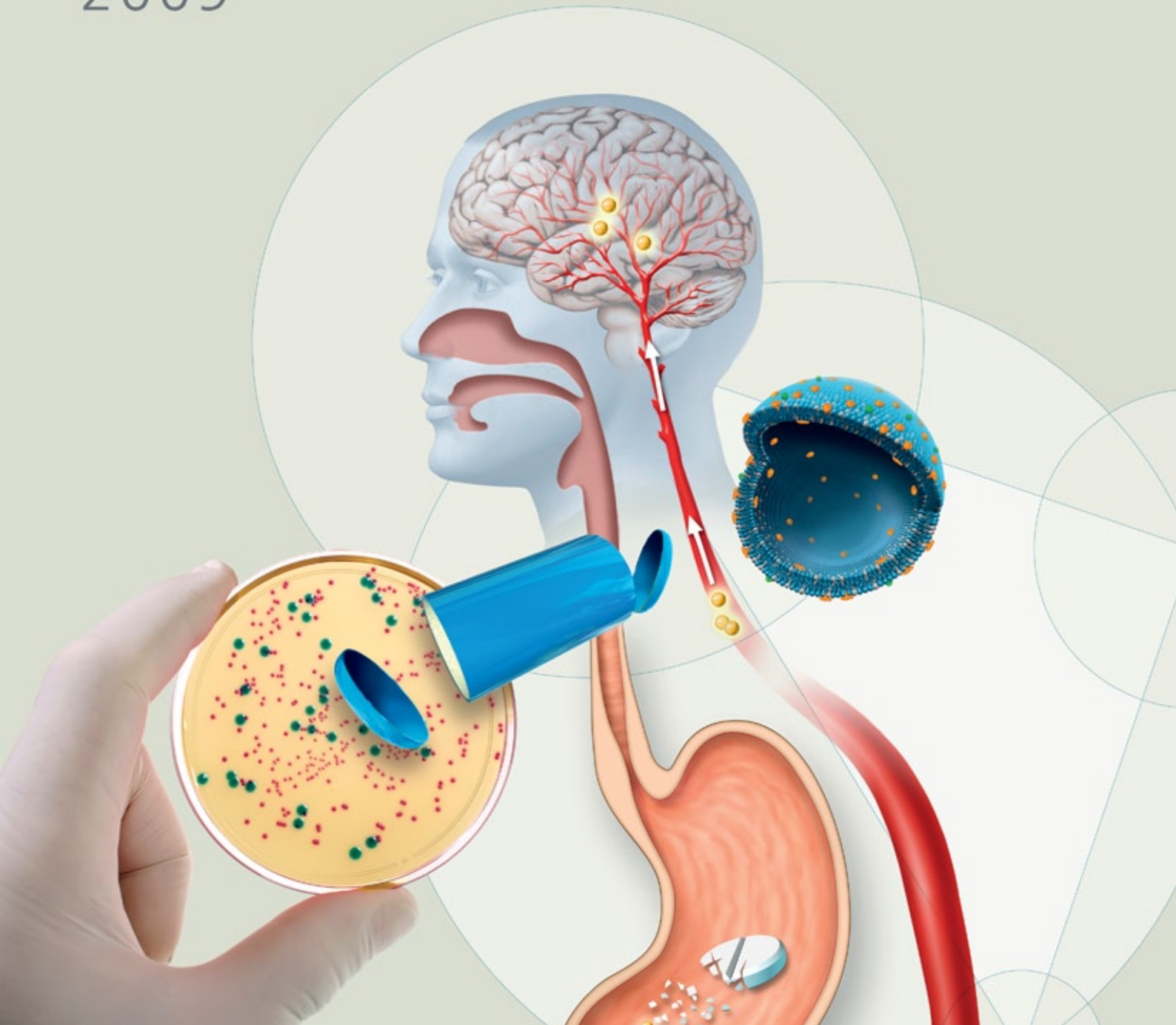




Lægemiddelforskning

2009

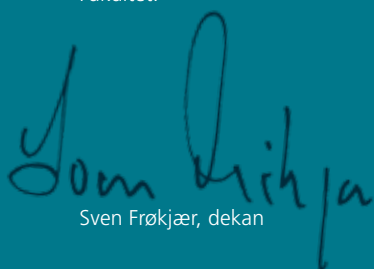


Lægemedelforskning er et vigtig forskningsområde. Det rummer potentialer for at redde liv og forbedre livskvaliteten ved at helbrede eller lindre sygdomme. Desuden er den farmaceutiske og bioteknologiske industri samfundsøkonomisk yderst vigtig. Universiteternes grundforskning inden for naturvidenskab, teknisk videnskab og sundhedsvidenskab komplementerer i mange tilfælde industriens mere målrettede forskning med udvikling af nye lægemidler.

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 Lægemedelforskning illustrerer nogle af vigtige udfordringer, der ligger inden for lægemiddelområdet og samtidig giver en bredere kreds af læsere et indblik i nogle af de spændende forskningsprojekter, der udspringer fra 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

Studiepraktik

I 2009 kom Det Farmaceutiske Fakultet med i den landsdækkende ordning for studiepraktik i uge 44 for gymnasieelever. I løbet af praktikopholdet, der strækker sig over tre dage, vil eleverne opleve 'livet' som farmaceutstuderende. Eleverne vil blive præsenteret for flere faglige områder og derigennem erfare bredden i farmaceutuddannelsen. De vil komme med til forelæsninger, klassetimer og laboratorieøvelser sammen med fakultetets studerende og deltage i timer skræddersyet til praktikanterne. Der skulle således være optimale muligheder for både at få et indtryk af livet som universitetsstuderende – og få fagligt indhold med hjem i bagagen. Nærmere oplysninger om studiepraktik og tilmelding fås på www.farma.ku.dk/studiepraktik og på studiepraktik.nu

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

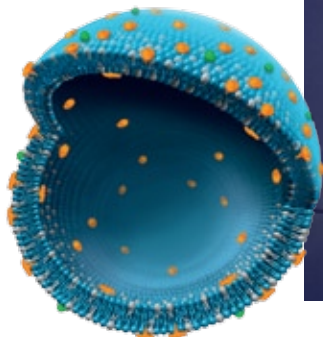
På www.farma.ku.dk optræder – i forbindelse med Det Farmaceutiske Fakultet's tre institutter – en gennemgang af Fakultetets forskningsområder.

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

Ønskes yderligere trykte eksemplarer af Lægemedelforskning?

Send din bestilling til bestil@farma.ku.dk

Indhold



1 Tabletter med "løse ender" giver forsinket afgift af lægemiddelstof 4-6

Af Kaisa Naelapää, Anette Müllertz, Jette Jacobsen, Janne Rømsing og Daniel Bar-Shalom

2 Computeren er medicinalkemikerens arbejdshest 7-9

Af Simon Birksø Larsen, Lars Olsen og Flemming Steen Jørgensen

3 Skræddersyede proteiner – uden naturens begrænsninger 10-12

Af Kristian Strømgaard, Mette S. Jensen og Anders S. Kristensen

4 Kombination af konserveringsmidler i cremer nedsætter risikoen for allergi 13-15

Af Michael Dyrsgaard Lundov og Lise Moesby

5 Ekstra sulten af den fede mad 16-18

Af Thi Ai Diep, Andreas Artmann, Niels W. Andersen, Steen Honoré Hansen og Harald S. Hansen

6 Innovativt nanopartikeldesign bag skræddersyede vacciner 19-21

Af Pernille Nordly, Else Marie Agger, Hanne Mørck Nielsen og Camilla Foged

7 Gaboxadol bliver absorberet via en aminosyretransportør 22-24

Af Mie Larsen, Rene Holm, Klaus Gjernig Jensen, Birger Brodin og Carsten Uhd Nielsen

8 Nye analysemetoder viser lægemidlers fordeling i blodet 25-27

Af Charlotte Møller, Bente Gammelgaard, Helle Rüsç Hansen og Stefan Stürup

9 Elektrokemi til karakterisering og kvantitativ analyse af lægemiddelstoffer 28-30

Af Henrik Jensen, Maria A. Deryabina, Steen Honoré Hansen og Jesper Østergaard

10 GABAA-receptoren: Bedre modeller – bedre lægemidler 31-33

Af Bente Frølund, Tommy Sander, Henriette Hansen og Thomas Balle

11 Ind i hjernen med nye stoffer 34-36

Af Rasmus Prætorius Clausen, Simon Dalsgaard Nielsen, Jesper Kristensen og Kasper Bø Hansen

12 Peptider som vaccine mod sclerose 37-39

Af Rebekka Dam-Tuxen og Erik Riise

13 Helping Hand – patientens forlængede arm 40-42

Af Arne Christensen og Ebba Holme Hansen

14 At være eller ikke være en antagonist 43-45

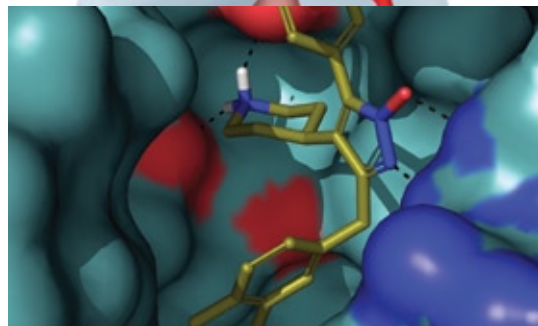
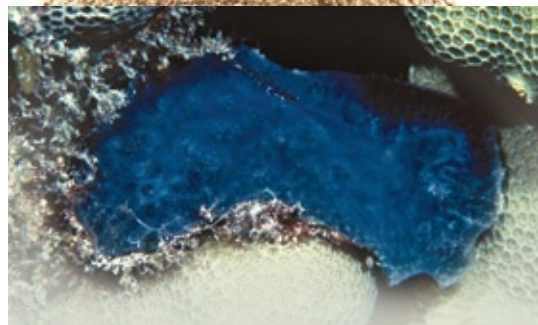
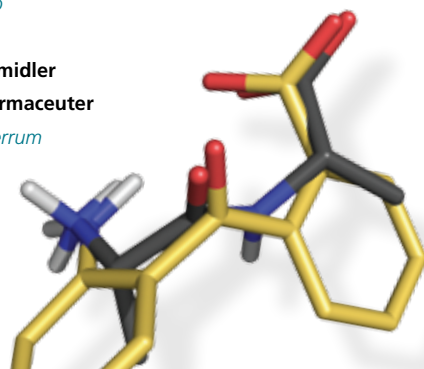
Af Karla Frydenvang, Peter Naur, Michael Gajhede og Jette Sandholm Kastrup

