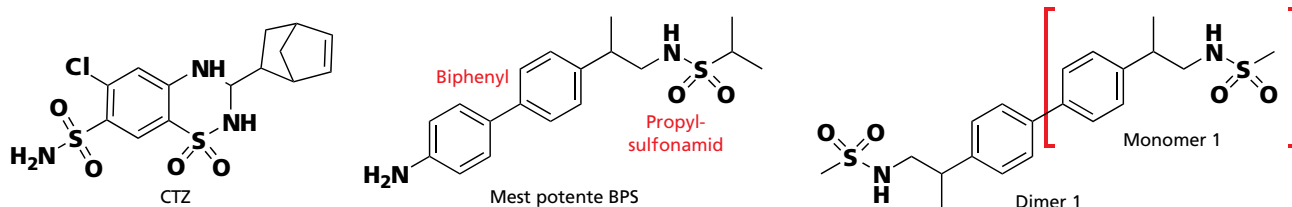


❶ Røntgenstrukturen af den glutamat-bindende del af en AMPA-receptor i kompleks med modulatorene CTZ (hvide kulstofatomer).

❷ Computermodellen viser, hvordan BPS-modulatorerne (cyane kulstofatomer) binder i forhold til CTZ i den beregnede overflade af receptorhulrummet.

❸ Den eksperimentelt bestemte røntgenstruktur af en AMPA-receptor i kompleks med dimer 1 (brune kulstofatomer) sammenlignet med CTZ. Strukturen er i god overensstemmelse med den forudsagte bindingsmåde.





Strukturformler for CTZ, den mest potente af BPS-modulatorerne, samt dimer 1 og monomer 1.

tilsammen danner et symmetrisk hulrum. Dermed åbnes muligheden for at designe et symmetrisk molekyle, der på samme tid kan binde til begge CTZ-bindingssteder. CTZ var dog ikke oplagt som udgangspunkt for at designe en dimer. Det var derfor nødvendigt at identificere andre modulatorer, som binder i samme område af receptoren.

Computergenereret bindingsmodel

En serie af modulatorer, biarylpropylsulfonamider (BPS), blev fundet i litteraturen med tilhørende aktivitetsdata, og de viste sig at indeholde lige det strukturelement, vi havde brug for. En af modulatorerne var tidligere publiceret i forbindelse med en mutation i receptoren, der havde en tydelig effekt på stoffets virkning. At denne mutation samtidig havde vist sig at påvirke effekten af CTZ, var en klar indikation på, at der var tale om samme bindingssted.

Vi benyttede et computerprogram til at generere forslag til, hvordan BPS-modulatorerne kunne passe ind i en røntgenstruktur af AMPA-receptoren. Ved at beregne og vurdere forskellige faktorer, som influerer på stoffernes bindingsaffinitet, udvalgte vi den mest sandsynlige bindingsmåde for hver BPS-modulator. På baggrund af modulatorernes interaktioner med receptoren, fx via hydrogenbindinger, kunne vi forklare, hvorfor nogle af stofferne er mere effektive end andre. For at evaluere den forudsagte binding til AMPA-receptoren, delte vi serien af modulatorer i to grupper; et træningssæt og et testsæt. Træningssættet blev brugt til at konstruere en computermodel, der identificerede en mulig sammenhæng mellem modulatorernes tredimensionelle struktur og deres virkning på receptoren. Det faktum, at computermodellen kunne forudsige aktiviteten af BPS-modulatorerne i testsættet, bekræftede, at vores forslag til, hvordan de binder, var korrekt. Bindingsmodellen kunne derefter bruges som udgangspunkt for videre studier.

Design af en dimer

De fleste af BPS-modulatorerne indeholder et biphenyl-strukturelement, der udover selv at være symmetrisk viste sig at binde midt i det symmetriske hulrum. Propylsulfonamid-delen af disse modulatorer binder til samme sted, som et af de to CTZ molekyler. Derfra var der ikke langt til ideen med en dimer, der indeholder to propylsulfonamid-enheder med en biphenyl-enhed i midten. Vi designede et par forslag til di-

merer og undersøgte, om de passede ind i bindingsmodellen for BPS-modulatorerne.

Kun dimer 1 blev forudsagt til at have en fuldstændig symmetrisk binding til de to CTZ-bindingssteder. Samtidig forudsagde computerberegningerne en høj bindingsaffinitet for dimer 1 og dermed sandsynligvis også en god virkning på receptoren.

Bevis for binding og effekt

Alt arbejdet var indtil nu foretaget på computer. Bindingen af dimer 1 til to identiske bindingssteder var derfor kun teori uden konkrete beviser. Desuden var det ikke belyst, hvilken effekt, der kunne opnås fra dimeren i forhold til monomeren af samme stof.

Derfor etablerede vi et samarbejde med Chem-MedChem forskningsgruppen på Institut for Medicinalkemi med henblik på fremstilling af modulatorerne og med Sektionen for Cellulær Neurofarmakologi på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi med henblik på test af modulatorernes virkning på AMPA-receptorerne. Dimer 1 og monomer 1 blev derpå fremstillet og testet på rekombinante AMPA-receptorer, som var udtrykt i cellemembranerne på levende frøæg. Desuden startede gruppen for Biostrukturel Forskning et eksperiment med at løse røntgenstrukturen af en AMPA-receptor i kompleks med dimer 1.

De farmakologiske tests viste, at både dimer 1 og monomer 1 forøgede strømmen af ioner gennem AMPA-receptorerne med mellem 700 og 1000 procent i forhold til kontrolmålinger uden en modulator. Desuden viste resultaterne, at dimer 1 er over 1000 gange mere potent end monomer 1. Røntgenstrukturen viser, at dimer 1 binder i grænsefladen mellem to receptorenheder. Biphenyl-elementet placerer sig i midten af hulrummet, mens propylsulfonamid-enhederne anbringer sig i de to identiske CTZ-bindingsteder.

Resultaterne bekræfter helt tydeligt, at fremstilling af dimere, som binder til to identiske bindingssteder, kan føre til udvikling af langt mere potente lægemidler. I den forbindelse bliver dimer 1 i øjeblikket undersøgt for en potentielt fremmende effekt på kognitive egenskaber hos forsøgsdyr. Samtidig stemmer røntgenstrukturen godt overens med computermodellen, hvilket viser, at computerværktøjer kan være en yderst effektiv hjælp ved design af nye potentielle lægemiddelforbindelser.

Ph.d. Kasper Harpsøe er postdoc på Institut for Medicinalkemi.

Cand.scient. Birgitte H. Kaae er ph.d.-studerende på Institut for Medicinalkemi.

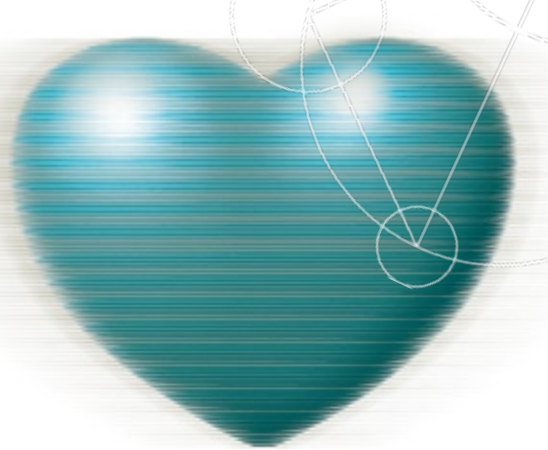
Ph.d. Thomas Balle er lektor på Institut for Medicinalkemi.

Ph.d. Darryl S. Pickering er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Ph.d. Jette S. Kastrup er lektor på Institut for Medicinalkemi.

Risiko for hjerteflimmer

afsløres med computermode



Når ionkanalen hERG ikke fungerer korrekt, kan der opstå ændringer i hjerterytmen, hjerteflimmer, som i værste fald er livstruende. Mange lægemiddelstoffer hæmmer ionkanalen, og flere nye lægemidler er derfor blevet trukket tilbage fra markedet. En computermode kan nu forudsige lægemiddelstoffers påvirkning af ionkanalen.

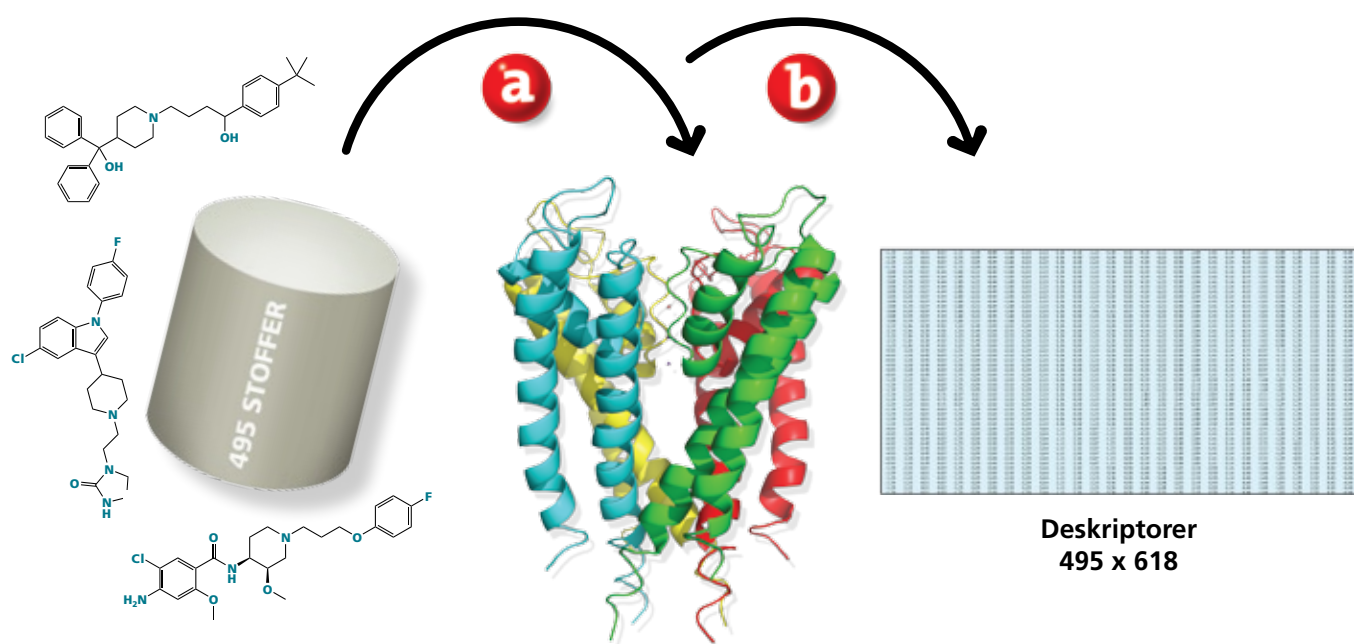
Af Olivier Taboureau, Søren Brunak og
Flemming Steen Jørgensen

Når en medicinalvirksomhed trækker et lægemiddel tilbage umiddelbart inden markedsføring – eller endnu værre efter markedsføring – koster det ufattelig mange penge i form af spildte forskningsudgifter og tab af forventet indtjening. Fir-

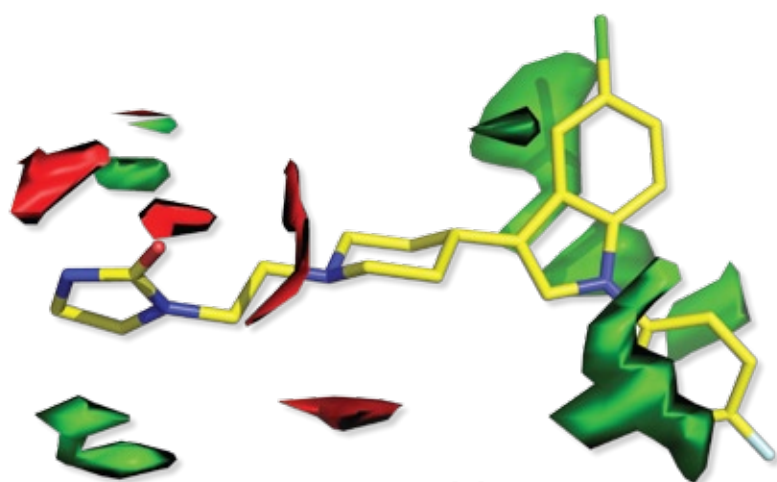
maets aktiekurs falder, og rygter om dets fremtid florerer.

“Liden tue kan vælte stort læs” siger man, og i dette tilfælde er tuen en ubalance i hjertet mellem ioner af størrelsesordenen 1,1 – 1,5 picometer ($1 \text{ pm} = 1 \times 10^{-12} \text{ meter}$). Forskelle i koncentrationen af disse små kaliumioner i hjertecellerne kan være årsag til, at et nyt lægemiddel medfører uventede bivirkninger i form af hjerteflimmer.

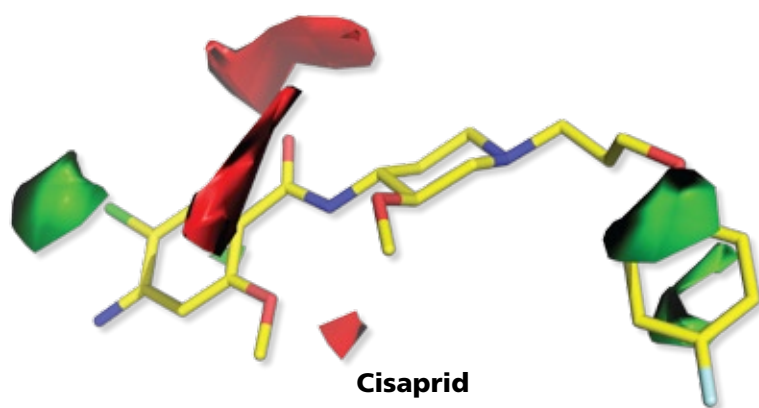
Vi starter lige forfra: I organismen er de forskellige organer opbygget af væv, som igen består af celler. Hver enkelt celle omslutes af en membran, hvorover der er en spændingsforskel, som bestemmes af koncentrationen af ioner på begge sider af membranen. Spændingsforskellen reguleres af ionkanaler og ionpumper, som er transportproteiner i cellemembranen. En af disse ionkanaler er hERG-kaliumkanalen, som regulerer koncentrationen af kaliumioner i hjertet. Hvis



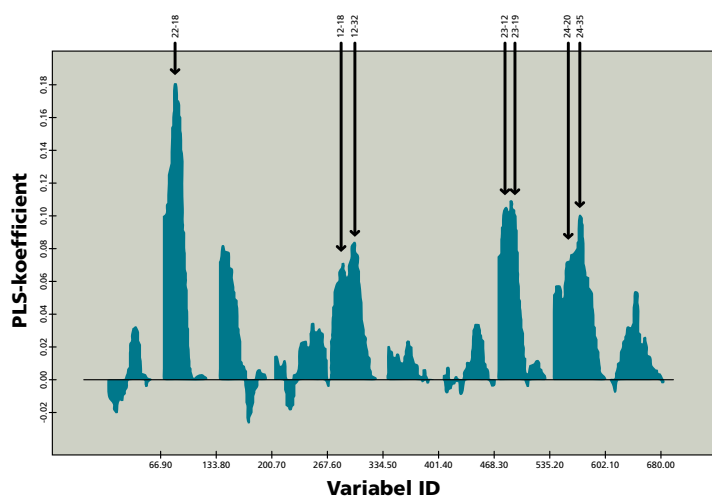
Den prædiktive computermode blev opbygget med udgangspunkt i 495 stoffer, der er kendt for at binde til hERG-kaliumkanalen, som er vist midt i figuren. Ud fra stoffernes struktur bestemmer modellen, hvilken konformation de antager ved binding til ionkanalen **a**. Disse konformationer benyttes ved beregning af deskriptorerne **b**, som derefter modelleres med SVM.



Sertindol



Cisaprid



Eksempler på visualisering af deskriptorer for to kendte bindere til hERG-kaliumkanalen, sertindol og cisaprid. Nederst deskriptorprofilen for aktive bindere. De højeste toppe svarer til de deskriptorer, eller egenskaber, som bidrager mest til aktiviteten.

hERG-kanalen ikke fungerer korrekt, kan det medføre, at hjerterytmen ændres ved, at det såkaldte QT-interval forlænges. QT-intervallet relaterer til hjertets elektriske cyklus og er et mål for, hvor lang tid hjertet er om at depolarisere og repolarisere. En forlængelse af QT-intervallet viser sig i form af uregelmæssigheder i patientens elektrokardiogram (EKG), og denne tilstand kan i særlige tilfælde resultere i hjerterflimmer og i værste fald i patientens pludselige død.

En lang række lægemiddelstoffer binder desværre til hERG-kanalen og reducerer dermed kanalens effektivitet. Disse stoffer udgør en potentiel risiko for patienterne, og netop denne risiko har medført, at flere lægemidler er blevet trukket tilbage fra markedet. Det bedst kendte eksempel er sandsynligvis Terfenadin til behandling af forskellige former for allergi (antihistamin), som blev trukket tilbage fra det amerikanske marked i 1997 på grund af mistanke om, at medicinen kunne forårsage en forlængelse af QT-intervallet og dermed udgøre en risiko for patienterne. Også danske virksomheder har været ramt, idet H. Lundbeck i 1998 trak lægemidlet Sertindol (Serdolect) til behandling af skizofreni (antipsykotika) tilbage fra markedet af samme årsag. Den amerikanske lægemiddelstyrelse (FDA) kræver i dag, at nye stoffer testes for negative effekter på hERG-kanalen.