15 ¹¹C-mærkede lægemiddelstoffer til scanning af hjernen 46-48

Af Jesper Christensen og Mikael Begtrup

16 Bivirkningsmonitorering af lægemidler – en ny udfordring for apoteksfarmaceuter 49-51

Af Søren Troels Christensen og Ole J. Bjerrum



Tabletter med løse ender



Det er svært at producere en tablet, som frigiver lægemiddelstoffet mange timer efter indtagelse; fx en tablet som kan indtages før sengetid, men som først skal virke næste morgen. Overtrukne tabletter med defekter, som får overtrækkets endeplader til at falde af, kan blive en lovende og billig løsning.

Af Kaisa Naelapää, Anette Müllertz, Jette Jacobsen, Janne Rømsing og Daniel Bar-Shalom

Stort set alle patienter foretrækker at indtage medicin gennem munden, fx i form af tabletter. Oral administration af lægemidler stiller imidlertid store krav til formuleringen, især hvis man vil sikre, at lægemiddelstoffet først frigives på et på forhånd bestemt tidspunkt længe efter indtagelsen. Nye metoder kan imidlertid bane vej for billige og meget sofistikerede doseringsformer.

Hvorfor oral administration?

At opretholde livet kræver energi og dermed indtagelse af føde. Hos mennesker er mave-tarm-kanalen så at sige den "legale" vej til at indføre fremmede stoffer i kroppen. Her

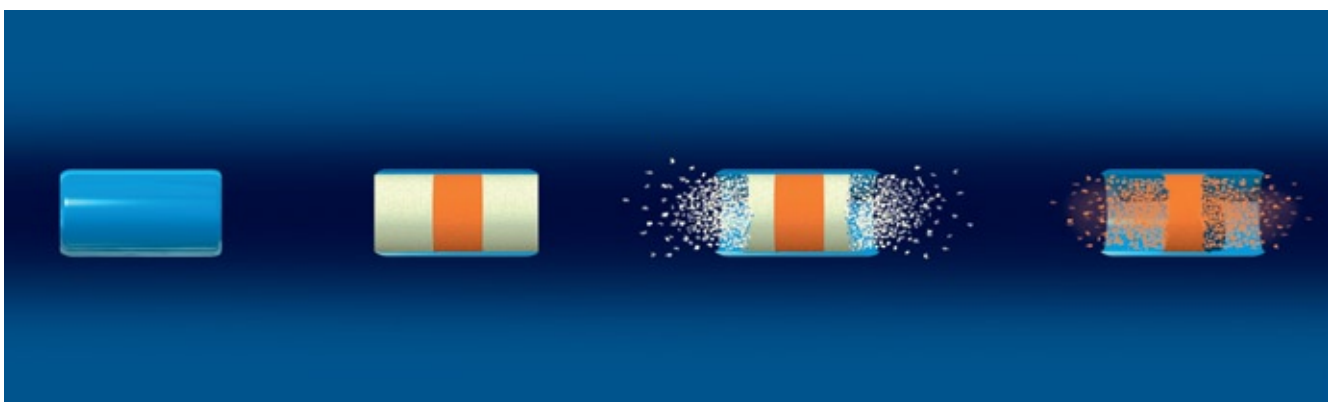
fordøjes føden, og den nedbrydes til små byggesten, som kan optages over tarmvæggen. På den måde undgås uønskede fysiologiske effekter, som kan blive fremkaldt ved fx at optage hele proteiner.

Hvilke stoffer optages gennem tarmen?

På vejen gennem maven og tarmene bearbejdes føden mekanisk, kemisk og enzymatisk for at nedbryde store og komplekse molekyler til deres byggesten: sukkerstoffer, fedtstoffer og aminosyrer. Lægemiddelstoffer, der indgives via munden, får samme behandling i mave-tarm-kanalen, og stofferne kan derfor blive ændret eller nedbrudt. For at kunne passere tarmvæggen og komme ud i blodet må et lægemiddelstof ligne de "accepterede" molekyler fra føden.

Kontrolleret frigivelse af lægemiddelstoffer

Efter indtagelse af konventionelle tabletter frigives lægemiddelstoffet hurtigt i tarmvæsken, optages over tarmvæggen og fordeles hurtigt i kroppen. Derfor kan hyppig indtagelse, fx hver fjerde time, være nødvendig. Ofte vil det imidlertid give en bedre behandling, hvis tabletten – alt efter det konkrete behov – sikrer:



Forsinket frigivelse af lægemiddelstof kan opnås med multilagstabletter, hvor lægemiddelstoffet er koncentreret i det midterste lag. Tablettens krumme overflade er dækket med et overtræk, så erosionen sker fra enderne. Derved frigives lægemiddelstoffet (det orange lag) først, når de ydre lag er eroderet bort. De nuværende metoder til at opnå denne form for forsinket frigivelse er dog meget kostbare.

giver forsinket frigivelse af lægemiddelstof

- at lægemiddelstoffet frigives langsomt fra et depot for at opnå en forlænget og konstant virkning
- eller at lægemiddelstoffet først frigives et stykke tid efter indtagelsen på et bestemt, ønsket tidspunkt, fx om morgenen, før patienten vågner

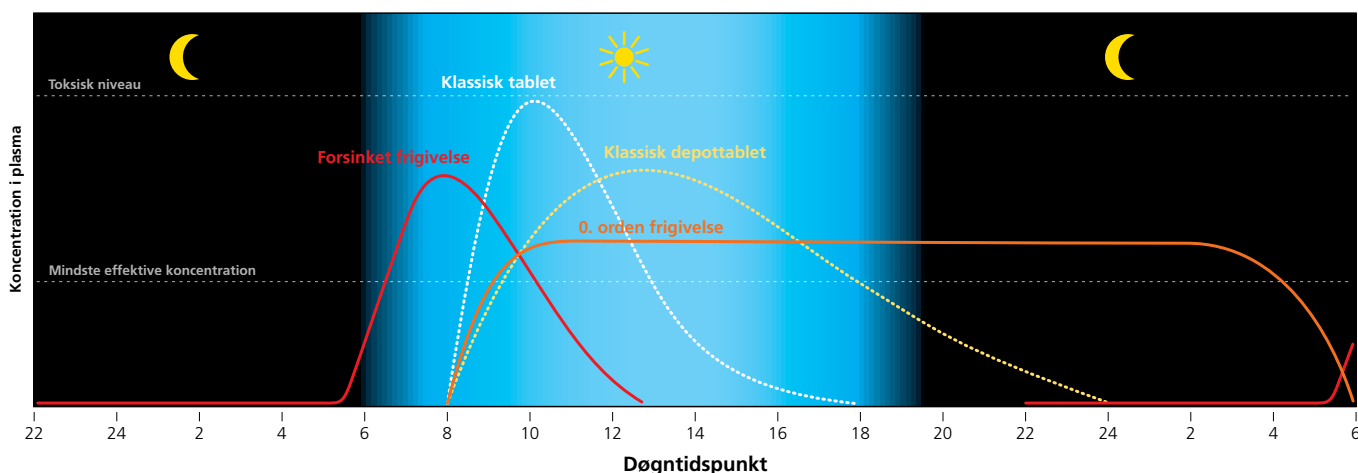
Diffusion og erosion

De første depottabletter var baseret på diffusion efter samme princip som i en tepose. Når teposen sænkes ned i varmt vand, trænger vandet ind i tebladene og opløser de opløselige komponenter, som så siver langsomt ud gennem teposen. På denne måde opnås afgivelse af lægemiddelstof gennem længere tid i koncentrationer, der ligger over den effektive minimumskoncentration. Samtidig formindskes risikoen for, at alt lægemiddelstoffet frigives så hurtigt, at det toksiske niveau overskrides. Sådanne depottabletter er velegnede, hvis lægemiddelstoffet er vandopløseligt, og når målet er forlænget frigivelse.

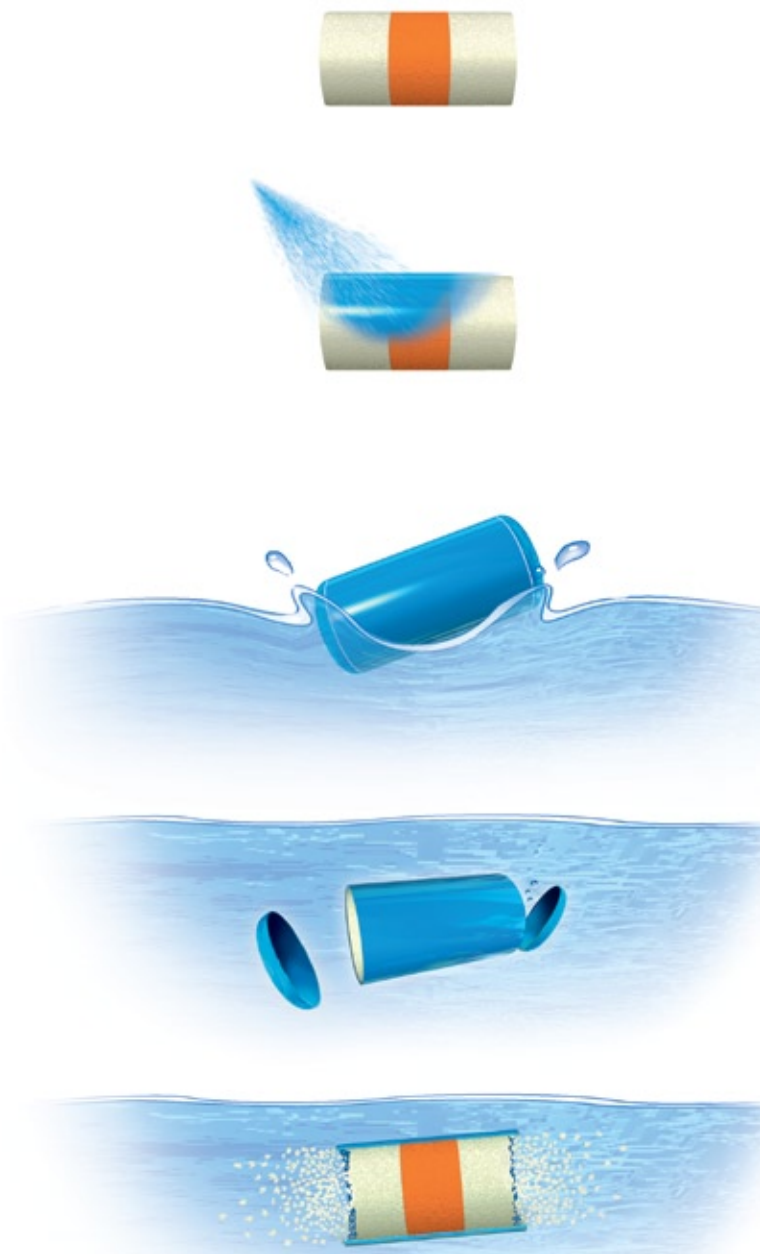
Senere blev det muligt at kontrollere frigivelsen af lægemiddelstof fra depottabletter ved hjælp af erosion. Metoden minder om at pille løg. Hver gang et nyt lag fjernes, frigives indholdet af lægemiddelstof herfra.

I dag er depotlægemidler af denne type ofte baseret på nedbrydelige, vandopløselige polymerer, som eroderer i vandige væsker som tarmvæsken. Hvis man fremstiller en rund og flad tablet af en sådan polymer, vil hele tablettens overfladeareal blive reduceret i takt med, at tabletten eroderes. Hvis erosionshastigheden er konstant, medfører dette, at mængden af frigivet lægemiddelstof falder gradvist, fordi arealet formindskes. Den nye metode sikrer konstant frigivelse af lægemiddelstoffet, fordi polymeren er indbygget i et cylindrisk rør, som kun er åbent i enderne. Polymeren bliver udsat for erosion fra et konstant areal i begge ender, og frigivelsen af lægemiddelstof vil være konstant, indtil polymeren er eroderet helt væk (se ill. side 4).

Optimal behandling af en række sygdomme kræver, at lægemidlet virker inden opvågning om morgenen, så patienten kan vågne op uden symptomer. Det gælder fx for astma, leddegigt, hjerte-kar-sygdomme og Addisons sygdom. Frigivelsen skal være i form af en puls, d.v.s. forsinket frigivelse, frem for konstant frigivelse natten over (se nedenstående ill.). Forsinket frigivelse af lægemiddelstoffet kan opnås, hvis stoffet er koncentreret midt i røret, mens de lag, der vender ud imod enderne, ikke indeholder medicin. Polymeren eroderes



Kurverne illustrerer koncentration af lægemiddelstof i blodet efter oral indgift af en konventionel, "klassisk" tablet, en "klassisk" depottablet og doseringsformer baseret på den ny teknologi, 0. orden frigivelse og forsinket frigivelse.



Et bevidst defekt overtræk på tabletter kan blive en billig løsning til at opnå forsinket frigivelse af lægemiddelstof. Ved kontakt med vand falder overtrækets endeplader af, så tabletten eroderes fra enderne. Denne teknik byder på muligheder for udvikling af meget sofistikerede doseringsformer.

som før, men intet lægemiddelstof frigives, før midtersektionen eksponeres. Når det sker, frigives lægemiddelstoffet enten over tid eller på en gang afhængig af formuleringen. Hvis man indtager tabletten om aftenen inden sengetid, kan frigivelsen af lægemiddelstof programmeres til at starte umiddelbart før patienten vågner om morgenen.

Forsinket frigivelse af lægemiddelstof

I forskningsgruppen har vi udviklet en lovende metode, hvor polymeren overtrækkes med et bevidst ufuldstændigt overtræk. Et "godt" overtræk omslutter hele tablettens overflade, men vi har udviklet et overtræk, hvor endepladerne falder af inden for få sekunder, når tabletten kommer i kontakt med vand.

Vi har bevidst eksperimenteret med fejl under fremstillingen af tabletterne. Mulighederne er talrige. Overtrækket bliver ikke fuldstændigt, hvis tabletten er "forkert" designet, fx når kanterne er for skarpe. Andre fejl – fx tilførsel af for meget eller for lidt af en given komponent eller anvendelse af forkerte procesparametre – kan føre til, at overtrækket bliver for porøst i visse områder, eller at den bliver uforlignelig med polymeren i tablettens indre.

Vi har nu fundet den rette kombinationer af fejl, som gør det muligt at fremstille tabletter, hvor overtrækket er perfekt – bortset fra enderne af røret, hvor overtrækket ikke hænger sammen med de to flade skiver, som udgør endepladerne. Når tabletten kommer i forbindelse med vand, falder endepladerne af, så polymeren eroderes fra begge ender – og kun derfra – hvorved forsinket og programmeret frigivelse af lægemiddelstof kan opnås, når stoffet er koncentreret midt i røret. Metoden er billig, og den vil sandsynligvis kunne bruges til at tilvirke tabletter, der frigiver lægemiddelstoffet konstant over tid, samt udvikle en række meget avancerede doseringsformer, der kan frigive lægemiddelstoffet på det tidspunkt eller på det sted i tarmen, som er mest hensigtsmæssigt for at opnå en optimal behandling.



*Ph.d. Kaisa Naelapää er adjunkt på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Anette Müllertz er lektor og leder af Bioneer:FARMA på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Jette Jacobsen er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Janne Rømsing er lektor og institutleder på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Daniel Bar-Shalom er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi*

Computeren

er medicinal- kemikerens arbejdshest



Jagten på nye lægemiddelstoffer sker blandt et svimlende antal molekyler, som gør det umuligt manuelt at udvælge de stoffer, som det er værd at undersøge i laboratoriet. Men computeren finder nålen i høstakken. I et aktuelt projekt har vi opdaget nye, biologisk aktive molekyler med evne til at trænge gennem tarmvæggen og ud i blodet.