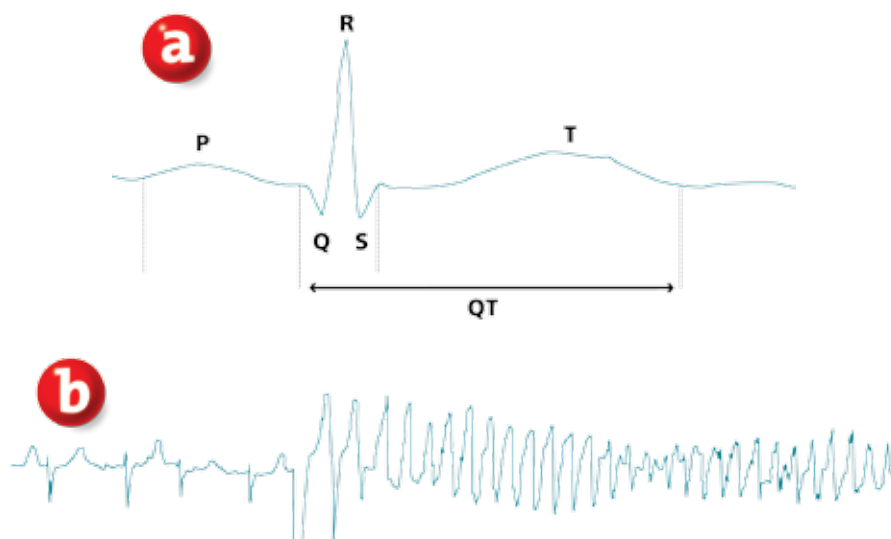
Der er udviklet laboratoriemodeller og dyremodeller til vurdering af risikoen, men det vil være af stor betydning, hvis man med computerbaserede metoder kan afgøre, om et muligt lægemiddelstof udgør en potentiel risiko. Især vil det være en stor fordel, hvis denne risikovurdering kan udføres på et meget tidligt tidspunkt i den lange udviklingsprocedure. Hvis den indledende vurdering kan udføres alene med computerbaserede metoder, behøver man nemlig kun at fremstille de stoffer, som ikke umiddelbart udgør en risiko. Herved vil den farmaceutiske industri kunne spare betydelige resurser i form af både tid og penge.

Derfor besluttede vi som en del af et NABIIT-finansieret projekt at konstruere en model for klassificering af stoffers binding til hERG-kaliumkanalen.

hERG-modellen

Indledningsvis blev alle de stoffer, hvis binding til hERG-kanalen er kendt, samlet og vurderet. Når man ønsker at opstille en model for en biologisk effekt, afhænger modellens kvalitet selvfølgelig af kvaliteten af de data, som modellen er baseret på. I dette tilfælde rådede vi over et relativt stort antal stoffer – 495 – som primært stammede fra to kilder. Stofferne var strukturelt meget forskellige, hvilket har betydning for, om den udviklede model kan forventes at være prædiktiv. Alt i alt et tilfredsstillende udgangspunkt.

For hvert stof beregnedes 618 deskriptorer, som afspejler forskellige molekylære karakteristika ved stofferne. Disse deskriptorer er ikke simple data som smeltepunkt og opløselighed, men deskriptorer, som fortæller noget om, hvilke funktionelle grupper der er til stede i molekylet, deres indbyrdes placering, samt hvordan og i hvilket omfang grupperne vil kunne vekselvirke med andre molekyler. Disse deskriptorer afhænger til dels af molekylets rumlige facon og bør således



QT-intervallet relaterer til hjertets elektriske cyklus og er et mål for, hvor lang tid hjertets celler er om at depolarisere og repolarisere. QT-intervallet defineres som tiden mellem begyndelsen af Q-bølgen og afslutningen af T-bølgen **a**. En forlængelse af QT-intervallet viser sig i form af uregelmæssigheder i patientens elektrokardiogram (EKG) kaldet 'torsades de pointes' **b**. Denne tilstand kan i særlige tilfælde resultere i hjerteflimmer og i værste fald i patientens pludselige død.

beregnes for netop den konformation, som stoffet antager, når det binder til hERG-kanalen.

Vi konstruerede nu en tredimensionel model af hERG-kanalen ud fra en strukturelt beslægtet kaliumkanal og lod derefter computeren finde den konformation, som hvert enkelt af de 495 stoffer ville antage ved binding til hERG-kanalen. Da vi primært er interesseret i at identificere og klassificere, hvilke stoffer der vil være i stand til at binde til hERG-kanalen, udviklede vi en kvalitativ model. Modellen gjorde det muligt at anvende en såkaldt Support Vector Machine (SVM)-metode, som er specielt velegnet til at klassificere store datamængder. Stofferne beskrives som vektorer i et 618-dimensionalt rum, og SVM metoden bestemmer så det hyperplan, som bedst adskiller de to grupper af data, dvs. de stoffer, som binder til hERG-kanalen, og de som ikke binder. For hvert stof udgør deskriptorerne en slags profil af stoffets egenskaber. Efter at have konstrueret modellen er det muligt at gå tilbage og identificere og visualisere, hvilke dele af profilen som er vigtig for stoffets aktivitet. Den opnåede model er i stand til at klassificere 94 procent af stofferne i datasættet korrekt i forhold til den eksisterende viden fra laboratoriemodeller og dyremodeller, hvilket er usædvanligt godt. Den virkelige udfordring for modellen er imidlertid at forudsige aktiviteten af stoffer, som ikke er medtaget i konstruk-

FAKTA

NABIIT står for Programkomiteen for Nanovidenskab og -teknologi, Bioteknologi og IT.

hERG står for human Ether-a-go-go-Related Gene, og

hERG-kanal er den mere mundrette betegnelse for den spændingsafhængige kaliumkanal KCNH2 eller Kv11.1.

tionen af modellen. To uafhængige datasæt på henholdsvis 66 og 1948 stoffer blev forudsagt, og her klassificerede vi henholdsvis 72 og 73 procent af stofferne korrekt. Træerne vokser som bekendt ikke ind i himlen, men generelt er vores metode 10-20 procent bedre end de hidtil rapporterede modeller. Vi forventer, at modellen kan forbedres yderligere ved at udnytte, at vi for alle stofferne har bestemt i hvilken konformation, de binder til hERG-kanalen.

Modellen er publiceret i et relevant fagtidsskrift, men for at gøre den tilgængelig for alle, er den også tilgængelig som en internetbaseret service på www.cbs.dtu.dk/services/hERG-1.0

Ph.d. Olivier Taboureau er forskningsadjunkt på Institut for Systembiologi, DTU.

Dr.phil. Søren Brunak er professor og centerleder på Institut for Systembiologi, DTU.

Ph.d. Flemming Steen Jørgensen er professor på Institut for Medicinskemi.



Forbrugernes rapporter giver ny viden om lægemiddel- bivirkninger

Siden 2003 har patienter og pårørende haft mulighed for at indberette bivirkninger på lige fod med læger og andre sundhedsprofessionelle, hvilket har ført til en stigning i antallet af rapporter om nye bivirkninger. Men der mangler et effektivt system til at omdanne informationen til relevant viden, som kan anvendes i praksis.

Af Lise Aagaard, Doris I. Stenver og Ebba Holme Hansen

Nye lægemidler afprøves grundigt i kliniske studier, inden de kommer på markedet, men de kliniske afprøvninger finder hovedsagelig forventede eller hyppigt forekommende bivirkninger. Derfor er rapportering af bivirkninger efter markedsføringsstartspunktet vigtig for at få viden om ukendte bivirkninger.

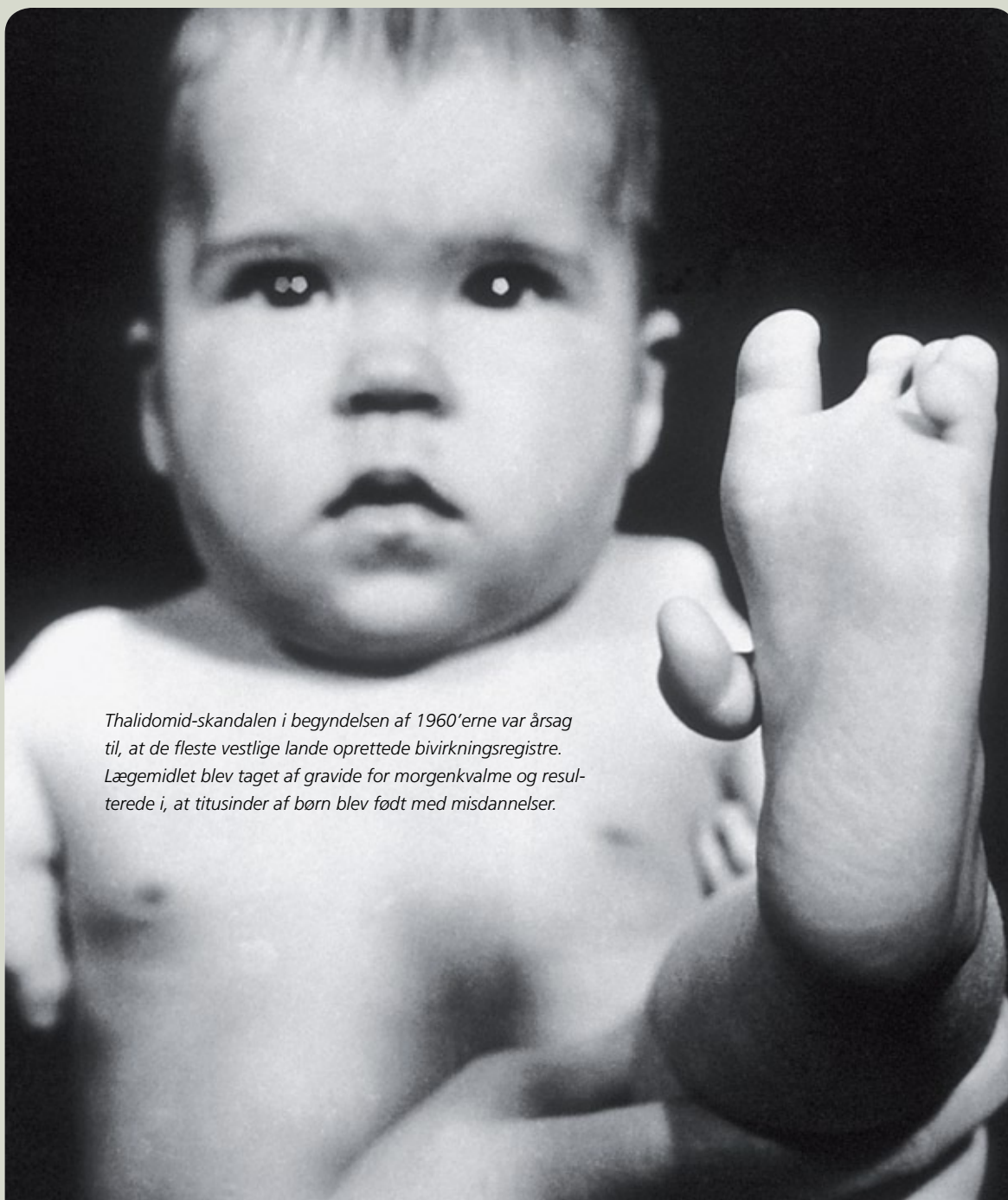
Danske læger, tandlæger og dyrlæger er lovmæssigt forpligtet til at indberette formodede bivirkninger til myndighederne. I 2003 blev det også muligt for forbrugere at indberette bivirkninger til det danske bivirkningsregister. Det skete i kølvandet på sagen omkring slankemidlet Letigen®, hvor viden om alvorlige bivirkninger i hjerte-karsystemet var til stede hos forbrugere. Forbrugere og deres pårørende henvendte sig til Forbrugerrådet med deres sygehistorier, mens Lægemiddelstyrelsen kun kendte til sagen fra massemedierne.

Behandling af bivirkningsrapporter

Det danske bivirkningsregister administreres af Lægemiddelstyrelsen. Overvågningen foretages i samarbejde med Bivirkningsrådet, som har repræsentanter fra industri, behandlere, patienter og forbrugere. Indberetning af bivirkninger foregår på specielle skemaer, udarbejdet til både sundhedsprofessionelle og forbrugere. Skemaerne er tilgængelige via Lægemiddelstyrelsens hjemmeside. Lægemiddelproducenterne rapporterer bivirkninger via et elektronisk system direkte til Lægemiddelstyrelsens bivirkningsdatabase, og styrelsen videresender bivirkningsdata fra forbrugere og sundhedsprofessionelle til producenterne via dette elektroniske system.

Data fra bivirkningsindberetningerne bliver vurderet – herunder klassificeret som værende alvorlige eller ikke-alvorlige – efter fastsatte kriterier og registreres i Lægemiddelstyrelsens database. Data videresendes til WHO's internationale

Nye lægemidler afprøves klinisk inden markedsføring, men her finder man typisk kun forventede eller hyppigt forekommende bivirkninger. Derfor er det nødvendigt, at uventede bivirkninger rapporteres efter markedsføringen.



Thalidomid-skandalen i begyndelsen af 1960'erne var årsag til, at de fleste vestlige lande oprettede bivirkningsregistre. Lægemidlet blev taget af gravide for morgenkvalme og resulterede i, at titusinder af børn blev født med misdannelser.

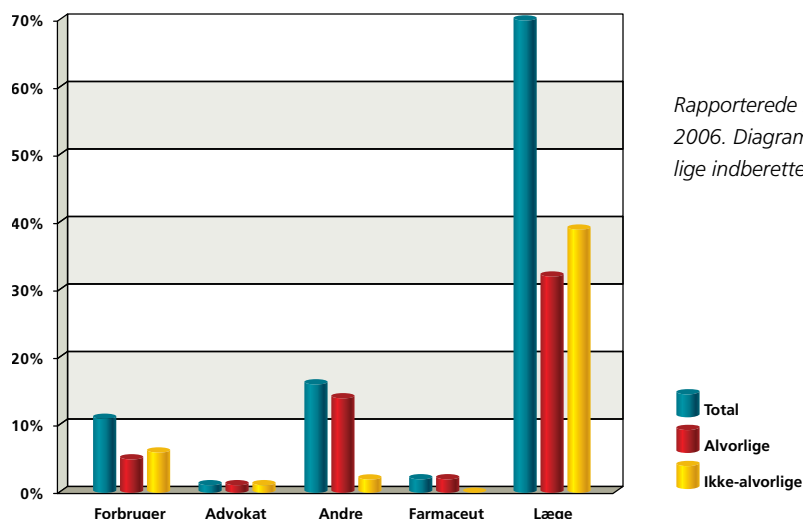
BIVIRKNINGSOVERVÅGNING I DANMARK

I begyndelsen af 1960'erne blev titusinder af misdannede børn født af mødre, som havde taget lægemidlet thalidomid for morgenkvalme under graviditeten. På den baggrund fik lægerne påbud om at rapportere alvorlige bivirkninger til nationale registre, som blev oprettet i de fleste vestlige lande. Danmark indførte et sådant rapporteringssystem i 1968 og meldte sig i 1970 til det internationale bivirkningssamarbejde i verdenssundhedsorganisationen WHO.

I begyndelsen gjaldt indberetningspligten kun læger, men

i 1972 fulgte også pligt for tandlæger. I 1995 blev lægemiddelproducenterne pålagt indberetningspligt samtidig med, at farmaceuter fik mulighed for at indberette. Så sent som i 2003 fik brugerne også muligheden. Lægemiddelstyrelsen kræver følgende bivirkninger indberettet fra læger, tandlæger og producenter:

- Lægemidler markedsført inden for to år:
Alle formodede bivirkninger.
- Lægemidler markedsført i mere end to år:
Alvorlige og uventede bivirkninger.



Rapporterede bivirkninger i Danmark for perioden 2003-2006. Diagrammet viser den procentvise fordeling af forskellige indberettere samt bivirkningernes alvorlighedsgrad.

bivirkningsdatabase, som administreres af Uppsala Monitoring Centre, til EU's fælles bivirkningsdatabase Eudra-Vigilance samt til de involverede lægemiddelproducenter. Lægemiddelproducenterne er ansvarlige for opfølgning og faglig vurdering af bivirkningsrapporterne. Producenternes faglige vurderinger sammenlignes med viden fra litteraturen, og på den baggrund indsender industrien periodiske sikkerhedsopdateringer til myndighederne. Formålet er at vurdere, om produktinformationen for de aktuelle lægemidler skal opdateres, eller lægemidlet måske skal trækkes tilbage fra markedet.

Ny information fra forbrugerne

Erfaringer med bivirkningsrapporter fra forbrugere er endnu sparsomme. Som led i et ph.d.-projekt analyserede vi bivirkninger rapporteret i perioden 2004 til 2006 og sammenlignede de rapporterede bivirkninger fra forbrugere, læger, farmaceuter, advokater eller patientforeninger samt fra andre sundhedsprofessionelle, inklusive lægemiddelproducenterne. I perioden blev der rapporteret i alt 15.531 bivirkninger. Hovedparten, 10.948 af rapporterne, kom fra læger, mens 1700 kom fra forbrugere, 277 fra farmaceuter, 159 fra advokater eller patientforsikringen mens de resterende 2447 stammede fra 'andre sundhedsprofessionelle'. Analyserne viste, at rapporteringsmønstret mellem forbrugere eller deres advokater og sundhedsprofessionelle og farmaceuter var forskelligt med hensyn til de organsystemer, som rammes af bivirkninger, samt for de grupper af lægemidler, som bivirkningerne er rapporteret for. Forskellene i rapporteringsmønstret giver sig udtryk ved, at forbrugere rapporterer flere eller færre bivirkninger sammenlignet med sundhedsprofessionelle inden for specifikke organsystemer og grupper af lægemidler. Eksempler på organsystemer er blodet og lymfesystemet, øre- og labyrintsystemet, leveren, nervesyste-

met, forplantningsorganerne og brystsystemet. Eksempler på grupper af lægemidler, hvor forbrugerne rapporterer flere eller færre bivirkninger sammenlignet med de professionelle rapporter, er inden for medicin til behandling af hjerte og kredsløb, infektionssygdomme, AIDS medicin, psykofarmaka og midler til behandling af sygdomme i øjne og ører. Analysen viste også, at forbrugere indberettede bivirkninger, som ikke var blevet indberettet af sundhedsprofessionelle. Alene inden for organklassen nervesystemet har forbrugere rapporteret bivirkninger for seks forskellige lægemidler. Det drejer sig om bivirkninger som krampes, indlæringsvanskeligheder, forstyrrelser i lugtesansen, taleforstyrrelser, svær muskeltræthed, nervesmerter og blodpropper.