*Af Simon Birksø Larsen, Lars Olsen og
Flemming Steen Jørgensen*

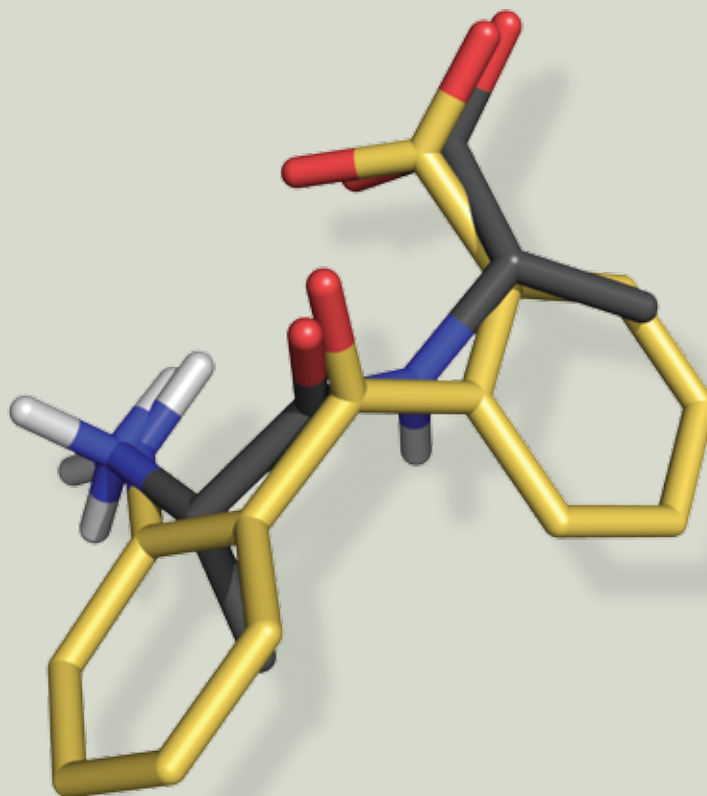
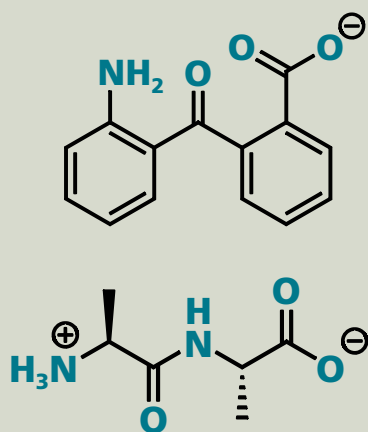
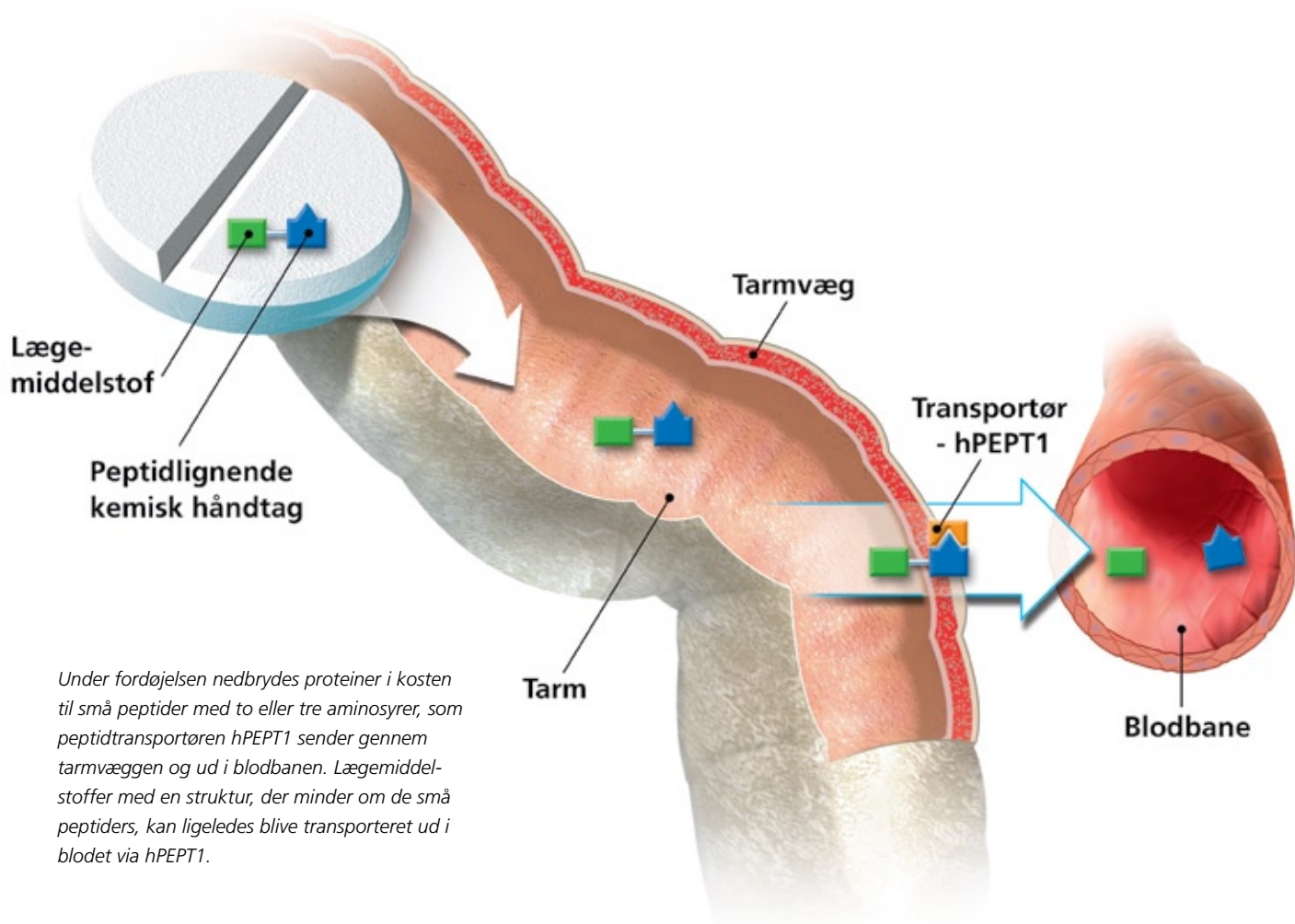
Det anslås, at 10^{60} kemiske stoffer har et muligt potentiale som nye lægemidler, og dette gigantiske antal er større end den formodede mængde atomer i universet! Derfor er det klart, at kun en ganske lille del af alle disse mulige molekyler nogensinde vil blive forsøgt fremstillet i laboratoriet eller opdaget i naturen. Men selvom molekylerne ikke findes i virkeligheden, kan de sagtens eksistere i en computer i form af et virtuelt bibliotek af kemiske stoffer.

Det smarte er, at computeren kan beregne mange af molekylernes egenskaber, og det giver mulighed for at udvælge de mest interessante lægemiddelstoffer, som herefter kan fremstilles i laboratoriet og bruges til forsøg. Ofte er det oplagt at lade de virtuelle molekyler på computeren bestå af

kemiske forbindelser, som hurtigt kan anskaffes fra en kemikalieforhandler. På den måde sparer man tid i laboratoriet, og udvalget af molekyler, der kan købes, er ganske stort – mere end et par millioner.

I et aktuelt forskningsprojekt har vi udnyttet computeren til at opdage nye molekyler, der binder til en peptidtransportør i tarmvæggen, som kaldes hPEPT1. Når proteiner fra føden nedbrydes til små peptider med to eller tre aminosyrer, transporterer hPEPT1 peptiderne over tarmvæggen og ud i blodbanen. Hvis hPEPT1 kommer i kontakt med andre molekyler, som ligner de små peptider, vil transportøren også forsøge at fragte dem ud i blodet – et eksempel er penicilliner, som krydser tarmvæggen på denne måde. Med andre ord: Hvis nye lægemiddelstoffer designes til at ligne små peptider, som genkendes af transportøren, kan man sikre deres optagelse i organismen.

Men hvordan kan computeren udvælge de 10 eller 100 lovende molekyler, som skal undersøges nærmere, blandt millioner af kemiske stoffer i et virtuelt bibliotek? Det kan computeren, hvis vi opstiller matematiske modeller for, hvornår kemiske stoffer har en relevant biologisk aktivitet. Ved hjælp af sådanne computermodeller har vi fundet fire nye forbindelser, som genkendes og transporteres af peptidtransportøren.



Ved computermodellering har vi opdaget fire nye forbindelser, som transporteres gennem tarmvæggen af hPEPT1-transportøren. Formlen på et af stofferne er vist øverst, mens 3D-strukturen ses på den store tegning. Molekylet ligner til en vis grad dipeptidet Ala-Ala, som er vist nederst. Fx findes carboxylsyre- og amin-grupperne samme sted. Det er lighederne, som gør, at transportøren genkender det nye molekyle.



COMPUTERMODELLER OG VIRTUEL SCREENING

Inden for medicinalkemien er struktur-aktivitetsrelationer (SAR) et vigtigt koncept. Relationen mellem struktur og aktivitet beskriver nemlig, hvordan et molekyles biologiske aktivitet afhænger af dets kemiske sammensætning og dets tredimensionelle form. Hvis man fx har et molekyle, der virker mod forhøjet blodtryk, men kun i beskeden grad, kan man forbedre effekten ved at ændre på molekylet. Man kan eksempelvis prøve at indsætte en methyl-gruppe et sted i molekylet. Tester man nu det nye molekyle på en rotte, vil man ofte se, at det er blevet mindre eller mere biologisk aktivt.

Biologisk aktivitet opstår normalt ved, at molekylet binder til bestemte proteiner i kroppen. Molekylet skal så at sige passe ind i proteinet, som en nøgle der glider ind i en lås. Ved at ændre på molekylets struktur finjusterer man således nøglen.

Efterhånden ender man med en forståelse af struktur-aktivitetsrelationen for den pågældende biologiske aktivitet. I første omgang beskriver man ofte relationen med ord – for eksempel "en methyl-gruppe i position 6 gør molekylet mere aktivt" – men relationen kan også beskrives

matematisk. Dette kaldes kvantitativ SAR med den engelske forkortelse QSAR.

I QSAR opstiller man en ligning for den biologiske aktivitet. I ligningen indsættes en beskrivelse af et molekyle i form af såkaldte deskriptorer. Der findes mange deskriptorer; fx molekylvægt, antal ringsystemer, antal syregrupper, antal kulstofatomer og fedtopløselighed. Ligningen estimerer så den biologiske aktivitet. Ved at se på med hvilken vægt de forskellige deskriptorer indgår i QSAR-ligningen, kan man rationelt forudsige, hvordan et molekyle skal modificeres for at opnå den ønskede virkning. Når medicinalkemikeren har opstillet en computermodel, dvs. en QSAR-ligning, som korrekt beskriver struktur-aktivitetsrelationen for den biologiske aktivitet, kan computeren sættes i gang med at lede efter nye, endnu ikke testede molekyler i en stor database af virtuelle molekyler. Denne fase kaldes virtual screening. For hvert molekyle beregner computeren et estimat for den biologiske aktivitet, og medicinalkemikeren får besked, når programmet identificerer lovende molekyler med stor sandsynlighed for god biologisk aktivitet. Resultatet af en virtuel screening er en prioriteret liste over de mest interessante molekyler. Selvom en virtuel screening involverer flere hundrede tusinde molekyler, er tidsforbruget begrænset, og screeningen kan ofte udføres i løbet af nogle minutter eller på få timer.