Forbrugernes rapporter skal bruges

Det tog 35 år efter oprettelsen af det officielle danske system, før lægemiddelbrugerne fik ret til selv at rapportere de bivirkninger, som de oplever. Vores resultater viser, at bivirkningsrapporter fra forbrugere er en kilde til ny information om bivirkninger, som skal sorteres og omsættes til brugbar viden. Forbrugere er en direkte kilde til nye oplysninger om bivirkninger, fordi de på deres egen krop opnår praktisk erfaring med lægemidler. Forbrugernes erfaringer bør derfor aktivt inddrages i bivirkningsovervågningen og skal tillægges samme værdi som bivirkningsrapporter fra sundhedsprofessionelle.

Udnyttelse af forbrugernes erfaringer stiller krav til bivirkningssystemet om at definere strategier og praksis for bedre udnyttelse af disse data, herunder fx inddrage avancerede statistiske værktøjer som "data mining" i analyserne. Data mining-teknikkerne kan systematisk analysere forbrugernes frivillige rapporter med dermed systematisere informationsmængden og filtrere de relevante informationer fra baggrundsstøjen, således at nye bivirkningssignaler kan findes.

Ph.d. (pharm.) Lise Aagaard er adjunkt på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.
Cand.med. Doris I. Stenver er overlæge i Lægemiddelstyrelsen, afdelingen for Forbrugersikkerhed.
Cand.pharm. Ebba Holme Hansen er professor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Har apotekerne tjek på inhalationen?

Alle danske apoteker kan få penge af staten, når de hjælper astmatikere med at få lært den rigtige teknik til at inhalere deres medicin. For at rådgivningen kan blive ved med at finde sted, er det vigtigt, at apoteket løbende følger op på ydelsen, samt at personalet og apotekeren har et ønske om at være gode til at rådgive kunderne.

Af Susanne Kaae, Birthe Søndergaard og Lotte Stig Haugbølle

Der bliver stadig flere astmatikere i Danmark. I dag lider omkring 300.000 danskere af astma, og inden for de næste fem år forventes det, at yderligere 50.000 personer vil få sygdommen. Astma behandles med inhalationsmedicin, og korrekt inhalation er en forudsætning for, at lægemidlet får den optimale effekt i kroppen og dermed medvirker til at holde astmaen under kontrol.

Siden 2005 har alle danske apoteker kunnet få penge af staten, når de hjælper en astmatiker med at få lært den rigtige teknik til at inhalere sin medicin. Men efter en god start har antallet af rådgivninger været faldende. Et ph.d.-projekt er blevet sat i værk med det formål at undersøge, hvilke forhold der har betydning for, at apotekerne bliver ved med at tilbyde ydelsen til de astmatikere, der har behov for dette. Rådgivning af en astmatiker tager ca. ti minutter, og den rådgivning, som apotekerne kan tilbyde for at optimere inhalationsteknikken, er beskrevet i en manual – *Tjek på inhalation* – fra Danmarks Apotekerforening. Foruden astmatikere kan ydelsen også tilbydes personer, som lider af Kronisk Obstruktiv Lungesygdom. Ved udgangen af 2006 havde apotekerne udbudt ydelsen til knap 75.000 personer. I 2007 begyndte antallet af udbudte ydelser på de danske apoteker at falde væsentligt sammenlignet med 2006. Spørgsmålet er, om dette fald kan skyldes andre fænomener end "afmatning", dvs. at udbydelsen falder, fordi mange astmatikere allerede er blevet tilbudt ydelsen? For at finde ud af, om det er realistisk at fastholde et højt udbydelsesniveau for *Tjek på inhalation*, og i så fald hvordan, har vi valgt at tage ud og undersøge ydelsen, der hvor den finder sted – på apotekerne. På syv udvalgte apoteker udfører vi feltundersøgelser, hvor vi over fem dage observerer, hvordan man tilrettelægger apoteksarbejdet i det daglige, hvordan apotekeren – ejeren og lederen af apoteket – omgås personalet, og hvordan astmaydelsen foregår i praksis.

Herudover interviewes tre blandt personalet i et fokusgrup-

peinterview for at få beskrevet alle de aktiviteter, apoteket har udført for at få rådgivningen til at fungere i praksis, og for at indsamle de ansattes forklaringer på "op- og nedture" i udbydelsen af ydelsen siden 2005. Endelig interviewes apotekeren for at finde frem til hans eller hendes ledelsesstil, fordi ledelsesstilen formodes at have indflydelse på udbydelsen af rådgivningen.

De udvalgte apoteker omfatter både apoteker, der på forhånd vides at være gode til at blive ved med at tilbyde rådgivning til deres astmakunder samt apoteker, der i 2006 tilbød astmarådgivning til mange kunder, men derefter kun har tilbudt den til relativt få.

For at finde frem til, hvilke forhold der har betydning for, at apotekerne bliver ved med at udføre rådgivning af astmatikere, skal alle de data, som er indhentet ved observationer, fokusgruppe- og enkeltinterviews analyseres i forhold til hinanden. Det centrale spørgsmål er: Hvordan hænger organiseringen af det daglige arbejde og ledelsesstilen på det enkelte apotek sammen med både de aktiviteter, apoteket



Astma behandles med inhalationsmedicin, og korrekt inhalation er en forudsætning for, at medicinen virker optimalt.

udfører for at få rådgivningen til at fungere i praksis, samt med antallet af udbudte ydelser over tid?

Sammenligning af apoteker

Endelig er det meningen at sammenligne de syv apoteker på tværs. Alle de apoteker, der bliver ved med at tilbyde *Tjek på inhalation* rådgivning til mange kunder sammenlignes, hvad angår organiseringen af det daglige arbejde og ledelsesstil.

Desuden opgøres det, hvor mange og hvilken type aktiviteter der har været udført i forbindelse med servicen. Samme procedure udføres for de apoteker, hvor det ikke er lykkedes at fastholde et højt udbydelsesniveau.

Det første apotek, vi har analyseret, er kendetegnet ved at have en demokratisk indstillet apoteker, som er interesseret i, at apoteket deltager i nye projekter om rådgivning til kunderne. Apotekerens opfordrer sit personale til at deltage, men presser dem ikke til det.

Apotekerens påvirker det daglige arbejde på en måde, der sikrer, at især farmaceuterne kan løse faglige opgaver, som ligger udover den egentlige kundeekspedition.

Personalet på apoteket er primært mellem 40-60 år – alle har arbejdet der i mange år og kender deres opgaver indgå-

ende. Der er flere ansatte på apoteket, som er meget interesseret i at hjælpe og rådgive kunderne, og selv før astmaydel- sen blev introduceret, havde man en politik på apoteket om, at alle astmatikere, som ikke havde prøvet at bruge inhalati- onsmedicin før, skulle have særlig instruktion.

På dette apotek får personalet ikke lov til bare at gå ud og tilbyde astmarådgivning til kunderne. Man skal først mod- tage undervisning og bagefter bestå en test, før man som ansat kan tilbyde ydelser. Den farmaceut på apoteket, som har særligt ansvar for rådgivning af astmatikere, opgør en eller to gange om året, hvor mange ydelser, de ansatte har udført. Derefter følger farmaceuten op på, om man på apo- teket kan blive bedre til at udføre ydelser, dvs. hvilke gode råd, der er ekstra hensigtsmæssige at give til kunderne.

På apoteket valgte man nogle måneder efter starten på ord- ningen i 2005 at inddrage apotekerens kontor (tidligere var ydelserne blevet tilbudt ved skranken), så man kunne foretage rådgivningen her, da det var generende for både kunder og personale at stå midt i larm og aktiviteter fra andre kunde- ekspeditioner. Flere på apoteket finder denne service uund- værlig og understreger, at de tilbyder den til astmakunderne, uanset hvor travlt der er på apoteket.

Rådgivning af astmatikere på et apotek. Rådgivningen foretages her på apotekerens kontor, så hverken kunden eller farmaceuten forstyrres af aktiviteten ved skranken.



Seriøs rådgivning

Ikke overraskende har dette apotek et stabilt og endda svagt stigende niveau for antallet af udbudte ydelser. Dette kan forklares med, at man på apoteket fortsat har fokus på ydelser ved at en farmaceut laver løbende opgørelser og melder disse ud til resten af personalet. Opfølgningen har fokus på læring og er fremadrettet. Tilbagemeldingerne finder sted, fordi det daglige arbejde organiseres på en måde, så farmaceuten får tid til både at foretage opgørelsen og give feedback.

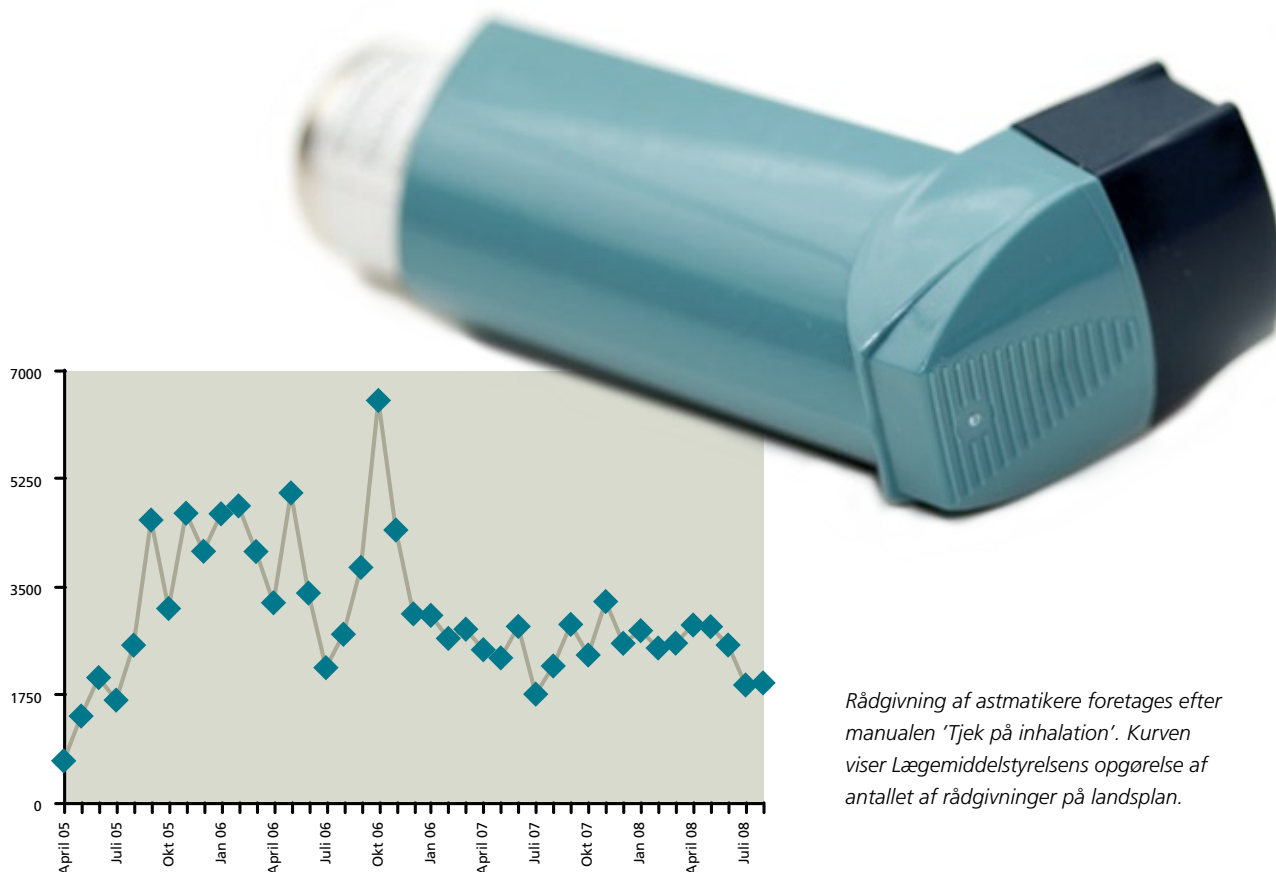
Desuden tager personalet *Tjek på inhalation* seriøst. Der er indført kvalitetskrav; man kan ikke bare udbyde ydelser "for sjov". Seriositeten vises også ved, at man på apoteket har besluttet at flytte placeringen af rådgivningen til mere rolige omgivelser samt at ydelser tilbydes, også selvom der er travlt. Ved at flytte placeringen af rådgivningen til apotekens kontor, fastholder man på apoteket en positiv oplevelse med kunden. Dette formodes at have en selvforstærkende effekt på udbydelsen.

Kan rådgivningen forbedres?

Da alle resultater fra undersøgelsen endnu ikke er indsamlet, er det for tidligt at afgøre, hvordan apoteker, der har en høj kontra lav vedvarende udbydelse af ydelser, adskiller sig fra hinanden. For at *Tjek på inhalation* skal komme astmatikerne til gode, er det nødvendigt at den viden, der fremkommer via undersøgelsen, kanaliseres ud til apotekerne, hvor ydelser skal finde sted.

Nogle tiltag med betydning for udbydelsen af rådgivningen vil være nemmere at overføre fra et apotek til et andet end andre. At flytte ydelser fra skranken til et baglokale må være en mulighed for de fleste, ligesom løbende fremadrettet feedback til personalet synes overkommeligt at skulle udføre. Det vil formentlig tage længere tid at opbygge en dybfølt interesse for rådgivning af apotekskunder, hvis den ikke allerede er til stede både hos personalet og måske især hos apotekeren.

Forhåbentligt kan resultaterne af undersøgelsen ligeledes anvendes til at fremme implementeringen af andre nye ydelser på de danske apoteker i fremtiden til gavn for både kunder og apoteker.



Rådgivning af astmatikere foretages efter manualen 'Tjek på inhalation'. Kurven viser Lægemiddelstyrelsens opgørelse af antallet af rådgivninger på landsplan.

Cand.pharm. Susanne Kaae er ph.d.-studerende på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Ph.d. Birthe Søndergaard er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Ph.d. Lotte Stig Haugbølle er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Forsøg med leverceller kan redde menneskeliv

I leveren nedbrydes lægemiddelstoffer til metabolitter, som i nogle tilfælde kan medføre bivirkninger og i værste fald dødelige forgiftninger. Kulturer af humane leverceller er en god model til at forudsige nye lægemidlers nedbrydningsmønstre i mennesket.

Af Lassina Badolo

Leveren er et af kroppens vigtigste organer – faktisk er leveren så nødvendig, at et menneske kun kan overleve i op til et døgn uden leverfunktion – og en af leverens centrale opgaver er at nedbryde fremmede stoffer i kroppen. Når det gælder lægemiddelstoffer, som indtages i tabletter, er omsætningen i leveren ofte afgørende både for medicinens effekt og for eventuelle bivirkninger.

Oral indtagelse af lægemidler

Det første sted, medicinen havner efter indtagelse gennem munden, er i maven og tarmen. En del af lægemiddelstoffet optages i blodet via tarmen og transporteres derpå gennem leveren, inden stoffet og dets nedbrydningsprodukter kommer ud i hele kroppen med blodet (se illustration side 52). Sammen med tarmen er leveren det vigtigste forsvar mod alt det, vi spiser. Alt det som kroppen skal beskytte sig imod. I leveren omdannes lægemiddelstoffet ofte til stoffer, som lettere kan fjernes fra kroppen via urin eller afføring. Ved at stå for en stor del af nedbrydningen af lægemiddelstoffet er leveren hovedansvarlig for, hvor meget lægemiddelstof og hvor store mængder af nedbrydningsprodukter, der findes i blodet, som cirkulerer rundt i kroppen for at nå alle organerne.

Mængden af lægemiddelstof i blodet er afgørende for at opnå en bestemt terapeutisk effekt. Der er en nedre grænse, hvor medicinen ikke har nogen virkning, og en øvre grænse, som bestemmer, hvornår der optræder bivirkninger. En for kraftig nedbrydning af et lægemiddelstof i leveren medfører således ikke kun, at der dannes en stor mængde af forskellige metabolitter, men også at den ønskede terapeutiske effekt udebliver.

Individuelle forskelle

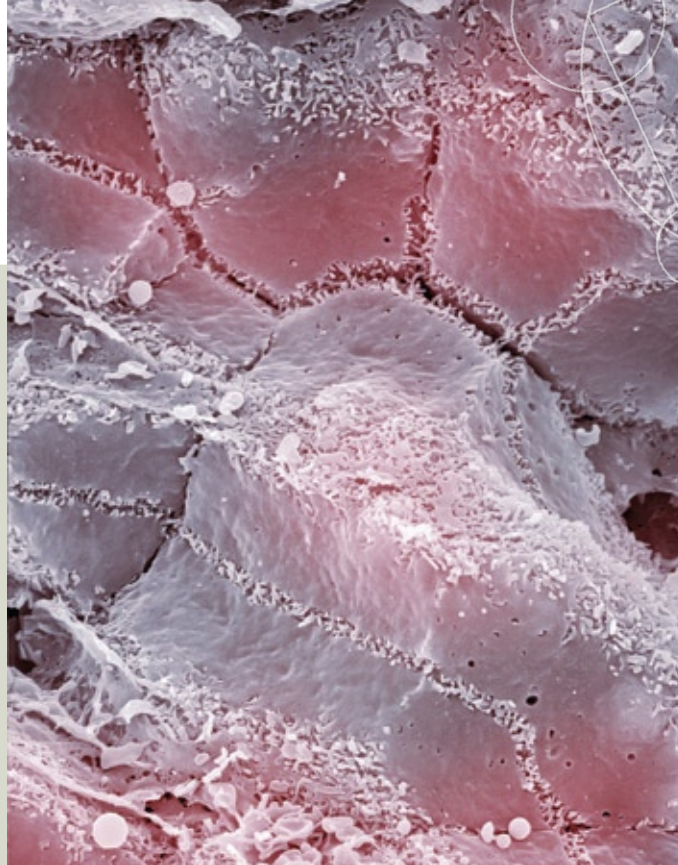
Graden af nedbrydning kan variere fra person til person alt

LEVEREN – ET CENTRALT ORGAN

Menneskets lever vejer i gennemsnit 1,5 kg og forsynes med 1,5 liter blod hvert eneste minut. Leveren er opbygget af flere forskellige typer celler, og de vigtigste kaldes hepatocytter. De udgør omkring 80 procent af hele leveren.

Hepatocytterne er de celler, som nedbryder lægemiddelforbindelser og andre udefra kommende stoffer. Dermed er hepatocytterne med til at beskytte kroppen. Et gram lever indeholder ca. 120 millioner hepatocytter, hvilket svarer til, at hele leveren hos et voksent menneske indeholder omkring 180 milliarder hepatocytter.

I rotter, der ofte benyttes som forsøgsdyr ved udvikling af lægemidler, vejer leveren i gennemsnit 20 gram – omkring en tiendedel af rottens vægt – og den indeholder som hos mennesket cirka 120 millioner hepatocytter pr. gram.



efter den enkeltes leverfunktion. Dét indebærer en risiko for, at der opstår meget store variationer i den mængde af et lægemiddelstof, som findes i forskellige patienters blod efter indgift af en given dosis.

Et eksempel er to slags medicin, hvoraf det ene lægemiddelstof i gennemsnit nedbrydes med 99 procent i leveren, mens kun 20 procent af det andet lægemiddelstof bliver nedbrudt. I det første tilfælde vil en lille forskel i nedbrydningshastigheden på 1 procent mellem to patienter (99 og 99,9%) medføre, at den ene har ti gange mere lægemiddelstof i blodet end den anden. Det kan hurtigt føre til toksiske virkninger. For det mere stabile lægemiddel vil samme forskel i nedbrydningshastigheden ikke have nogen væsentlig effekt på mængden af lægemiddelstof i blodet.

Set i lyset af disse kendsgerninger benyttes leverceller – hepatocytter – rutinemæssigt i den farmaceutiske industri for at frasortere lægemiddelkandidater, som nedbrydes for hurtigt i leveren. Flere års erfaringer har nemlig vist, at hepatocytter er gode til at forudsige lægemidlers nedbrydningshastighed i mennesker.

Dør af bivirkninger

Når leveren forsvaret kroppen ved at omdanne lægemiddelstoffer til metabolitter, kan det ske, at nogle af disse nedbrydningsprodukter er skadelige. Da leveren producerer størstedelen af et lægemiddelstofs metabolitter, bliver leveren automatisk det organ i kroppen, som er mest udsat for deres toksiske virkninger.

Bivirkninger af lægemidler er årsag til mange dødsfald i vores del af verden. Undersøgelser fra USA viser, at der hvert år dør omkring 100.000 mennesker af lægemiddelrelaterede bivirkninger. I USA kommer bivirkninger af medicin ind i rækken af de mest hyppige dødsårsager som nummer 4 til 6. Til-

svarende tal kendes ikke præcist fra Danmark, men store undersøgelser, som dækker en række europæiske lande, viser, at tendensen her i Europa er det samme.

En stor del af bivirkningerne kan forklares ud fra den måde, et givet lægemiddel virker i kroppen, og dermed kan bivirkningerne forudsiges og minimeres ved at følge patienterne nøje. I modsætning til disse forudsigelige bivirkninger er årsagen til bivirkningerne ikke forstået i 20-25 procent af tilfældene. I USA svarer det til, at 20.000 mennesker hvert år dør af uforudsigelige medicinrelaterede bivirkninger – og dermed uden at der er mulighed for at redde disse mennesker.

Reaktive metabolitter

Som nævnt sker det nogle gange, at nedbrydningsprodukterne af et lægemiddelstof, som dannes i leveren, er skadelige. Disse stoffer kaldes for reaktive metabolitter, og deres

FRA EN ENKELT ROTTE TIL FLERE MILLIONER HEPATOCYTER

Forskere rundt omkring i verden har de seneste år været under pres for at formindske antallet af forsøgsdyr i medicinsk forskning. EU har en målsætning, som opfordrer forskere til at reducere antallet af forsøgsdyr, formindske dyrenes ubehag og smerte og i videst muligt omfang bruge alternative metoder.

I den sammenhæng har vi implementeret en teknik, som gør det muligt at isolere hepatocytter fra rotter. En enkel rotte kan give flere hundrede millioner celler, som herefter kan fryses ned på en bestemt måde og opbevares i flydende nitrogen med et minimalt tab af deres egenskaber. Disse celler kan opbevares i flere år og kan bruges til mange eksperimenter, og dermed spare mange forsøgsdyrs liv.

betydning for lægemiddelbivirkninger har i nogle tilfælde vist sig at være dramatisk. Et eksempel er paracetamolforgiftning, som hvert år dræber flere mennesker verden over. Forskning i reaktive metabolitters skadevirkninger har været i fokus i Lægemiddelmetabolismegruppen på Det Farmaceutiske Fakultet gennem mange år. Brug af meget følsomme analytiske metoder som væskechromatografi koblet til et massespektrometer giver nu mulighed for at undersøge metabolitter i levende celler eller celledele. Forskningen har vist, at et enkelt lægemiddel kan nedbrydes til mange forskellige metabolitter – i visse tilfælde mere end 20.

Hvert eneste af disse stoffer vil gå sin egen vej i kroppen. Risikoen for, at en af metabolitterne virker toksisk, øges ikke kun med antallet, men i høj grad også af den kemiske struktur, som selve medicinen har. Kendskab til de kemiske strukturer, som øger risikoen for at der produceres reaktive metabolitter, gør det således muligt for lægemiddelindustrien at fravælge stoffer med et potentiale for disse uønskede bivirkninger.

Viden og ekspertise indsamles ved at undersøge sammenhængen mellem de kemiske strukturer og de toksikologiske egenskaber af de lægemidler, som allerede findes på markedet. Anderledes forholder det sig med lægemidler med nye kemiske strukturer. Af oplagte etiske grunde kan man ikke bare afprøve sådanne lægemiddelkandidater på mennesker uden grundige forundersøgelser. Her er det bedste alternativ at bruge humane hepatocytter, som i mange tilfælde har vist sig at være en god model til at forudsige mange lægemidlers nedbrydningsmønstre i mennesket.

Forskning i lægemiddelmetabolisme

Gruppen for Lægemiddelmetabolisme og Analytisk Kemi har i de sidste år fokuseret på mekanismen bag den toksiske

virkning af reaktive metabolitter ved at undersøge leverens bidrag til lægemiddeltoksicitet. Ved at bruge celler eller celledele i stedet for forsøgsdyr er det muligt at reducere brugen af forsøgsdyr. Når det gælder humane hepatocytter, kan man i mange europæiske lande få rester af lever fra kirurgiske indgreb med henblik på at isolere hepatocytter til forskning. Det åbner mulighed for at arbejde med menneskeceller i forsøg på at forudsige toksiciteten af lægemiddelstoffer i leveren.

Udfordringen er at kunne forudsige toksicitet i dyr eller hos mennesker ud fra nogle få celler. Det kræver en sammenkædning af forskellige oplysninger samt mange års erfaring med at bygge en model, som kan bruges til at integrere resultater fra flere forskellige eksperimenter i laboratoriet. Den erfaring er forskere rundt omkring i verden i gang med at opbygge.

Lægemiddelmetabolismegruppen har gennem mange år oparbejdet ekspertise inden for forskning i reaktive lægemidler, og gruppen er i stand til at analysere metabolitter med avancerede analytiske instrumenter og dermed opklare den kemiske struktur af mange hidtil ukendte metabolitter. Disse metabolitter er produceret ved hjælp af hepatocytter, leverfraktioner kaldet mikrosomer eller ved hjælp af elektrokemiske teknikker. Alle disse teknikker er alternative metoder til at benytte forsøgsdyr.

At undersøge og forstå leverens bidrag til lægemiddelbivirkninger vil hjælpe til både at mindske tab af menneskeliv og til at reducere de samfundsmæssige omkostninger, som er forbundet med lægemiddelrelaterede bivirkninger. Et samfundsproblem, som vokser støt i takt med at befolkningen i gennemsnit bliver ældre og ældre og dermed bruger mere og mere medicin.



Ph.d. Lassina Badolo er lektor på Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.

Nedfrysning af immunceller kan overflødiggøre forsøgskaniner i lægemiddelkontrol

200.000 kaniner anvendes hvert år i EU til rutinemæssig kontrol af injektionslægemidler for at sikre, at medicinen ikke indeholder feberfremkaldende bakterier eller bakterierester. En ny celletest kan erstatte brugen af forsøgskaniner. Cellerne kan nedfryses, og det gør testen let anvendelig overalt i medicinalindustrien.

Af Michael Timm, Lise Moesby og Erik Wind Hansen

Alle lægemidler til indsprøjtning skal rutinemæssigt kontrolleres for deres mikrobielle renhed, fordi det er vigtigt, at medicinen er fri for forurening med fx bakterier og vira. Nogle bakteriers cellevægge indeholder giftstoffet endotoksin, som er farligt for mennesker, og hvis stoffet injiceres direkte i blodbanen, kan det forårsage kraftig feber, organsvigt og i værste tilfælde døden.

For at sikre renheden af injektionslægemidler, har myndighederne stillet krav om, at lægemiddelindustrien skal gennem-

føre en grundig produktkontrol for forurening med bakterier og bakterierester, som med et fælles navn kaldes pyrogener. Kontrollen udføres ved hjælp af en af to godkendte metoder, som begge er baseret på brug af dyr.

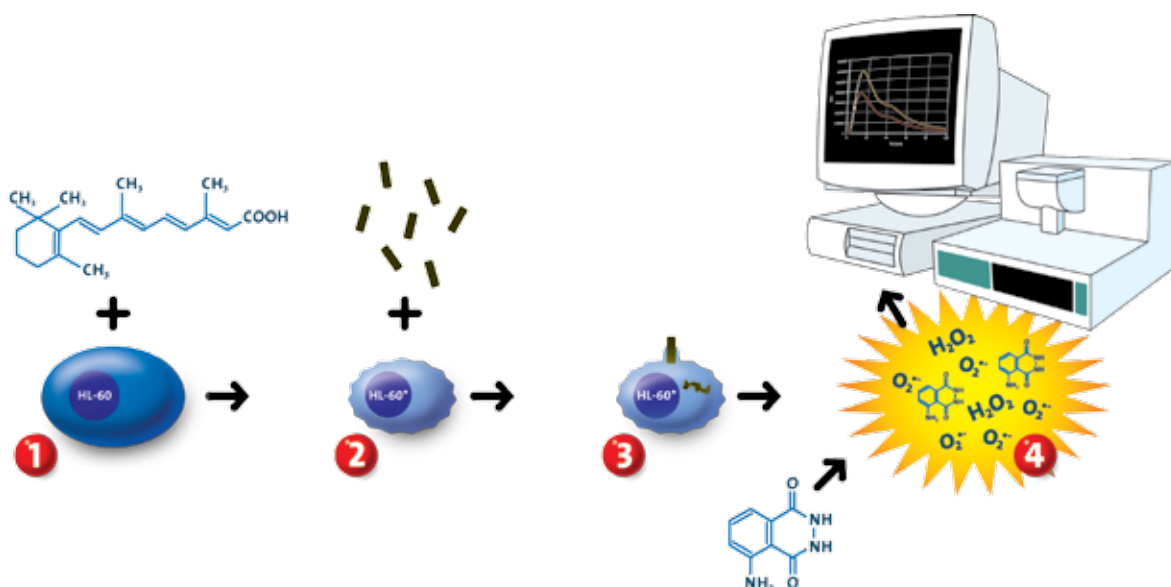
Den mest omdiskuterede af metoderne er kanin-pyrogentesten. Under testen sidder kaninerne fastspændt i over fem timer og får indsprøjet lægemidlet i en ørevene. Derefter registreres kaninens kropstemperatur, og hvis tre kaniners samlede temperaturstigning er over 2,65°C, anses lægemidlet for at være forurenet og bliver dermed ikke frigivet til brug for mennesker. Industrien i EU anvender hvert år over 200.000 kaniner til kontrol af lægemidler.

Alternativ til kanin-pyrogentesten

På Institut for Farmakologi og Farmakoterapi har vi udviklet en ny pyrogentest, som er baseret på en human cellelinie, hvor cellerne er optimeret til at minde om kroppens egne immunceller. Fordelen ved at anvende cellelinien er, at cellerne



Kanin-pyrogentesten udført som beskrevet i den europæiske farmakopé: Kaninen sidder fastspændt i over fem timer og får lægemidlet indsprøjet i en ørevene. Hvis medicinen er forurenet med pyrogener, får kaninen feber.



Celler fra den humane cellelinie, HL-60, kan udvikles til aktive immunceller i laboratoriet. Når en opløsning med cellerne udsættes for et lægemiddel, som indeholder pyrogener, frigiver cellerne reaktive iltforbindelser, der reagerer med stoffet luminol, som så udsender lys. Hvis prøven ikke lyser, er lægemidlet rent.

stammer fra et menneske, hvorfor deres reaktionsmønster i meget høj grad afspejler menneskers reaktion på pyrogener. Testen er hurtigere og mere præcis end den eksisterende kanin-pyrogentest.

Inden testen udføres, behandles den humane cellelinie HL-60 med A-vitaminsyre, hvorved cellerne kan udvikle sig – differentiere – til aktive immunceller. Hvis man derpå tilsætter et forurenset lægemiddel, vil de reagere på samme måde som immunforsvarets celler og forsøge at ødelægge og nedbryde bakterier og bakterielle bestanddele. I denne proces anvender cellerne et arsenal af aktive og toksiske stoffer, herunder reaktive iltforbindelser.

Frigivelsen af reaktive iltforbindelser fra en celleduspension kan nemt måles, fordi de reagerer med stoffet luminol, som udsender lys. Prøven vil derfor lyse, hvis der er pyrogener i den, og lyset registreres af et måleinstrument, der kaldes et luminometer. Hvis lægemidlet er fri for pyrogener, udsender prøven intet lys.

Krævende celledyrkning

HL-60-pyrogentesten, som er opfundet på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi, er mere følsom end kanin-pyrogentesten og er samtidig mere præcis. Derfor virker den som et oplagt alternativ. Desværre er dyrkning af celler kompliceret, og derfor har testen indtil videre kun været anvendelig for medicinalvirksomheder, som har passende faciliteter til celledyrkning og særligt uddannet personale. Det har begrænset anvendeligheden betragteligt, hvilket er uheldigt, ikke mindst fordi det ydermere er ønskeligt at kunne anvende pyrogentests i forbindelse med råvarekontrol, proceskontrol og færdigvarekontrol.

Der er med andre ord brug for, at man også kan benytte pyrogentesten på steder, hvor der ikke er celledyrkningsfaciliteter til rådighed. Hvis den cellebaserede test skal anvendes bredt, er det derfor nødvendigt at kunne transportere cel-

lerne hen til det sted, hvor de skal bruges.

Nedfrysning muliggør transport og lagring

Nedfrysning er en meget anvendt metode, når man skal lagre eller transportere celler. I lighed med sædceller og ægceller er det også muligt at nedfryse cellelinier, uden at cellerne tager nævneværdigt skade. Men nogle celler er meget svære at nedfryse. Dette gælder for immunceller, der indeholder og producerer toksiske stoffer såsom reaktive iltforbindelser. Disse stoffer opbevares inde i cellen i små hulrum kaldet granula. Det er inde i disse granula, at immuncellerne dræber og nedbryder bakterier, og på den måde sørger immuncellerne for, at de toksiske stoffer kun i meget ringe grad kommer udenfor cellen. Imidlertid kan nedfrysning være så hård for immuncellerne, at deres granula går i stykker, hvorved cellerne ødelægges sig selv.

Let at anvende nedfrosne celler

Selvom det er svært at nedfryse immunceller, så de overlever frysning og optøning, er det lykkedes at nedfryse differentierede HL-60-celler. Cellerne er testet over for flere pyrogener, og de er stadig i stand til at detektere disse forureninger i koncentrationer, der er lavere end de koncentrationer, som kanin-pyrogentesten er i stand til at påvise. Vore undersøgelser viser, at cellerne kan nedfryses og lagres i flydende nitrogen i over to måneder uden tab af følsomhed.