Nye molekyler til peptidtransportøren

De fleste lægemidler indtages gennem munden, fx som tabletter. I mavesækken og tyndtarmen opløses tabletten, og de aktive molekyler kan optages i blodet efter passage gennem tarmvæggen. Denne proces kan ikke tages for givet, og mange lovende molekyler med en ønsket biologisk virkning må opgives som lægemiddelstoffer alene af den grund, at de ikke optages i kroppen og derfor aldrig kan blive til lægemidler.

De fleste af nutidens lægemiddelstoffer trænger ved egen hjælp over cellemembranen i tarmvæggenes celler. Men der er også en anden mulighed: At blive fragtet ud i blodet af transportproteiner som peptidtransportøren hPEPT1. Hvis hPEPT1 kommer i kontakt med molekyler, som ligner små peptider, vil transporteren også forsøge at fragte dem over cellemembranen. Dette kan fx opnås ved at designe en del af lægemiddelmolekylet som et "håndtag", der genkendes af transportøren, som så kan gribe fat i håndtaget og transportere molekylet ind i kroppen.

Vi har derfor arbejdet på at finde nye kandidater til sådan-

ne håndtag. Vi startede med at bygge en QSAR-model for hPEPT1, og det lykkedes at udvikle en god og hurtig model. Derpå lod vi computermodellen undersøge en database med omkring 20.000 molekyler, som hurtigt ville kunne anskaffes. I databasen fandt computeren 12 interessante kemiske stoffer, som blev indkøbt og testet i laboratoriet af vores samarbejdspartnere. Ud af de 12 molekyler udviste 4 binding til hPEPT1 – såkaldte hits. Selvom man kan sige, at computeren ikke ramte plet i alle tolv tilfælde, er en succesrate på 33 procent faktisk ganske høj for en virtual screening, som det kun kræver få ressourcer at gennemføre.

Resultaterne fra projektet er foreløbigt offentliggjort i to videnskabelige artikler, og de vil danne grundlag for flere undersøgelser; herunder fremstilling og test af andre molekyler, som er beslægtede med de fire nye, biologisk aktive forbindelser. Selvom projektet er grundforskning, der lærer os nyt om hPEPT1-transportproteinet, bliver det spændende at følge de fremtidige undersøgelser – især med hensyn til, om resultaterne på sigt vil kunne bidrage til udviklingen af fremtidens lægemidler.

*Cand.pharm. Simon Birksø Larsen er ph.d.-studerende på Institut for Medicinalkemi
Ph.d. Lars Olsen er lektor på Institut for Medicinalkemi
Ph.d. Flemming Steen Jørgensen er professor på Institut for Medicinalkemi*

Skræddersyede proteiner

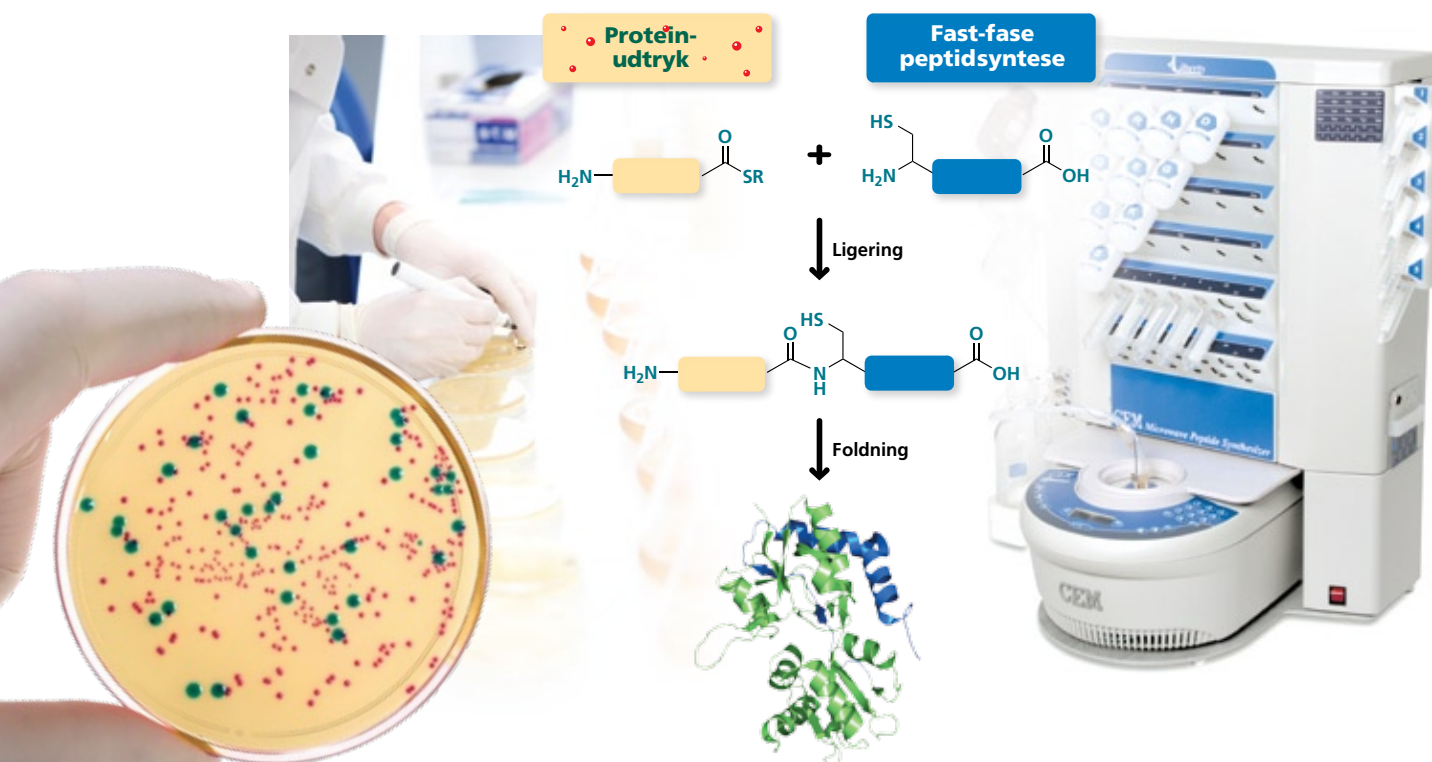
– uden naturens begrænsninger

Ved at kombinere biologiske og kemiske metoder kan man nu designe semi-syntetiske proteiner stort set uden hensyn til de begrænsninger, som findes i naturen. Vi har fremstillet dele af en receptor i hjernen, som kan give ny indsigt i receptorens funktion. Samtidig åbner teknologien op for udvikling af nye proteinlægemidler med forbedrede egenskaber.

Af Kristian Strømgaard, Mette S. Jensen og Anders S. Kristensen

Proteiner er kroppens vigtigste byggeklodser og arbejdsheste. Nogle proteiner er enzymer, som udfører biokemiske funktioner såsom fordøjelse og optagelse af næring, andre proteiner er antistoffer, som bekæmper bakterier og virus, mens nervesystemets receptorproteiner spiller en central rolle for bearbejdelse af sanseindtryk og for signalprocesserne i hjernen.

På grund af deres enorme betydning er proteiner det altoverskyggende biologiske mål for lægemidler. De fleste lægemidler virker ved at binde sig til et eller flere af kroppens proteiner; især receptorer eller enzymer. Detaljeret viden om disse proteins struktur og funktion er således uhyre vigtig i bestræbelserne på at udvikle nye og bedre lægemidler. Traditionelt har man i medicinsk forskning fremstillet grupper af stoffer og testet deres biologiske effekt på receptorer, og på den måde har man opnået viden om sammenhængen mellem lægemiddelstoffernes struktur og deres biologiske virkning. Men metoden giver kun indirekte viden om selve proteinets struktur og funktion. Derfor er der stor interesse i at kunne overføre teknikkerne og principperne fra medicinsk kemi til proteinernes verden, hvilket er målet for en ny disciplin, som kaldes protein-medicinsk kemi. Her har man mulighed for frit at ændre i proteins struktur og efterfølgende observere den biologiske effekt af ændringen.

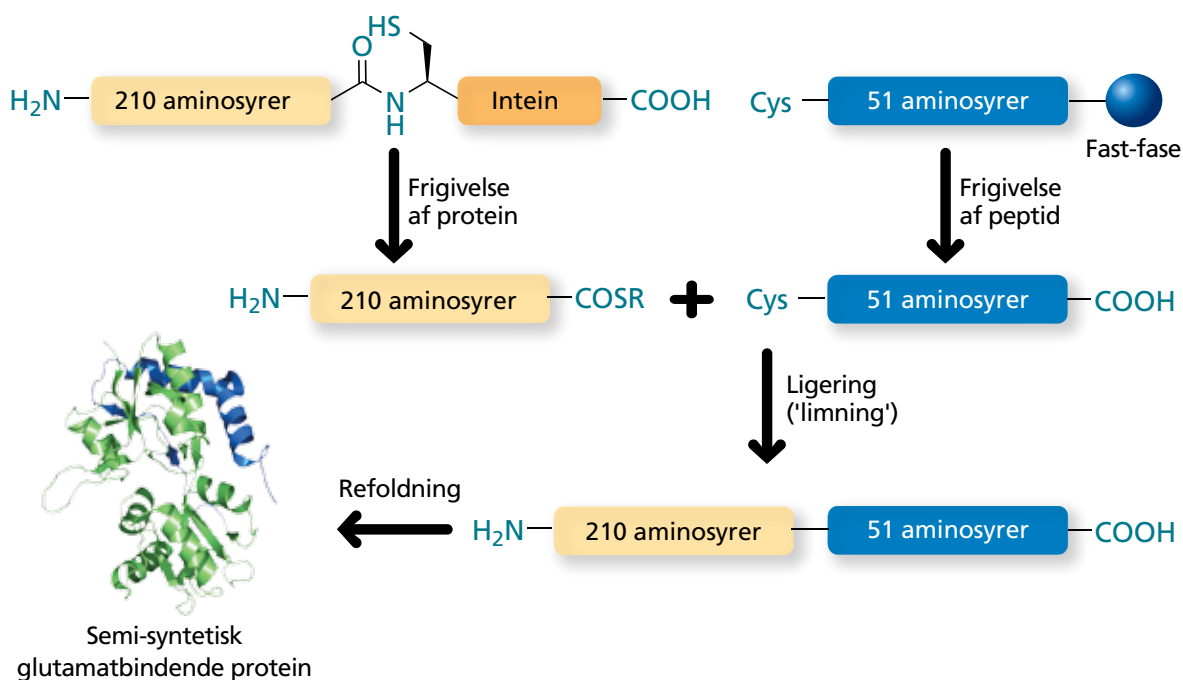


Semi-syntese kombinerer genetisk fremstilling af proteiner (tv.) med fast-fase peptidsyntese (th.). Først skal de to komponenter, protein og peptid, fremstilles, så de udstyres med komplementære kemiske grupper, der muliggør, at fragmenterne kan sættes sammen som byggeklodser. Dernæst skal proteinet og peptidet "limes" sammen, hvorved det semi-syntetiske protein dannes.