Det er derfor muligt at udføre en pyrogentest baseret på nedfrosne celler. Med denne nye test er det ikke længere nødvendigt at have celledyrkningsfaciliteter til rådighed. Ved test af lægemidler for pyrogener kan man optø en ampul med celler og tilsætte sit lægemiddel, hvorefter man blot skal måle udsendelsen af lys. Det er med andre ord blevet så simpelt at anvende den nye test, at den bør have potentiale til at erstatte den omstridte brug af forsøgskaniner i den rutinemæssige kontrol af lægemidler til injektion.

STYR PÅ NEDFRYSNINGSHASTIGHEDEN

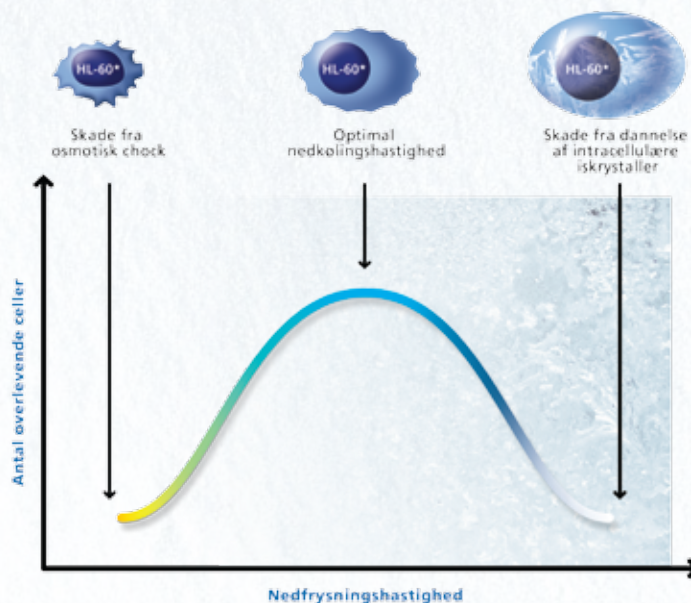
Når immunceller nedfryses, er nedfrysningshastigheden meget vigtig for cellernes overlevelse. Hvis cellerne fryses for langsomt, vil der opstå en ubalance i saltkoncentrationen inde i cellen, og det kan ødelægge cellernes funktionalitet. Desuden medfører langsom nedfrysning dannelse af meget store iskrystaller i den omgivende væske, som fysisk kan skade cellerne. Omvendt – hvis der fryses for hurtigt, dannes der iskrystaller inde i cellen, som vil få cellen til at svulme op, hvorved den ødelægges. Nedfrysningshastigheden må derfor hverken være for hurtig eller langsom.

For at kunne styre nedfrysningsproceduren i mindste detalje benytter vi en fryser, som anvender flydende nitrogen til en temperaturkontrolleret nedfrysning. Fryseren kan meget præcist programmeres til at nedfryse cellerne med en optimal hastighed.

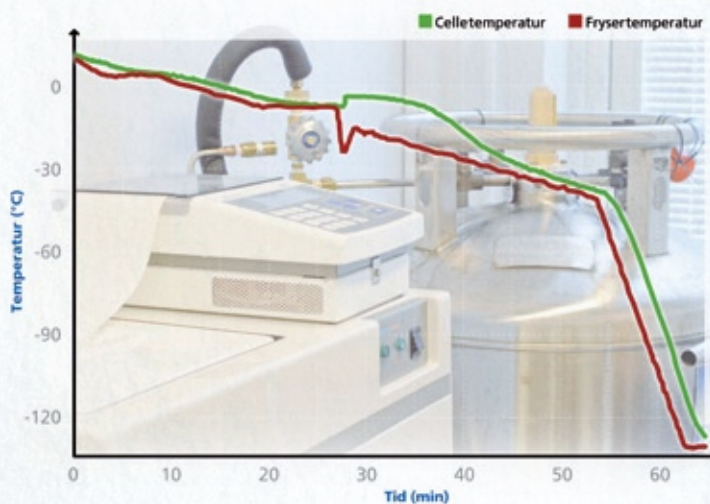
Inden frysningen underafkøles væsken, der omgiver cellerne, hvilket medfører, at faseovergangen mellem vand og is sker meget hurtigt. På denne måde dannes der meget små iskrystaller både udenfor cellen og inde i cellen samtidig. Dette giver de bedste forudsætninger for, at cellerne overlever nedfrysningen.

Før den egentlige start på nedfrysningen underafkøles opløsningen med celler derfor til -7°C . Når væsken er underafkølet, vil de fryse øjeblikkeligt, hvis de påvirkes – enten mekanisk ved omrystning eller berøring eller ved et brat temperaturfald. Vi initierer faseovergangen mellem en vandig fase og is ved at sænke temperaturen fra -7°C til -25°C på under et minut. Resultatet er paradoksalt nok, at temperaturen i prøven stiger! Denne temperaturstigning skyldes, at faseovergangen mellem vand og is frigiver energi, som medfører dannelse af varme. Det indikerer, at faseovergangen er sket, og at prøven er frosset.

Herefter udføres resten af nedfrysningen efter et nøje planlagt skema til -130°C med ca. 1 grad pr. minut, hvorefter prøverne anbringes direkte i flydende nitrogen med en temperatur på ca. -190°C .



For at sikre cellernes overlevelse, skal nedfrysningshastigheden kontrolleres nøje – den må hverken være for hurtig eller for langsom.



Grafen viser forløbet af nedfrysningen. Cellerne suspenderes i en frysevæske, der fordeles i små ampuller og anbringes i nitrogenfryseren. Herefter startes den kontrollerede nedfrysning af cellerne. Den røde kurve viser temperaturen inde i fryseren, mens den grønne viser temperaturen inde i celleduspensionen.

Cand.pharm. Michael Timm er ph.d.-studerende på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.
Ph.d. (pharm) Lise Moesby er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.
Ph.d. (pharm) Erik Wind Hansen er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Nye depotlægemidler til injektion i gigtramte led:

Kan laboratorie- modeller reducere antallet af dyreforsøg?

Ved behandling af fx slidgigt indsprøjtes lægemiddelstoffet i det berørte led i et depotpræparat, som frigiver stoffet langsomt. Nye lægemiddelkandidater kræver nye depotformuleringer, som først skal afprøves på dyr. Udvikling af laboratiormodeller kan sandsynligvis reducere antallet af dyreforsøg.

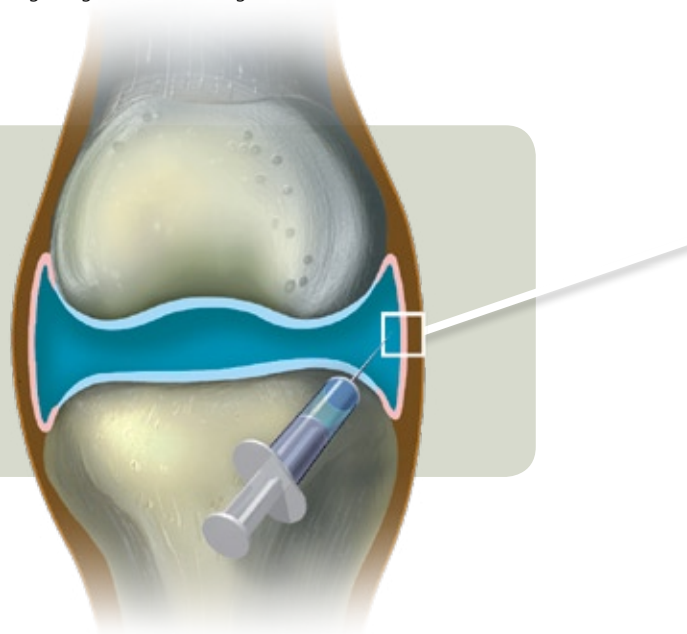
Af Anna Buus Frost, Susan Weng Larsen, Jesper Østergaard og Claus Selch Larsen

Ved behandling af gigtsygdomme som slidgigt og leddegigt er lægemiddelstoffers angrebspunkt lokaliseret til det indre af et eller flere af kroppens store bevægelsesled som knæ og hofte. Lægemiddelstoffet skal ind i ledvæsken for at virke. Hvis stoffet indgives i tabletter, skal det frigives i mave-tarm-systemet og transporteres med blodet hen til fx knæet. Det gælder som en tommelfingerregel, at kun en tusindedel eller mindre af den totale mængde lægemiddelstof når frem til målområdet. Til sammenligning kan terapeutiske koncentrationer i ledvæsken opnås med en meget mindre dosis af

stoffet, såfremt det indgives direkte i den væskefyldte ledhule ved injektion. Samtidig reduceres risikoen for systemiske bivirkninger betragteligt på grund af den lokaliserede indgift. Desværre har lægemiddelstoffer opløst i ledvæsken kun en kort opholdstid på nogle timer i ledhulen, fordi stofferne transporteres over i blodbanen. Ved behandling af gigt er det imidlertid ønskeligt, at virkningen opretholdes over dage eller uger. For at undgå gentagne injektioner – og det dermed forbundne ubehag for patienten – er det en fordel at indgive lægemiddelstoffet i et depotpræparat. Med depotpræparater kan man opnå en længerevarende virkning, som skyldes, at depotet efter injektion forbliver i indstiksområdet, hvor det langsomt frigiver det terapeutiske stof. Gennem flere årtier har injektion af langtidsvirkende steroidpræparater i led været anvendt til at reducere betændelsestilstande og smerte i behandlingen af de to største gigtsygdomme, leddegigt og slidgigt. Nutidens behandling kan dog ikke kurere sygdommene, som forringer livskvaliteten for et meget stort antal patienter, og som påfører samfundet betydelige udgifter. I den vestlige verdens lande er de samlede

DE STORE BEVÆGELSESLÆD

De større bevægelsesled (synoviale led) som knæ og hofte tillader mere eller mindre fri bevægelighed mellem knoglerne, som er adskilt ved et hulrum fyldt med ledvæske (synovialvæske). Knogleenderne er belagt med elastisk brusk, og ledhulen er afgrænset af en ledkapsel med to lag. Synovialmembranen, der udgør kapslens indre lag, indeholder både blodkar og lymfekår, som sikrer udveksling af stoffer mellem blodbanen og ledvæsken.





Laboratiormodellen består af en lille donorcelle, der indeholder 5 ml svarende til et led. Donorcellen er adskilt fra acceptorfase med en membran, som tillader transport af lægemiddelstof mellem de to faser. Acceptorfase repræsenterer blodbanen og indeholder 1000 ml. Lægemiddelformuleringerne placeres inde i donorcellen ved forsøgets start, og der udtages herefter prøver med passende tidsintervaller fra acceptorfase. Ud fra indholdet af lægemiddelstof i prøverne kan afgiftshastigheden fra depotpræparatet bestemmes.

omkostninger relateret til gigtsygdomme estimeret til at være 1-2,5 procent af bruttonationalproduktet.

Nye lægemiddelstoffer

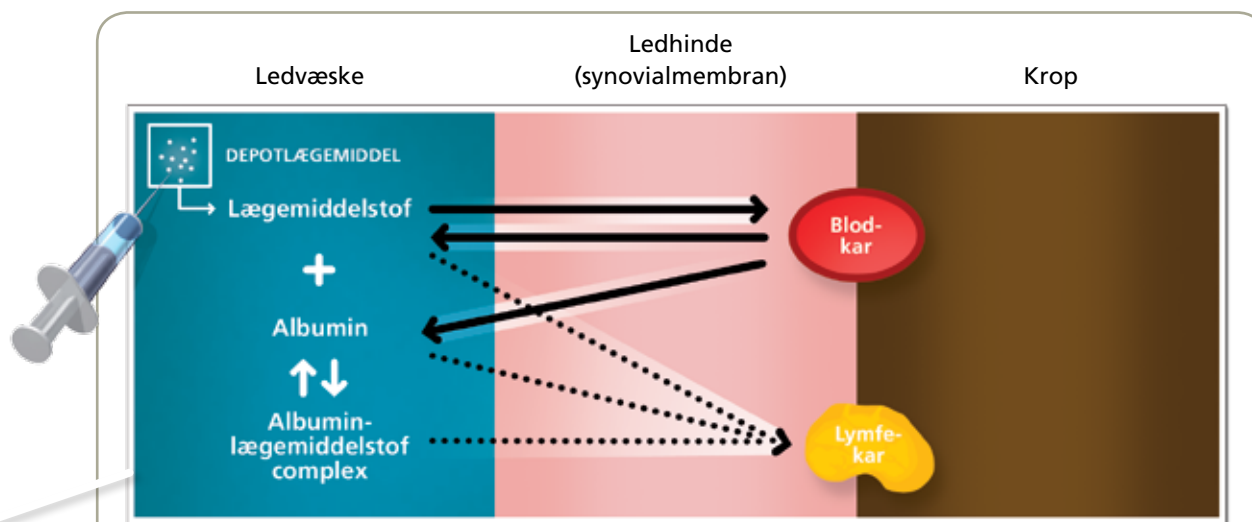
Når det gælder slidgigt, som er den mest udbredte gigtsygdom, er der identificeret spændende nye angrebepunkter for medicin, hvilket kan føre til udvikling af lægemiddelstoffer, som kan kurere eller i det mindste forsinke udviklingen af sygdommen væsentligt. Dét har skærpet interessen for udvikling af nye principper for design af depotpræparater, som efter injektion i et led kan afgive det aktive stof med en reproducerbar hastighed over en ønsket tidsperiode.

Udvikling af nye lægemidler er en kompleks, tidskrævende og dyr proces med mange delprocesser, som den farmaceutiske industri til stadighed forsøger at optimere. Efter at lægemiddelstoffekandidaten er udvalgt, er det vigtigt at få stoffet

indbygget i et færdigt lægemiddel, som er klar til brug.

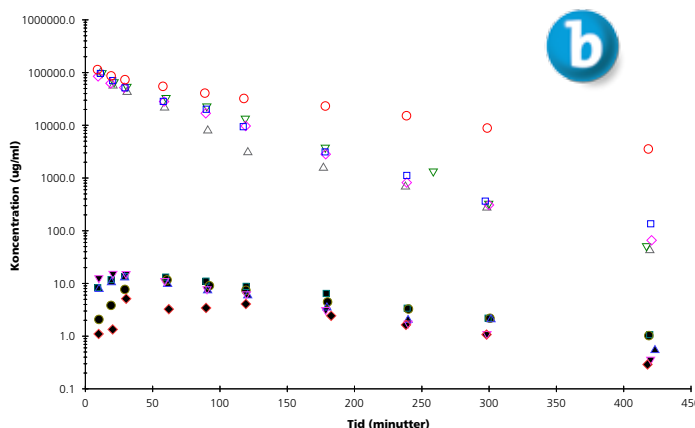
Denne opgave er en stor udfordring, såfremt der skal udvikles et depotpræparat beregnet til injektion i led. For det første skal det sterile præparat helst være stabilt i opbevaringsbeholderen i mindst to år. Og for det andet skal præparatet efter indføring i ledhulen afgive det indeholdte lægemiddelstof til ledvæsken over den ønskede tidsperiode.

Ved udvikling af nye formuleringer af depotpræparater er det et krav, at præparatet har været testet i passende dyremodeller før de første kliniske afprøvninger på mennesker. Af dyreetiske såvel som tidsmæssige årsager vil det være optimalt, hvis laboratiormodeller i det mindste delvist kan benyttes i udviklingen af en depotformulering, der efter injektion i ledvæsken frembringer den ønskede afgiftsprofil. I dag findes der ingen myndighedsgodkendte laboratiormodeller til afprøvning af depotpræparater til injektion.



DEPOTPRÆPARATER I LEDHULEN

Efter injektion af et depotpræparat i ledhulen kan en række forhold påvirke varigheden af lægemidlets virkning. Ideelt set skal depotet forblive i målområdet og her afgive det aktive lægemiddelstof med den tilsigtede hastighed. Det frigjorte stof transporteres via ledvæsken til det specifikke virkningssted i ledhulen. Samtidig fjernes en del af stoffet fra ledvæsken ved nedbrydning eller via transport over i blodkar og lymfekar. Også binding af stoffet til proteiner som albumin i ledhulen påvirker muligheden for at opretholde en terapeutisk koncentration af lægemiddelstoffet ved receptoren.



a Fem heste fik med en uges mellemrum to indsprøjtninger af en vandig opløsning af et modellægemedelstof, henholdsvis i en vene og direkte i ledvæsken. **b** For hver hest blev koncentrationen af stoffet i ledvæsken bestemt som en funktion af tiden efter injektion i en vene (fyldte symboler) og i ledvæsken (åbne symboler). Arealet under hver af de 10 kurver viser, hvor meget stof det pågældende led blev eksponeret for. Ved injektion i en vene påvirkes leddet i gennemsnit kun af 0,03 procent af dosis. Ved direkte injektion i ledvæsken blev leddet eksponeret for hele dosis.

Laboratoriemodeller

Laboratoriemodeller kan designes, så de mere eller mindre efterligner de forhold, som depotet udsættes for efter injektion ind i ledhulen, hvor præparatet frigiver lægemiddelstof til ledvæsken. I takt med at lægemiddelstoffet frigives fra depotet, fjernes en del af det opløste stof fra ledvæsken fx via transport over i blodbanen. Hastigheden for frigivelsen er primært styret af depotets sammensætning, mens transport-hastigheden af opløst lægemiddelstof ud af leddet varierer med stoffets fysisk-kemiske egenskaber. Koncentrationen af stof i virkningsområdet over tid påvirkes derfor af, hvor hurtigt de to modsat rettede processer forløber.

Vi har brugt relativt simple laboratoriemodeller til at undersøge, hvordan variation i sammensætningen af farmaceutiske hjælpestoffer påvirker lægemiddelstoffets afgiftshastighed fra udvalgte formuleringstyper.

Korrelation med dyreforsøg

I den optimale situation kan man ud fra laboratoriemodellen etablere en korrelation til tilsvarende forsøg i en dyremodel. Det vil sige, at de afgiftsdata, der genereres i laboratoriemodellen, kan bruges til at forudsige, hvorledes lægemiddelstoffet vil opføre sig efter indgift i leddet på et dyr, når det er formuleret i et depotpræparat.

For at etablere en sådan korrelation har vi valgt hesten som

dyremodel på grund af dens store led. Samtidig er heste også en mulig målgruppe for depotpræparater, fordi de ofte får problemer med leddene.

I et forsøg med fem heste har vi vist, at der kan opnås den ønskede korrelation mellem laboratoriemodellen og dyremodellen, når stoffet indgives i en vandig opløsning. Vi har netop igangsat et forsøg til afdækning af, hvorvidt vores laboratoriemodel også er i stand til at frembringe en tilsvarende korrelation ved injektion af et egentligt depotpræparat. Etableringen af en sådan korrelation vil sandsynligvis kunne reducere antallet af forsøgsdyr til prækliniske forsøg og ydermere være et nyttigt værktøj i den videre udvikling af nye lægemidler til behandling af slidgigt og leddegigt.



Cand.pharm. Anna Buus Frost er ph.d.-studerende på Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.
Ph.d. Susan Weng Larsen er lektor på Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.
Ph.d. Jesper Østergaard er lektor på Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.
Dr.pharm. Claus Selch Larsen er professor på Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.

Ufølsomme hjerter i livsfare



Når blodkarrene er forkalkede, og hjertet mangler ilt, er en god nervefunktion afgørende for, hvordan kroppen reagerer. For diabetikere kan ændringer i nervefunktionen betyde forskellen mellem liv og død under hjerteiskæmi. En øget forståelse af disse ændringer kan bane vej for tidlige diagnoser og rettidig behandling.

Af Marie Louise Muus Ghorbani, Bjarne Fjalland, Majid Sheykhzade og Niels C. B. Nyborg

Det anslås, at 200.000-300.000 danskere har type 2-diabetes, og antallet er stigende. Diabetes øger risikoen for at udvikle hjerte-karsygdomme, som er årsag til tre ud af fire dødsfald blandt personer med type 2-diabetes.

Når diabetes diagnosticeres, har en ud af tre allerede hjerteiskæmi, hvor blodforsyningen til hjertet er nedsat. Blandt diabetikere er de iskæmiske tilfælde alvorligere end normalt, og dødeligheden er højere.

Når hjertet mangler ilt

Blodet indeholder ilt og næringsstoffer, som er livsnødvendige for kroppen, og blodet pumpes rundt til alle dele af organismen af kroppens største muskel, hjertet. For at kunne pumpe normalt skal hjertet selv forsynes med blod, og det sker via kranspulsårerne, som er små blodkar, der sidder i hjertemuskulaturen.

Hvis kranspulsårerne forsnævres på grund af aflejring af fedt og døde celler i blodkarvæggen, forringes tilførslen af blod og ilt til hjertet. Det er den mest almindelige årsag til hjerteiskæmi, som bl.a. diabetikere og overvægtige har øget risiko for at udvikle. Tilstanden er kendetegnet ved, at hjertet ikke får ilt nok. Det er især et alvorligt problem, når hjertets iltbehov stiger, fx ved fysisk aktivitet. De iskæmiske episoder er typisk forbigående og ophører, når den iskæmifremkaldende aktivitet stoppes, eller når tilstanden behandles, så blodgennemstrømningen forøges.

I nogle tilfælde sker en fuldstændig aflukning af blodgennemstrømningen på grund af en blodprop. Her er det nødvendigt med en hurtig behandling, hvis hjertevævet ikke skal gå til grunde, hvilket kan medføre døden.

Smerter eller ej

Hjerteiskæmi er typisk ledsaget af smerter i brystet, angina pectoris, og nogle gange ledsages smerterne af angst og kvalme. Trods ubehaget er smerten nyttig, fordi den er et

advarselssignal om, at der er noget galt, så personen kan søge hurtig behandling.

Imidlertid er nogle mennesker symptomfrie under iskæmiske episoder og lider dermed af "tavs hjerteiskæmi". Manglen på symptomer er meget alvorlig, fordi tilstanden ubemærket kan forværres og i værste fald kan føre til pludselig død. Studier tyder på, at forekomsten af hjerteiskæmi, som ikke er ledsaget af smerte, er højere end normalt, hvis man har diabetes.

Nervernes reaktion på iskæmi

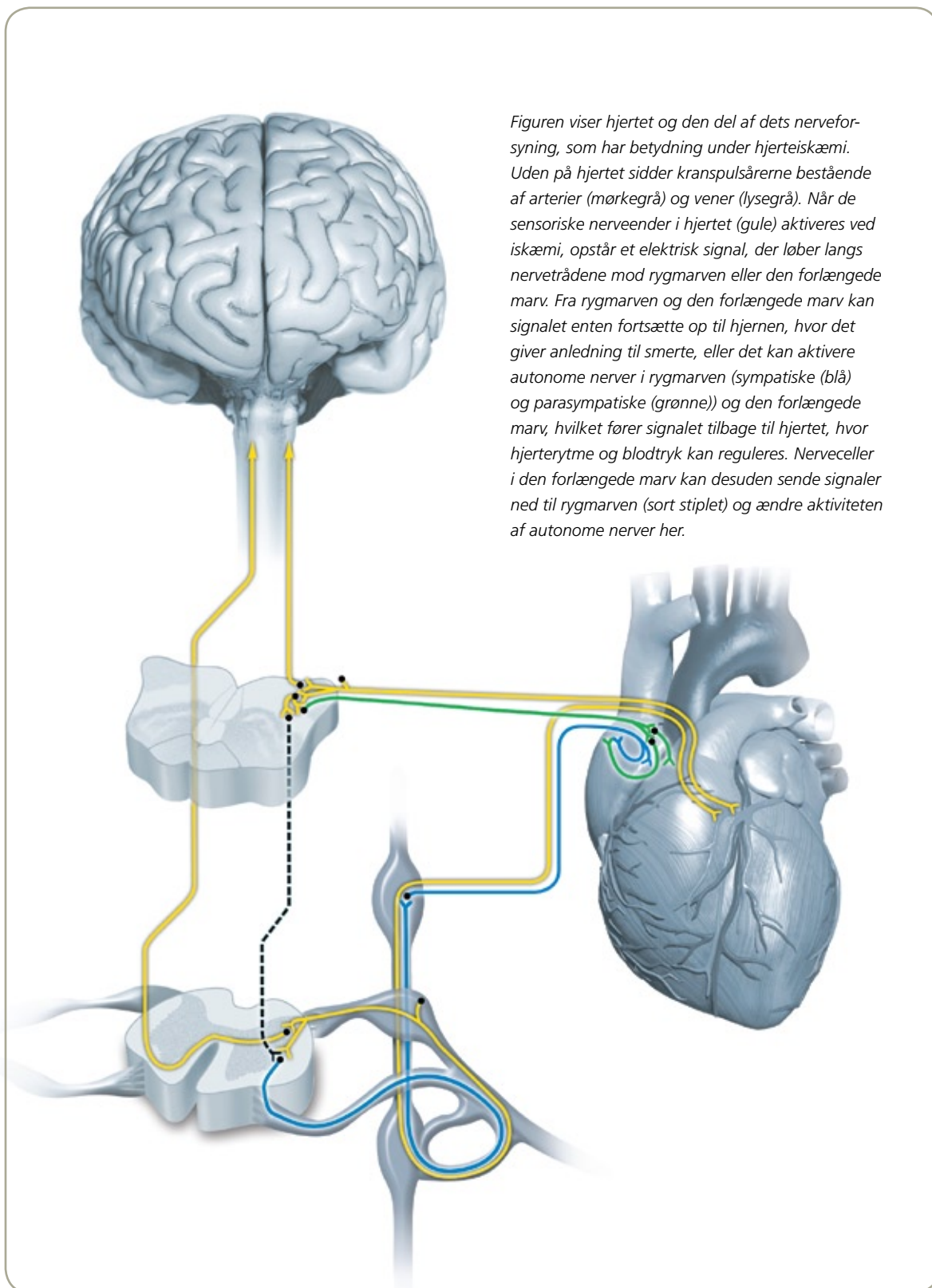
Under hjerteiskæmi danner muskelcellerne mælkesyre, hvilket medfører et lokalt fald i pH. Derudover frigives en række stoffer som adenosin, bradykinin, serotonin og prostaglandin E₂. Alle disse stoffer er med til at aktivere eller sensibilisere sensoriske nerveender.

Aktivering af de sensoriske nerveender under hjerteiskæmi tjener flere formål. Fx frigives der blodkarafslappende stoffer, som øger blodgennemstrømningen gennem kranspulsårerne. Desuden sendes der elektriske signaler fra nerveenderne i hjertet til hjernen, hvor de omsættes til smerte. Signalerne kan gå via rygmarven og vil da give anledning til smerter i bryst og arm eller via den forlængede marv, hvilket medfører smerter i hals og kæbe. Nogle af de signaler, som løber fra de sensoriske nerveender i hjertet til rygmarven eller den forlængede marv, kan aktivere de autonome nerver her, og det medfører regulering af hjerterytmen og blodtrykket. Endelig kan nerveceller fra den forlængede marv sende signaler ned til rygmarven og her ændre aktiviteten af de autonome nerver, der regulerer hjerterytme og blodtryk.

De sensoriske nerver er dermed afgørende for, hvordan kroppen kompenserer for den nedsatte iltforsyning under iskæmi og for smerteopfattelsen og dermed evnen til at reagere og søge behandling.

HJERTETS NERVEFORSYNING

Hjertet er forbundet med nerver fra det autonome og det sensoriske nervesystem. De autonome nerver (sympatiske og parasympatiske) løber til hjertet, hvor deres funktion bl.a. er at regulere hjerterytmen og blodtrykket. De sensoriske nerver løber fra hjertet, parallelt med de autonome nerver, og fungerer som sensorer ved sygdomstilstande såsom hjerteiskæmi og ved ændringer i blodtrykket.

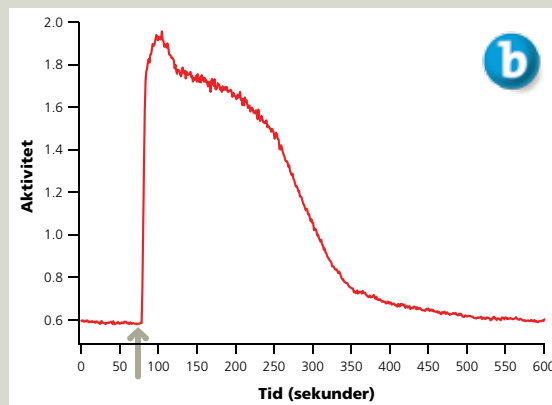


Figuren viser hjertet og den del af dets nerveforsyning, som har betydning under hjerteiskæmi. Uden på hjertet sidder kranspulsårerne bestående af arterier (mørkegrå) og vener (lysegrå). Når de sensoriske nerveender i hjertet (gule) aktiveres ved iskæmi, opstår et elektrisk signal, der løber langs nervetrådene mod rygmarven eller den forlængede marv. Fra rygmarven og den forlængede marv kan signalet enten fortsætte op til hjernen, hvor det giver anledning til smerte, eller det kan aktivere autonome nerver i rygmarven (sympatiske (blå) og parasympatiske (grønne)) og den forlængede marv, hvilket fører signalet tilbage til hjertet, hvor hjerterytme og blodtryk kan reguleres. Nerveceller i den forlængede marv kan desuden sende signaler ned til rygmarven (sort stiple) og ændre aktiviteten af autonome nerver her.

Diabetes og sensoriske nerver

Diabetikere udvikler ofte ændringer i nerver og nervefunktion, som muligvis kan medvirke til den forhøjede forekomst af både tavs tilfælde og mere alvorlige tilfælde af hjerteiskæmi. Flere studier har vist, at der under diabetes sker ændringer i de autonome nerver, og at disse ændringer kan have betydning under hjerteiskæmi. Men der har hidtil været meget lidt fokus på betydningen af de sensoriske nerver. I vores laboratorium på Det Farmaceutiske Fakultet undersø-

ges det, om diabetes giver anledning til funktionelle ændringer i de sensoriske nerver, der løber fra hjertet til rygmarven, og om disse ændringer kan have betydning ved hjerteiskæmi. Undersøgelsen udføres på nerveceller fra en cellekultur, som er oprenset ud fra dorsalslagganglier. Dorsalslaggangliet ligger lige uden for rygmarven og indeholder nerveceller, som hver har to nervetråde med nerveender i henholdsvis rygmarven og et organ; for nogle cellers vedkommende i hjertet. Disse nerveceller er bindeleddet mellem hjertet og rygmar-



Aktivitetstest. (a) Kultur af nerveceller fra dorsalrodsganglierne. Cellerne, hvis nervetråde stammer fra hjertet, er farvet røde og tydelige at identificere. (b) Repræsentativ graf fra et aktivitetstest. Cellens aktivitet steg få sekunder efter stimulering (pil) med en blanding af bradykinin, serotonin, adenosin og prostaglandin E2, samt capsaicin. pH var indstillet til 6.5.

ven, idet signaler opstået i nerveenderne i hjertet under iskæmi løber direkte via nervecellerne i dorsalrodsgangliet på vej mod rygmarven. Disse nerveceller er dermed de første, der modtager signal om, at hjertet mangler ilt.

De receptorer og neuropeptider, som findes i nerveenderne, dannes i nervecellen i dorsalrodsgangliet – og kan findes begge steder. Det betyder, at nervecellerne i dorsalrodsganglierne kan forventes at opføre sig på samme måde som nerveenderne. Ved at undersøge aktiviteten af nervecellerne får man dermed en ide om, hvordan nerveenderne ville reagere under de pågældende forhold. Cellerne er således meget relevante at studere i forbindelse med hjerteiskæmi.

Afvielser i aktiviteten af nervecellerne under diabetes kan betyde, at kroppen ikke på samme måde som normalt registrerer og reagerer på, at hjertet mangler ilt. Dermed kan signalet fra hjertet til rygmarven være ændret, hvilket kan medføre ændringer i signalet til hjernen; dvs. ændret smerteopfattelse, men også forandringer i reguleringen af blodtrykket og hjerterytmen, hvilket kunne føre til mere alvorlige tilfælde af hjerteiskæmi. Begge dele ville kunne medvirke til den højere dødelighed, som ses blandt diabetikere med hjerteiskæmi.

Celler fra diabetiske rotter

Vi studerer celler fra rotter, der hedder Zucker Diabetic Fatty (ZDF)-rotter, og de får spontant type 2-diabetes i 7-ugers alderen, karakteriseret ved forhøjet blodsukker. Dyrene udvikler nerveændringer, som kan sammenlignes med menneskers, og ZDF-rotterne er derfor en god model til disse undersøgelser. Under forsøgene benyttes raske rotter som kontrolgruppe.

Der er etableret en metode til farvning af de sensoriske nerveceller, som har nerveender i hjertet. Her indsprøjtes et fluorescerende farvestof i den tynde hinde, som omgiver hjertet.

Farvestoffet bliver efterfølgende optaget af nerveenderne og transporteret til nervecellerne i dorsalrodsganglierne. Flere uger senere aflives dyrene, hvorpå dorsalrodsganglierne isoleres, og cellerne oprenses. Hjerteneuronerne identificeres under mikroskop ved at tilføre lys af en bølglængde, som det fluorescerende stof absorberer, hvorved cellerne farves røde. Når nerveceller aktiveres, stiger calcium-niveauet inde i cellen. Det kan måles ved hjælp af det fluorescerende stof FURA-2, som cellerne inkuberes med. Farvestoffet binder til calcium og absorberer lys ved forskellige bølglængder afhængigt af, om det er bundet eller ubundet. Når cellen aktiveres, vil den øgede mængde calcium i cellen binde til FURA-2, og det medfører et skift i lysintensiteten af FURA-2 ved de to bølglængder. Ved at beregne forholdet mellem lysintensiteten ved de to bølglængder, får man et mål for nervecellernes aktivitet. Cellerne ses gennem mikroskop, og der er et kamera tilkoblet, som tager billeder skiftevis ved de to bølglængder. På denne måde kan nervecellernes aktivitet følges under hele forsøget.

For at aktivere nervecellerne tilføres kulturen en kombination af stoffer, som dannes lokalt i hjertet under hjerteiskæmi, samt capsaicin, som findes i chili, og som ligeledes aktiverer de sensoriske nerveceller. Når nervecellerne stimuleres med blandingen, stiger aktiviteten, og efterfølgende vender koncentrationen af calcium langsomt tilbage til udgangsniveauet. Målet med forsøgsrækken er at rette opmærksomheden mod vigtigheden af at få diagnosticeret de diabetiske patienter, der lider af hjerteiskæmi. Hvis der er sammenhæng mellem ændret sensorisk nervefunktion ved diabetes og kroppens reaktion på hjerteiskæmi, vil en vurdering af den sensoriske nervefunktion kunne bruges som kriterium til at screene patienterne for hjerteiskæmi. Tidlig diagnosticering vil muliggøre rettidig behandling og dermed øge overlevelsen blandt disse patienter.