PROTEINFREMSTILLING I E. COLI

PEPTIDSYNTESE



Vi har fremstillet den glutamatbindende del af en glutamatreceptor ved hjælp af semi-syntese. Receptorproteinet består af 261 aminosyrer. Først fik vi udtrykt et inaktivt forstadium af proteinet i E. coli. Forstadiet, som indeholder 210 aminosyrer, blev efterfølgende aktiveret ved at frigøre den kemiske gruppe, der er væsentlig for, at ligering ('limning') kan finde sted. Sideløbende fremstillede vi et peptid med 51 aminosyrer ved brug af fast-fase peptidsyntese og lignede dette til den bakterielt udtrykte byggeklods, hvorpå det ønskede protein var sat sammen. Det biologisk aktive protein blev til sidst dannet ved refoldning, hvorefter biologiske undersøgelser bekræftede, at det semi-syntetiske protein opførte sig som det normale protein.

Kombination af kemi og biologi

Proteiner er opbygget af aminosyrer, som er sat sammen i kæder – såkaldte polypeptider. I alle organismer fra bakterier til mennesker er der præcis 20 forskellige aminosyrer til rådighed som byggesten for proteinerne. Opskriften på, hvilke aminosyrer et protein skal indeholde, og i hvilken rækkefølge de skal sættes sammen, er givet i vores gener. Mennesket har mere end 20.000 gener, og kroppen indeholder et lignende antal forskellige proteiner.

I laboratoriet har man traditionelt kunnet fremstille menneskelige proteiner med to metoder. Den første metode er biologisk, hvor man ved hjælp af genteknologi isolerer genet for det ønskede protein fra menneskeceller og introducerer genet i encellede organismer som bakterier og gær eller i pattedyrsceller. Her aktiveres cellen til at producere det ønskede protein fra det udefrakommende gen. Da celler kan dyrkes i flydende kulturer i litervis, kan man efterfølgende isolere store mængder af proteinet. Alternativt kan man fremstille et protein ved en kemisk teknik, som kaldes fast-fase peptidsyntese, hvor proteinernes byggesten – aminosyrerne – hæftes sammen en for en, indtil det ønskede protein er dannet. Hver teknologi har sine fordele og ulemper. Produktion af proteiner i bakterier og gær kan relativt nemt opskaleres til industriel skala, men genteknologien er begrænset til bru-

gen af de 20 aminosyrer, som generne koder for. Modsat er fast-fase peptidsyntese ikke begrænset til de 20 aminosyrer, men metoden er til gengæld bekostelig og kan generelt kun benyttes til at fremstille små proteiner, som indeholder op til 60 aminosyrer. Det er en væsentlig begrænsning, fordi hovedparten af kroppens proteiner består af mange flere aminosyrer.

For at kunne praktisere protein-medicinalkemi er det nødvendigt, at man – som i medicinalkemien – har mulighed for frit at variere proteiner uden at være begrænset til naturens 20 aminosyrer eller af proteinets størrelse. Denne frihed kan opnås med en semi-syntetisk teknologi, som kombinerer de biologiske og de kemiske metoder. I denne teknologi fremstilles en del af proteinet i bakterier eller gær, mens den resterende del fremstilles ved hjælp af fast-fase peptidsyntese. Efterfølgende "limes" de to dele sammen, så de danner det endelige protein. Teknologien kræver først og fremmest, at de to byggeblokke hver især udstyres med komplementære kemiske grupper, som muliggør, at de kan limes sammen. Den helt store fordel ved metoden er, at man i den kemisk fremstillede del af proteinet kan introducere hvilken som helst syntetisk aminosyre, hvilket udvider valgmulighederne fra 20 til flere end 1000 forskellige aminosyrer som byggesten.

FORBEDREDE PROTEINLÆGEMIDLER

Den semi-syntetiske teknologi har stor bevågenhed i forhold til at kunne lave modificerede terapeutiske proteiner. Proteiner kan nemlig være lægemidler i sig selv; nogle eksempler er insulin til behandling af sukkersyge, væksthormon til behandling af dværgvækst og erythropoietin (EPO) til behandling af blodmangel.

Terapeutiske proteiner er et område i hastig vækst, men en afgørende udfordring i udviklingen er, at de anvendte proteiner ofte er ustabile i kroppen. Det medfører, at proteinet ikke kan indtages som tabletter, fordi det vil blive fordøjet i mave og tarm, og derfor må indgives som injektioner. Ydermere er det problematisk, at proteinet på trods af direkte injektion i blodbanen ofte mister sin effekt på grund af nedbrydning. Derfor er man uhyre interesseret i at modificere proteiner, så man øger både stabiliteten og effekten, og her har den semi-syntetiske teknologi et stort potentiale.

Semi-syntese af en glutamat receptor

Den nye semi-syntetiske teknologi har en lang række anvendelsesmuligheder. Først og fremmest i grundforskning, hvor teknologien kan benyttes i undersøgelser af sammenhængen mellem proteiners struktur og deres funktion, idet teknologien tillader, at man kan i stedet for kun at kunne indføre 20 forskellige modifikationer i proteinet nu i princippet kan vælge mellem flere tusinde

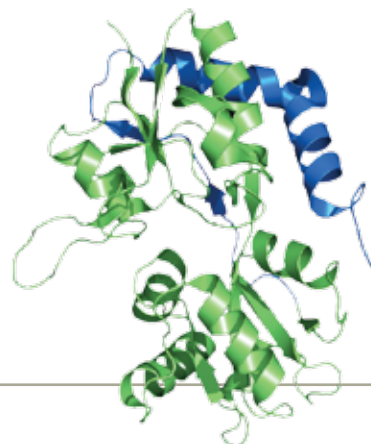
Et eksempel fra Kemisk Biologi gruppen på Institut for Medicinalkemi er studiet af receptorerne for hjernens primære stimulerende signalstof glutamat. Glutamatreceptorerne er en af de vigtigste grupper af receptorer i hjernen, da de findes i cellemembranerne på omtrent alle nerveceller og spiller en afgørende rolle for hukommelse og indlæring samt for mange hjernesygdomme såsom Alzheimers sygdom og skizofreni.

Glutamatreceptorer er opbygget af fire proteiner, som tilsammen danner receptoren. Hvert af disse proteiner er opdelt i fire domæner, og her er det lykkedes at isolere og producere det protein-domæne, hvortil glutamat binder, som en separat enhed. Domænet består af 261 aminosyrer, og det har været benyttet til en lang række vigtige studier af sammenhængen mellem glutamats binding og receptorfunktion samt til undersøgelser af, hvordan en række mulige lægemiddelstoffer binder sig til glutamatreceptorerne.

Vort mål var at fremstille det glutamatbindende domæne ved hjælp af semi-syntese for at kunne fortage detaljerede protein-medicinalkemiske studier af glutamatreceptoren. Første trin i processen var at identificere positioner i proteinets aminosyrekæde, som tillod, at to proteindele kunne limes sammen ved en proces kaldet ligering. Vi identificerede et muligt ligeringssted, som tillod os at dele proteinet i et stort fragment med 210 aminosyrer og et mindre fragment med 51 aminosyrer. Det store fragment krævede fremstilling i bakteriekulturer, mens det lille kunne fremstilles ved fast-fase peptidsyntese.

Dernæst skulle de to komponenter sættes sammen ved hjælp af kemisk ligering. Under dette trin er en af de meget store udfordringer, at de komplementære kemiske grupper, som muliggør ligeringen, er ustabile. Derfor er det vigtigt at finde de helt rette betingelser for, at ligeringen kan finde sted. Efter at disse betingelser var bestemt og optimeret, lykkedes det at danne proteinet med 261 aminosyrer. Efterfølgende udførte vi en række biologiske undersøgelser på proteinet, som viste, at det semi-syntetiske protein opførte sig som det normalt fremstillede protein.

På nuværende tidspunkt har vi således udviklet en metode, som muliggør fremstilling af det glutamatbindende domæne semi-syntetisk. I øjeblikket benytter vi metoden til at introducere en række modifikationer i proteinet. Fx undersøger vi, hvilken rolle kemiske grupper i proteinets ryggrad har for binding af glutamat. Disse amidgrupper kan kun modificeres ved hjælp af semi-syntetisk teknologi, hvilket vi har udnyttet til at erstatte udvalgte amidgrupper med estergrupper. På den baggrund kan vi undersøge betydningen af hver enkelt amidgruppe for binding af glutamat samt mulige lægemiddelstoffer. Det åbner op for en større forståelse for sammenhængen mellem struktur og funktion af receptoren og dermed for design af nye og bedre lægemiddelstoffer.



*Ph.d. Kristian Strømgaard er professor på Institut for Medicinalkemi
Cand.polyt. Mette S. Jensen er ph.d.-studerende på Institut for Medicinalkemi
Ph.d. Anders S. Kristensen er lektor på Institut for Medicinalkemi*



Kombination af konserveringsmidler i cremer nedsætter risikoen for allergi

Kombinationer af konserveringsmidler i kosmetik kan markant nedsætte forbruget af allergifremkaldende konserveringsmidler. Det kan medføre, at færre forbrugere udvikler allergi over for konserveringsmidler i cremer.

Af Michael Dyrgaard Lundov og Lise Moesby

Når du bruger cremer, får du udover den fugtgivende effekt også smurt forskellige kemikalier ud på huden. Ikke alle disse kemikalier er uskadelige, og hvis du oplever hudirritation eller eksem efter brug af cremer eller andre kosmetiske produkter, er der stor sandsynlighed for, at du har udviklet allergi over for et eller flere af de kemiske stoffer i produktet. Omkring 6 procent af befolkningen har kontaktallergi over

for kosmetik, og en af de hyppigste årsager er anvendelsen af konserveringsmidler i cremer. Hvis man først har fået konstateret allergi over for et konserveringsmiddel, er der tale om en livsvarig tilstand. Derfor er det nødvendigt, at allergikeren undersøger al kosmetik og alle husholdningsprodukter inden brugen for at undgå at blive udsat for konserveringsmidlet. Det er vanskeligt at undgå konserveringsmidler i kosmetik, fordi mange cremer har en sammensætning af ingredienser, som giver gode vækstbetingelser for bakterier, svampe og mug (se ill. side 14). Hvis mikroorganismene får lov til at gro i en creme, kan de til sidst ødelægge cremen eller i sjældne tilfælde gøre forbrugeren syg.

Derfor stiller EU krav om, at kosmetik maksimalt må indeholde 500 eller 1000 mikroorganismer pr. gram creme afhængigt af typen af kosmetik. Desuden skal alle kosmetiske produkter bestå en såkaldt *challenge-test*, som viser produktets konserverende effekt. I testen tilsætter man en kendt koncentration (10^5 - 10^6 pr. gram) mikroorganismer til produktet og derefter følges tilintetgørelsen af mikroorganismer over en periode på 28 dage. For at et produkt kan bestå testen, skal 99 eller 99,9 procent af mikroorganismene være slået ihjel efter 14 dage, og der må ikke ske en vækst i antallet af overlevende mikroorganismer fra dag 14 til dag 28. I challenge-testen kan man bruge forskellige mikroorganismer, men oftest vil man vælge den Gram-positive bakterie *Staphylococcus aureus*, den Gram-negative bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, gærsvampen *Candida albicans* og svampen *Aspergillus niger*. Fælles for de fire mikroorganismer er, at de ofte findes i miljøet omkring os, at de kan gro på mange forskellige substrater, og at alle fire er potentielt sygdomsfremkaldende.





En creme uden konserveringsmiddel ses til venstre umiddelbart efter tilførsel af Pseudomonas-bakterier i en såkaldt challenge-test. I midten er cremen vist tre måneder senere og til højre efter ni måneder. I den tre måneder gamle creme ses bakterievæksten som en generel mørkfarvning af cremen samt som mørke pletter i kanten. Efter ni måneder er cremen overgroet med bakterier.

Hyppigt anvendte konserveringsmidler

I cremer og andre kosmetiske produkter må man i henhold til EU-lovgivningen kun bruge bestemte konserveringsmidler. Nogle af de hyppigst anvendte konserveringsmidler er diazolidinyl urea og phenoxyethanol.

Diazolidinyl urea er et konserveringsmiddel, som blandt andet fungerer ved at fraspalte formaldehyd, hvilket gør stoffet til et meget effektivt antibakterielt middel. Diazolidinyl urea er det tiendemest brugte konserveringsmiddel og findes i omkring 5 procent af alle kosmetiske produkter. Der må tilsættes op til 0,5 procent diazolidinyl urea i kosmetiske produkter. Diazolidinyl urea er også en af de hyppigste årsager til kontaktallergi over for kosmetik, hvilket især skyldes, at formaldehyd er et meget kraftigt allergen. Der findes flere forskellige konserveringsmidler, der fungerer ved at fraspalte formaldehyd, og fælles for dem alle er, at de hyppigt forårsager allergi.

Phenoxyethanol er det tredjemest benyttede konserveringsmiddel i kosmetik og findes i ca. hver fjerde af alle kosmetiske produkter. Der er stort set ingen, som er allergiske over for phenoxyethanol, men desværre er stoffet ikke et særligt effektivt konserveringsmiddel. Derfor bruges phenoxyethanol næsten altid i kombination med et andet og mere effektivt konserveringsmiddel. Der må tilsættes op til 1 procent phenoxyethanol i kosmetiske produkter.

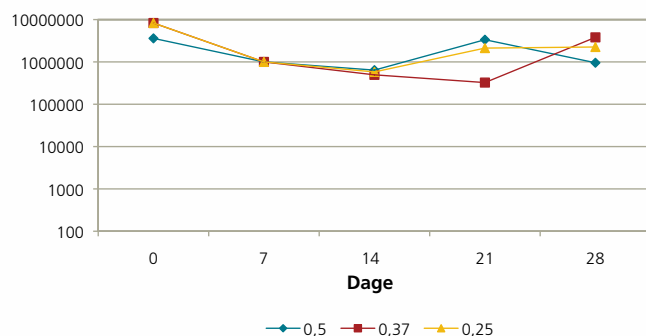
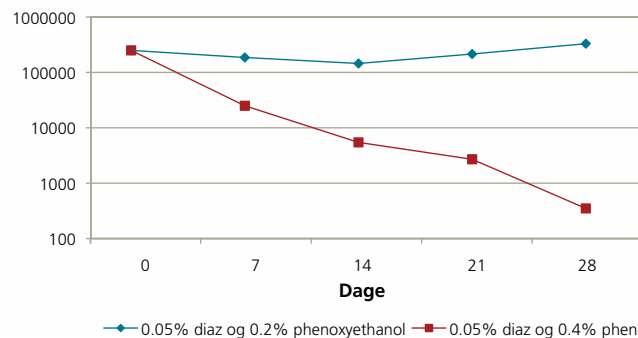
Undersøgelser har vist, at koncentrationerne af konserveringsmiddel i cremer varierer meget, og man kan overveje, om nogle cremer er overkonserverede. Det kan skyldes, at producenterne vil være sikre på, at produktet består challenge-testen, eller at man ikke har undersøgt, om en lavere koncentration kunne være lige så effektiv.

I mange tilfælde vil kombinationer af konserveringsmidler være mere effektive, fordi mikroorganismene bliver "angrebet" på flere måder og derved bliver mere sårbare over for det enkelte konserveringsmiddel. Derudover er konserveringsmidler sjældent effektive over for både bakterier og svampe, og kombinationer af konserveringsmidler vil derfor ofte være effektive over for flere forskellige typer af mikroorganismer.

Koncentrationer og allergi

Nogle af de hyppigst brugte konserveringsmidler er også de mest allergifremkaldende, og hvert år er der mange mennesker, der udvikler allergi over for konserveringsmidler. Ved at benytte kombinationer af konserveringsmidler kan man ofte bruge lavere koncentrationer og stadig opnå tilfredsstillende konservering. Kontaktallergi over for konserveringsmidler skyldes blandt andet den dosis, brugeren udsættes for, og derfor vil lavere koncentrationer af konserveringsmidler i kosmetik sandsynligvis medføre færre tilfælde af kontaktallergi. En af vore undersøgelser viser, at man kan nedsætte koncentrationen af det allergifremkaldende konserveringsmiddel diazolidinyl urea i en creme til en tiendedel – fra 0,5 procent til 0,05 procent – ved at kombinere stoffet med 0,4 procent af konserveringsmidlet phenoxyethanol, som sjældent fremkalder allergi.

Konserveringsmidler er nødvendige i kosmetik, men det er vigtigt, at de bliver brugt i så lave koncentrationer som muligt for at undgå, at forbrugerne udvikler en livsvarig allergi over for konserveringsmidler, som ud over i kosmetik også findes i en lang række andre husholdningsprodukter.

a**C. albicans pr. g. creme****b****C. albicans pr. g. creme**

Challenge-test for gærsvampen *Candida albicans* i en creme med forskellige koncentrationer af konserveringsmidler:

- a** Tre koncentrationer af diazolidinyl urea – 0,25; 0,375 og 0,5 procent – var ikke i stand til at slå gærsvampen ihjel.
- b** 0,05 procent diazolidinyl urea blev testet i kombination med 0,2 og 0,4 procent phenoxyethanol. Sidstnævnte kombination bestod testen og eliminerede stort set svampen.

TESTRESULTAT: KOMBINATION RAMMER BREDT VED LAVE KONCENTRATIONER

Vi har gennemført en challenge-test på en creme med forskellige koncentrationer af det allergifremkaldende konserveringsmiddel diazolidinyl urea. I undersøgelsen blev der testet tre forskellige koncentrationer – 0,25; 0,375 og 0,5 procent – hvor 0,5 procent er den højeste koncentration, man må tilsætte i kosmetiske produkter i EU.