Cand.pharm. Marie Louise Muus Ghorbani er ph.d.-studerende på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

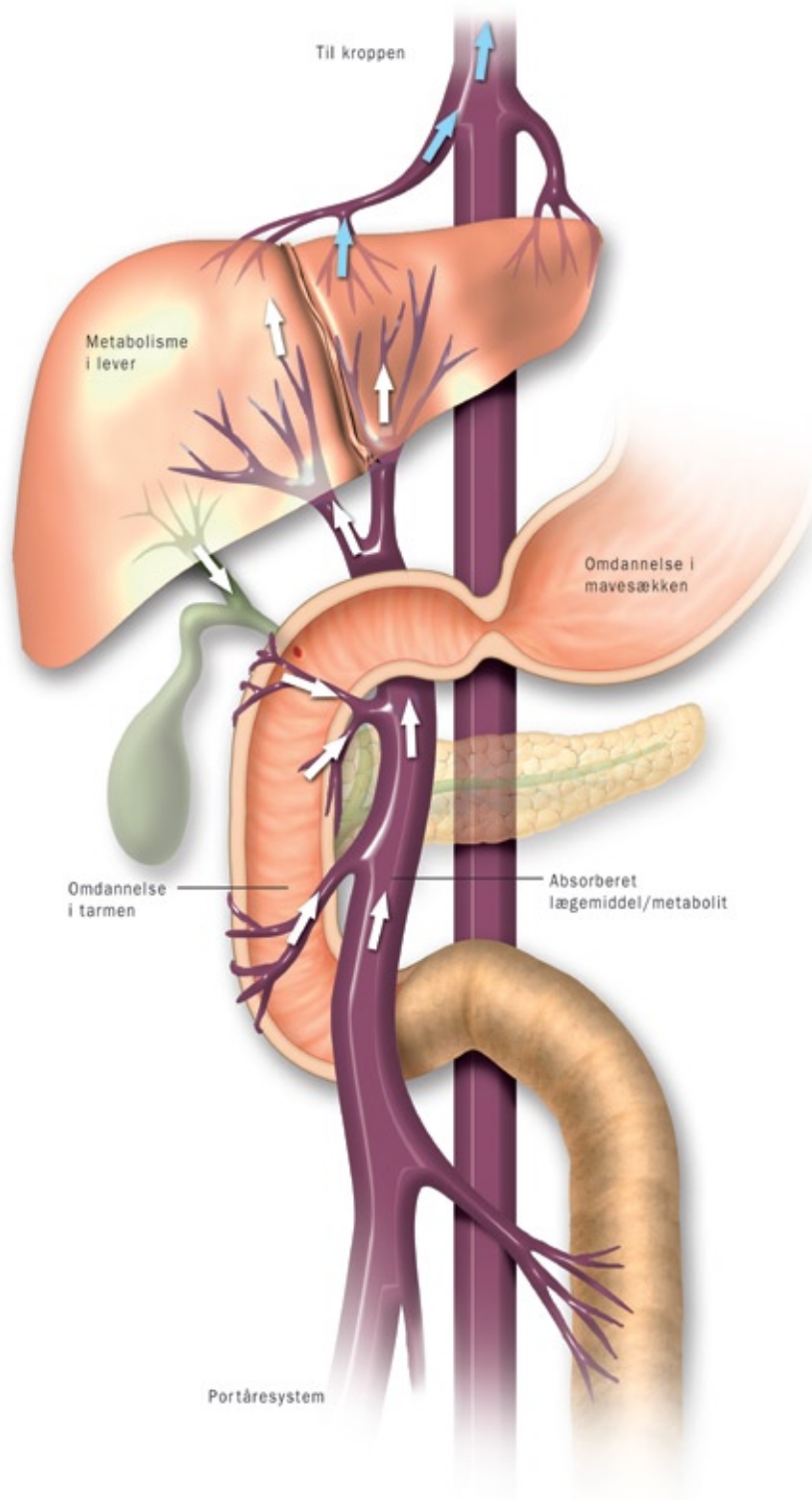
Ph.d. Bjarne Fjalland er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Ph.d. Majid Sheykhzade er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Dr.med. Niels C.B. Nyborg er Preclinical Project Director på Novo Nordisk A/S.

Modelstoffer

– forskning i selens kræftforebyggende mekanismer



Indtagede stoffers vej til organismen.

Modelstoffer kan anvendes for at tage højde for, at laboratoriemodeller er forenklede i forhold til menneskekroppen. Vi har undersøgt egnetheden af et modelstof, der ofte bruges til forskning i selens kræftforebyggende virkningsmekanismer.

Af Charlotte Gabel-Jensen og Bente Gammelgaard

Selen er et essentielt sporelement, der indtages via føden og i kosttilskud. Forsøg i isolerede celler, dyremodeller og mennesker har vist, at selen har en beskyttende virkning mod flere former for kræft.

Derfor er der stor lægevidenskabelig interesse for selen. Især er det ønskeligt at opklare, hvordan selen omsættes i kroppen for at øge forståelsen af den kræftforebyggende effekt. Selens metabolisme kan klarlægges ved at identificere og kvantificere selens metabolitter i biologiske prøver, der spænder over hele spektret fra humane og animalske prøver til cellekulturer.

Strategien for denne selenspeciering er anvendelse af forskellige former for massespektrometri, som supplerer hinanden. LC-ICP-MS bruges til detektion af selenholdige forbindelser i en prøve og til kvantificering heraf, mens LC-ESI-MS benyttes til identifikation af de detekterede forbindelser.

Selen og kræft

Selen optages let fra mad. Sporstoffet indbygges derpå enten i aminosyren selenocystein, som indgår i kroppens selenoproteiner, eller uspecifikt i almindelige proteiner som selenomethionin, hvor kroppen ikke skelner mellem methionin og selenomethionin.

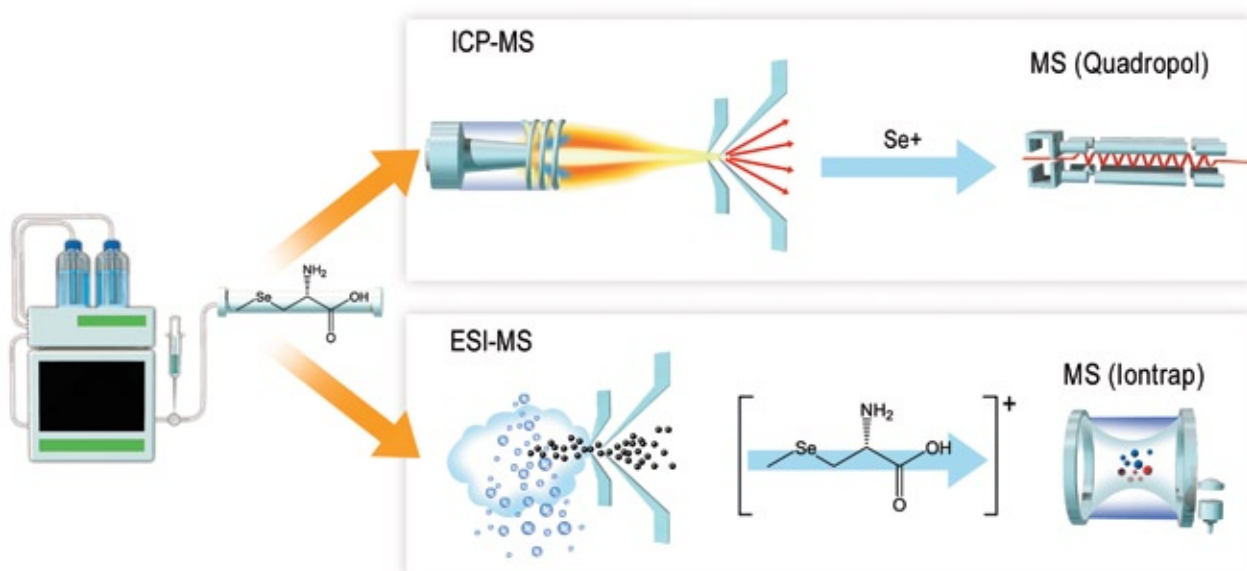
Selenoproteiner har antioxidative egenskaber, og selenocystein udgør en vigtig del af proteinernes funktionelle område. Antioxidative proteiner menes at have en generel beskyttende virkning mod kræft, fordi de reducerer mængden af reaktive iltforbindelser, der er kendt for at inducere kræft. Kliniske forsøg i mennesker har dog vist, at selen er mest effektivt til at modvirke kræft, når stoffet indtages i højere doser end nødvendigt, for at selenoproteinerne virker optimalt. Derfor er der muligvis også en anden kræftforebyggende virkningsmekanisme i spil.

Denne virkningsmekanisme er ukendt, men en teori, der er baseret på kræftmodeller i rotter, involverer en selenforbindelse kaldet methylselenol. Derfor er selenforbindelser, der kan metaboliseres til methylselenol, genstand for stor opmærksomhed indenfor forskningen i selens kræftforebyggende virkningsmekanismer.

AVANCERET MASSEPEKTROMETRI

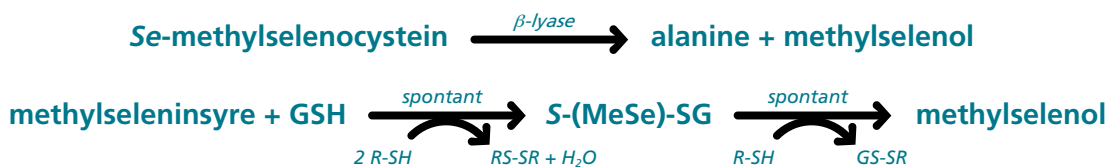
ICP-MS (Inductive Coupled Plasma Mass Spectrometry)

ICP-MS bruges til detektion af selenholdige forbindelser i en prøve og kvantificering af selenmængden. Prøven føres ind i et argonplasma med en temperatur på ca. 8000 grader. Herved splittes prøven til atomer, som ioniseres inden detektion i massespektrometret. Signalet er derfor uafhængigt af strukturen af molekylet, og giver heller ingen oplysninger derom.



ESI-MS (ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry)

ESI-MS benyttes til identifikation af de detekterede forbindelser. Ved ioniseringen tilføres eller fjernes en proton fra de neutrale molekyler. Herved dannes der molekulære ioner, hvis masse-ladningsforhold kan detekteres i massespektrometret. Da ionen har samme masse som den oprindelige forbindelse ± 1 , giver metoden oplysning om molekylets vægt. Ved efterfølgende eksperimenter, hvor molekylarionen slås i mindre stykker (tandem-massespektrometri), opnås oplysninger om molekylets struktur. Identifikation med ESI-MS kræver ofte, at forbindelserne oprenses og opkoncentreres fra prøven.



Dannelse af methylselenol i stofskiftet. Øverst: Den enzymatiske proces. Nederst: Den spontane reaktion.

Selenaminyren methylselenocystein, der bl.a. er fundet i hvidløg og broccoli dyrket under specielt selenrige forhold, omdannes til methylselenol i kroppens stofskifte ved hjælp af enzymet β -lyase. Desuden mener man, at methylselenol dannes spontant i kroppens celler via en reaktion mellem methylseleninsyre og tripeptidet glutathion (GSH), der findes i relativt stor mængde i cellerne.

Netop fordi methylselenol skulle dannes spontant i sidstnævnte reaktion, hvorimod dannelse af methylselenol ved spaltning af methylselenocystein kræver β -lyase-aktivitet, er methylseleninsyre meget anvendt som modelstof for methylselenocystein inden for forskning i selens kræftforebyggende virkningsmekanismer.

Modelstoffets metabolisme

Vi har undersøgt methylseleninsyres metabolisme i homogeniserede epitelceller fra svinetyndtarme, som er en laboratoriemodel for mave-tarmkanalen – det første sted selenforbindelser fra føden passerer på deres vej gennem kroppen.

Her fandt vi som beskrevet ovenfor, at methylseleninsyre reduceres ved reaktion med glutathion og danner en forbindelse med denne. Endvidere så vi, at methylseleninsyre også reduceres af cystein, der ligeledes findes i stor mængde i mave-tarmkanalen; ved denne reaktion dannes en tilsvarende forbindelse med cystein.

Vi detekterede ikke methylselenol i disse forsøg, hvilket ikke var overraskende, da forbindelsen sandsynligvis er svær at detektere, fordi stoffet er meget reaktivt og nok ikke kan isoleres, inden det har reageret med cellematricen.

Ud over modellen for mave-tarmkanalen har vi anvendt isolerede leverceller fra en rotte som en model for metabolisme i leveren. Stoffer, der absorberes fra mave-tarmkanalen føres via det såkaldte portåresystem direkte fra tarmen til leveren, inden de kommer ud i blodbanen og transporteres derpå videre med blodet til de væv, hvor stofferne udøver deres effekt.

I leveren foregår der en stor metabolisk aktivitet, og mange stoffer omdannes i leveren. Her fandt vi de samme to svovlselenforbindelser, der dannes spontant ved reaktion med glutathion og cystein i modellen for mave-tarmsystemet.

Vores forskningsresultater viser således med sikkerhed, at methylseleninsyre reduceres spontant ved reaktion med cystein og glutathion. Endvidere identificerede vi selenaminyren methylselenocystein som metabolit af methylseleninsyre i levercellerne.

Spørgsmålstegn ved egnetheden

Moderstoffet methylselenocystein, som methylseleninsyre anvendes som modelstof for, spaltes af β -lyase og metaboliseres således anderledes end modelstoffet. Hvis forskellige metaboliske reaktioner finder sted for moderstof og modelstof, kan forskellige cellulære mekanismer aktiveres. Kender man ikke denne forskel, kan virkningsmekanismer, der aktiveres ved modelstoffets metabolisme, fejlagtigt tillægges moderstoffets virkningsmekanisme.

Når isolerede celler behandles med methylseleninsyre, falder koncentrationen af glutathion som følge af den spontane reaktion. Denne tilstand signalerer oxidativt stress, og cellen reagerer ved at mobilisere hele sit forsvar mod oxidativt stress. Kræftforebyggende stoffers virkningsmekanisme tillægges ofte, at de er i stand til at aktivere cellens forsvar mod oxidativt stress, hvilket også er den oftest forslåede virkningsmekanisme i cellelinier behandlet med methylseleninsyre.

Det er ikke påvist, at moderstoffet methylselenocystein nedsætter cellernes koncentration af glutathion, og derfor er der sandsynligvis en anden virkningsmekanisme i spil her. Det er altså vigtigt, at få kortlagt metabolismen af både modelstof og moderstof for at man kan drage paralleller mellem stofernes virkningsmekanismer.

Vores resultater viser, at modelstoffet methylseleninsyre delvis omdannes til moderstoffet methylselenocystein. Dette sætter således spørgsmålstegn ved, om methylseleninsyre er et relevant modelstof for methylselenocystein, og om resultater fra de mange forsøg i cellelinier, hvor modelstoffet har været anvendt, med rimelighed kan overføres til moderstoffet.

Disse resultater har haft betydning for hvilke modelstoffer, vi vil bruge i vores fremtidige forskning i selenforbindelsers metabolisme i kræftceller.

*Ph.d. Charlotte Gabel-Jensen er postdoc på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.
Ph.d. Bente Gammelgaard er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi.*

Lægemidlers effekt på **fedt-** **nedbrydning** kan måles i rotter



Potentielle lægemidler mod fedme påvirker typisk sultcenteret i hjernen og nedsætter appetitten. En anden nyttig effekt vil være, hvis stofferne direkte øger nedbrydningen af allerede oplagret fedt. Mikrodialyse kan måle, hvad der sker i fedtvævet, under dyreforsøg med sådanne lægemiddeld kandidater.

Af Signe Mølhøj, Kjell Malmöf, Thue Johansen og Harald S. Hansen

Forekomsten af fedme er støt stigende og har længe været et problem i den vestlige verden. I de senere år er overvægt og fedme i højere og højere grad blevet et globalt fænomen, og man taler nu om en decideret fedmeepidemi.

Når antallet af fede mennesker stiger i befolkningen, øges risikoen for udvikling af en række alvorlige sygdomme som type 2-diabetes, hjerte-karsygdomme og åreforkalkning. Behandling af fedme er således ikke udelukkende af kosmetisk interesse, men frem for alt af stor sundhedsmæssig betyd-

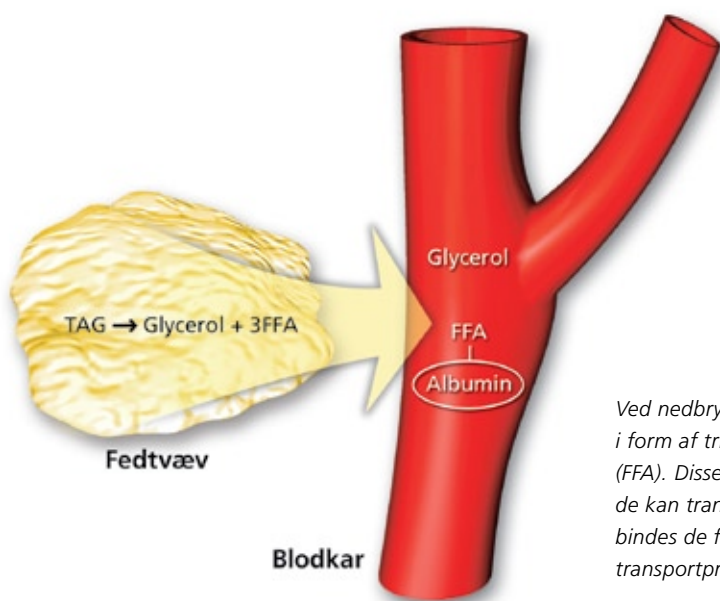
ning. De vigtigste årsager til fedmeepidemien er et stadig større indtag af energirig mad samt fysisk inaktivitet i form af manglende motion og stillesiddende arbejde.

Helt fundamentalt kan man sige, at mennesker bliver fede, når energiindtaget gennem længere tid overstiger energiforbruget. Således vil et overskydende energiindtag på blot 250 kJ om dagen – svarende til 10 gram chokolade – føre til en vægtforøgelse på omtrent 30 kg i løbet af ti år. Der behøver altså kun at være et ganske lille overskud på energibalancen for at give anledning til fedme på sigt.

Kostændringer, som reducerer energiindtaget, og motion, der øger energiforbruget, kan føre til vægttab, men i tilfælde af svær overvægt og fedme er disse enkle midler sjældent tilstrækkelige. Derfor er der et udtalt behov for en effektiv medicinsk behandling.

Biokemien bag fedtoplagring

Fedt oplagres i kroppens fedtdepoter i form af triacylglycerol, som består af et glycerolmolekyle, hvortil der ved hjælp



Ved nedbrydning af fedt – lipolyse – spaltes oplagret fedt i form af triacylglycerol (TAG) til glycerol og frie fedtsyrer (FFA). Disse metabolitter frigives til blodbanen, hvorfra de kan transporteres til andre væv og forbruges. I blodet bindes de frie fedtsyrer til albumin, der fungerer som transportprotein.

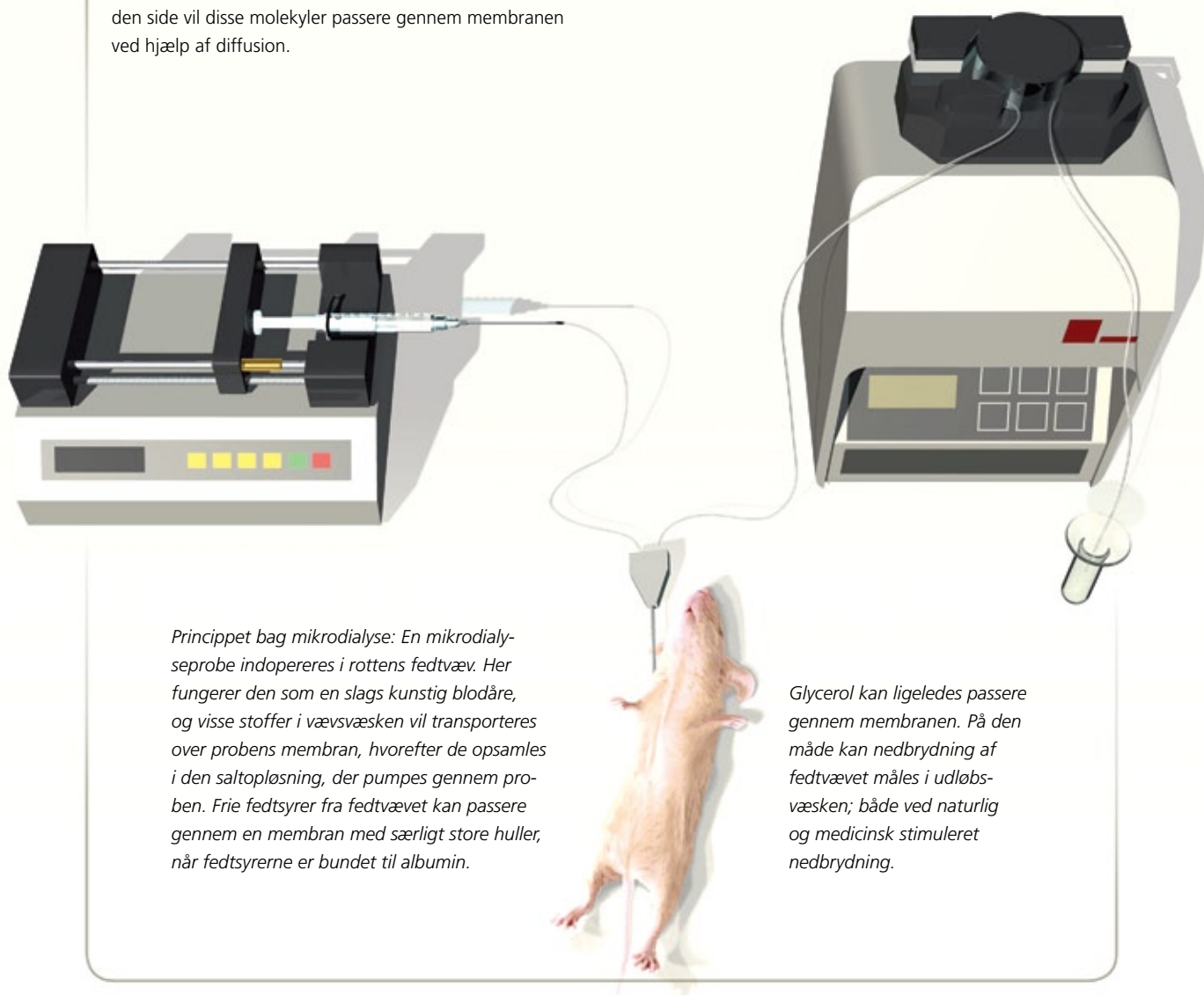
MIKRODIALYSE – DYNAMISKE UNDERSØGELSER I LEVENDE VÆV

Mikrodialyse er en teknik, som muliggør opsamling af ekstracellulærvæske i det levende væv. Siden metoden blev beskrevet første gang i 1974, har den fundet stigende anvendelse inden for metaboliske studier i væv hos både dyr og mennesker, fordi mikrodialyse giver en unik mulighed for at undersøge cellernes metabolisme i deres aktuelle miljø.

Princippet i metoden er, at en mikrodialyseprobe indopereres i det væv, man ønsker at undersøge. Proben indeholder en dialysemembran, som er forbundet med henholdsvis en indløbslange og en udløbsslange, hvorigennem der pumpes en fysiologisk saltopløsning ved meget lav hastighed; typisk 0,3-5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Membranen er permeabel overfor vandopløselige molekyler op til en given molekylvægt, og under tilstedeværelse af en koncentrationsgradient mellem ekstracellulærvæsken på den ene side af dialysemembranen og saltopløsningen på den anden side vil disse molekyler passere gennem membranen ved hjælp af diffusion.

Når proben er indopereret, diffunderer vandopløselige metabolitter, som er til stede i ekstracellulærvæsken, gennem membranen og ind i saltopløsningen, hvorfra de opsamles via udløbsslangen. Herefter kan koncentrationen af metabolitterne måles. Opsamlingen kan foretages kontinuerligt gennem timer eller dage, og på den måde kan målingerne give et dynamisk billede af metabolismen i det undersøgte væv.

Frie fedtsyrer er ikke vandopløselige, og de kan derfor ikke opsamles ved almindelig mikrodialyse. Vi har imidlertid udviklet en metode, som gør opsamling mulig. I blodet danner frie fedtsyrer komplekser med proteinet albumin, hvorved fedtsyrerne kan transporteres rundt i blodbanen. Albumin-associerede frie fedtsyrer i fedtvævet kan opfanges ved anvendelse af dialysemembraner med særligt store huller.



Princippet bag mikrodialyse: En mikrodialyseprobe indopereres i rottens fedtvæv. Her fungerer den som en slags kunstig blodåre, og visse stoffer i væbsvæsken vil transporteres over probens membran, hvorefter de opsamles i den saltopløsning, der pumpes gennem proben. Frie fedtsyrer fra fedtvævet kan passere gennem en membran med særligt store huller, når fedtsyrerne er bundet til albumin.

Glycerol kan ligeledes passere gennem membranen. På den måde kan nedbrydning af fedtvævet måles i udløbssvæsken; både ved naturlig og medicinsk stimuleret nedbrydning.

af esterbindinger er bundet tre fedtsyrer. Ved nedbrydning af fedt – lipolyse – spaltes bindingerne, og metabolitterne glycerol og frie fedtsyrer frigives. Processen er regulerbar, og visse stoffer og hormoner har en lipolytisk virkning, fordi de fremmer spaltningen af triacylglycerol med en fedtreducerende effekt til følge.

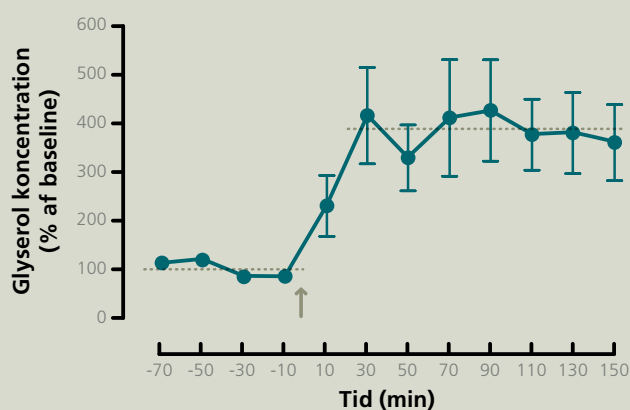
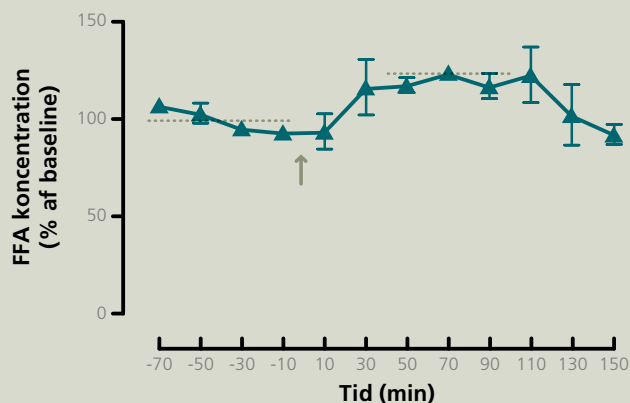
Glycerol og frie fedtsyrer frigøres til blodbanen, og koncentrationen af disse stoffer i blodplasmaet bruges ofte som en indikation for lipolytisk aktivitet. Dette mål er imidlertid kun indirekte, fordi frigjorte fedtsyrer dels kan genoptages i fedtvævet og dels kan optages og forbruges i andre væv – fortrinsvis muskler og lever. Glycerol kan ligeledes optages i andre væv eller alternativt udskilles med urinen. En mere direkte metode til måling af metabolitterne i selve fedtvævet vil derfor give et mere nøjagtigt billede af den lipolytiske proces.

Lipolysestudier i fede rotter

I vores forskning anvender vi mikrodialyse som metode til at studere fedtstofskiftet i opfedede rotter (DIO-rotter – Diet-Induced Obese). Rotterne er genetisk normale, og de er blevet fodret med et særligt fedtholdigt foder for at opnå en fedmetilstand, som mest muligt efterligner den, der typisk ses hos overvægtige mennesker.

Under bedøvelse kan mikrodialyseprober indopereres i fedtvævet på rotterne, og efterfølgende kan koncentrationen af glycerol og frie fedtsyrer måles i det opsamlede dialysat. Målingerne gennemføres, mens rotten er bedøvet. Gennem målingerne opnår vi direkte information om den aktuelle lipolytiske aktivitet i fedtvævet. Ved samtidig at behandle rotten med et teststof kan en eventuel stimulerende effekt på lipolysen måles i form af en direkte stigning i metabolitniveauet. På den måde kan vi afklare, om stoffet direkte påvirker den lipolytiske proces og medfører en øget nedbrydning af det oplagrede fedt.

Håbet med forskningen er på sigt at finde en lægemiddelkandidat mod fedme, som har en bedre effekt end de eksisterende præparater, som kun giver moderate vægttab eller er forbundet med uønskede bivirkninger. Metoden er endvidere et værdifuldt redskab til bedre at kunne forstå det komplicerede samspil, som den lipolytiske proces indgår i, og de faktorer der påvirker processen. Denne grundforskning er et bidrag til den samlede forståelse af fedmens biologi.



Graferne viser koncentrationen af henholdsvis frie fedtsyrer (FFA) og glycerol målt ved hjælp af mikrodialyse i rotters fedtvæv. Pilen angiver indgift af et stof der øger lipolysen. * $P < 0.05$.



Cand.pharm. Signe Mølhøj er ph.d-studerende på Novo Nordisk AIS og Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Dr.scient. Kjell Malmlof er professor på Fakultet for Veterinær Medicin på Uppsala Universitet i Sverige.

MD ph.d. Thue Johansen er forsker på Novo Nordisk AIS.

Dr.scient. Harald S. Hansen er professor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.

Lægemiddelforskning

udgives af Det Farmaceutiske Fakultet, Københavns Universitet

Redaktion

Jesper Munck, Rolf Haugaard og Mette Rasmussen (ansvarshavende)

Billedredaktion

Jesper Munck og Jens Raadal

Fotos

Mikal Schlosser (4),
Anne Adersen (7, 9),
Scanpix (14, 41),
Jesper Munck (18, 27, 37, 38, 47),
United States Department of Health and Human Services (35),
Stock.xchng (42, 43, 46, 48, 55)

Grafik/illustrationer

Figur baseret på Feher and Schmidt J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2003, 43, 218-227 (5),
Jens Raadal (10, 12, 17, 19, 23, 28, 44, 45),
Henning Dalhoff (14, 15, 16, 20, 24, 46, 50, 52, 53, 55, 56),
Raadal/Søren Skovstrup Hansen (25),
Kasper Harpsøe (29),
Flemming Steen Jørgensen (32),
Figur baseret på H. Lundbeck A/S: "To the heart of ECG: a pocket guide for psychiatrists" (33),
Stock Expert (40),
Michael Timm (43),
Anna Buus Frost (48)

Grafisk design og produktion

Jens Raadal

Tryk

Eks-skolens Trykkeri

ISSN 0905-0051



Det Farmaceutiske Fakultet

Københavns Universitet

Universitetsparken 2

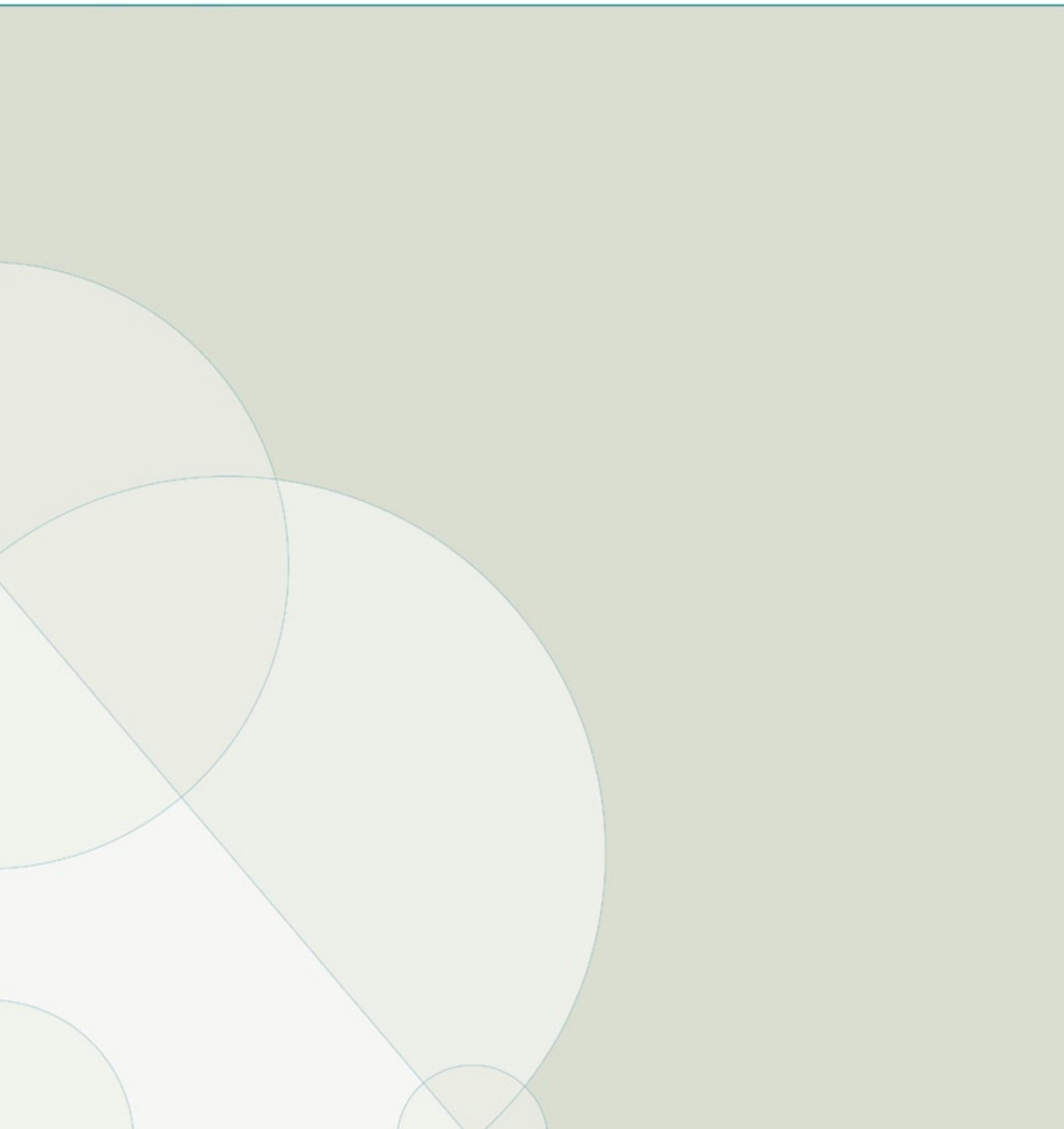
2100 København Ø

Tlf · 35 33 60 00

Fax · 35 33 60 01

E-mail · farma@farma.ku.dk

Internet · www.farma.ku.dk

The lower half of the page features a large, solid teal background. On the left side, there is an abstract graphic consisting of several overlapping circles in various shades of beige, cream, and light teal. The circles are of different sizes and are partially cut off by the left edge of the page, creating a layered, organic effect.