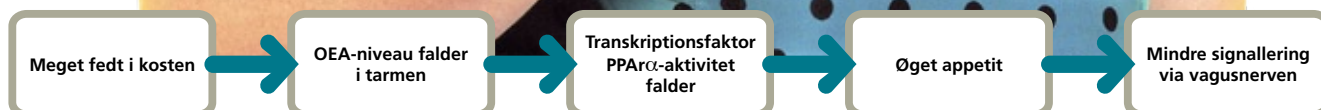
Det viste sig, at konserveringsmidlet ikke kunne slå gærsvampen *C. albicans* ihjel, og antallet af *C. albicans* ændrede sig stort set ikke i løbet af de 28 dage, som challenge-testen varer (a). Bakterierne *S. aureus* og *P. aeruginosa* samt svampen *A. niger* blev alle dræbt af de undersøgte koncentrationer.

Efterfølgende undersøgte vi, om en række forskellige kombinationer af diazolidinyl urea og phenoxyethanol var mere effektive over for alle fire mikroorganismer. Phenoxyethanol er sjældent allergifremkaldende. Forsøgene viste, at en kombination af 0,05 procent diazolidinyl urea og 0,4 procent phenoxyethanol bestod challenge testen, hvilket også var tilfældet for en række andre kombinationer med højere koncentrationer af phenoxyethanol. Derimod kunne 0,05 procent diazolidinyl urea og en lavere koncentration af phenoxyethanol på 0,2 procent ikke slå gærsvampen ihjel (b).

Cand.scient. Michael Dyrgaard Lundov er ph.d.-studerende på Videncenter for Allergi, Gentofte Hospital, og på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Ph.d. Lise Moesby er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi

Ekstra sulten

af den
fede mad



Foreslået mekanisme der ligger til grund for, at fedtholdig kost øger energiindtaget. Man bliver sulten af flødekager!

Et højt indtag af fedtholdig kost kan sætte kroppens normale appetitregulering delvist ud af spil, så kroppen har svært ved at fornemme, hvornår der er indtaget energi nok via den daglige kost. Meget fedt i kosten kan således bidrage til udvikling af øget appetit og fedme. En af årsagerne er sandsynligvis nedregulering af et hormonalt mæthedssignal i tarmene.

Af Thi Ai Diep, Andreas Artmann, Niels W. Andersen, Steen Honoré Hansen, Harald S. Hansen

Globalt er fedme et voksende problem. På verdensplan regner man med, at over en milliard mennesker er overvægtige, og mindst 300 millioner af dem er fede. Fedme og overvægt defineres ud fra begrebet Body Mass Index (BMI). BMI udregnes ved, at en persons vægt i kg divideres med højden². Hvis man har et BMI mellem 25 og 30 er man overvægtig,

mens man klassificeres som fed, hvis man har et BMI over 30. I Danmark skønnes det, at ca. 13 procent af den voksne danske befolkning er fede, hvilket svarer til omkring 350.000 personer.

Udover at overvægt og fedme kan være et kosmetisk problem, så er fedme en del af det metaboliske syndrom (MS), som er en samling af risikofaktorer for diverse livsstilssygdomme. De vigtigste er æbleformet fedme, forhøjet blodtryk og ændringer i blodparametre såsom nedsat HDL-kolesterol, forøgede mængder af triglycerid i blodet samt forhøjet blodsukker ved faste. Hvis man har udviklet æbleformet fedme og dertil har to eller flere af de øvrige risikofaktorer, løber man en stor risiko for at udvikle livsstilssygdomme som type 2-diabetes og hjerte-kar-sygdomme. Alle sygdommene er forbundet med nedsat livskvalitet og en øget risiko for en tidlig død.

Regulering af fødeindtaget

Appetitreguleringen hos mennesker har stor betydning for tendensen til, at flere bliver fede eller overvægtige i det moderne samfund. Appetitreguleringen er et meget komplekst system. I forbindelse med et måltid sendes signaler fra maven, tarmen og leveren op til hjernens appetitcenter, der behandler signaler og regulerer den hårfine balance mellem, hvor meget vi spiser, og hvor meget energi vi forbrænder. Signalerne kan være flere forskellige hormonlignende stoffer, som udskilles i blodet og derved aktiverer nervebaner i hjernens appetitcenter. Systemet er udviklet gennem evolutionen over tusinder af år – det vil sige i tider, hvor mad ikke altid var let tilgængelig, og hvor risikoen for sult altid var til stede. Derfor er der meget, der tyder på, at appetitreguleringen snarere er optimeret til at lagre overskydende energi i form af fedt i perioder med overskud af mad og energi, frem for at beskytte kroppen mod fedme. Dette faktum i kombination med at vi spiser mere energiholdig mad og motionerer mindre, menes at være de primære årsager til den aktuelle fedmeepidemi.

Forskergrupper verden over forsøger at afdække patofysiologien bag udvikling af fedme. Et fokusområde er studier af samspejlet mellem mange vigtige signalstoffer, som indgår i appetitreguleringen hos mennesker. Man forsøger bl.a. at opklare, hvilke signalstoffer der dannes hvornår, og hvad den eksakte funktion af de forskellige signaler er. I studierne indgår anvendelsen af fede rotter og mus, hvis fedme er udviklet ved at give dem et højt indhold af fedt i foderet. Fra studier af mennesker ved man, at et højt fedtindhold i kosten øger den indtagne energimængde ved et måltid.

Vi har især undersøgt betydningen af et af signalmolekylerne, oleoylethanolamid (OEA), som dannes i tarmen i forbindelse med indtagelse af et måltid. OEA er et anorektisk lipidhormon med en fedtsyrelignende struktur. Det dannes i tarmcellerne og virker lokalt ved at aktivere vagusnerven, som sender information fra tarmen op til hjernen. Dyreforsøg har vist, at hormonet kan hæmme fødeindtagelsen.

Hormonet oleoylethanolamid (OEA) dannes lokalt i tarmene. Studier med rotter har vist, at indgift af syntetisk OEA fører til nedsat fødeindtag. Hvis hormonet virker på samme måde hos mennesker, vil man sandsynligvis kunne udvikle et lægemiddel til behandling af fedme.

OEA OG POTENTIELLE LÆGEMIDLER

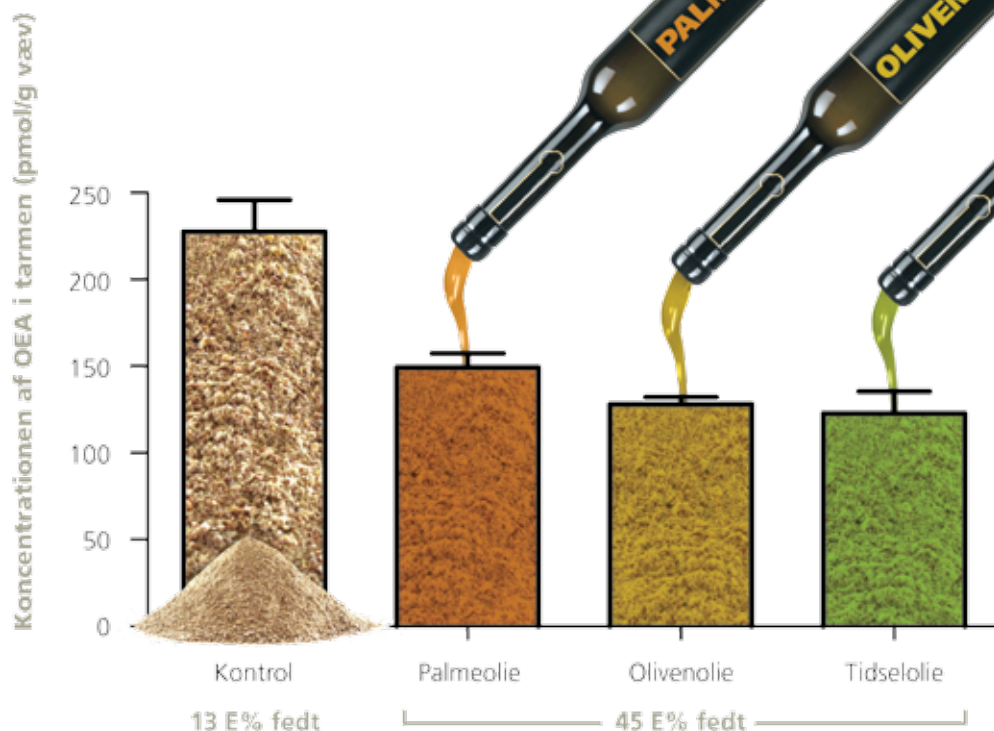
OEA dannes ud fra forstadiet N-acylphosphatidylethanolamin, hvilket sker ved en eller flere enzymatiske reaktioner i tarmcellerne. OEA nedbrydes lokalt i tarmcellerne af et eller flere hydrolytiske enzymer. Derfor er koncentrationen af OEA relativ lav i tarmen (pmol/g væv), og man regner med, at OEA virker lokalt i tæt forbindelse med, at det dannes.

På cellulært plan virker OEA inde i cellerne ved at aktivere en transkriptionsfaktor kaldet PPAR α , som ved aktivering påvirker signaleringen fra tarmen via vagusnerven til hjernen hos rotter.

Det vides endnu ikke, om OEA fungerer på samme måde hos mennesker. Hvis OEA virker tilsvarende hos mennesker, og hvis man kan udvikle kemiske stoffer, der hæmmer nedbrydningen af OEA i tarmvævet, vil man sandsynligvis kunne udvikle et lægemiddel til behandling af fedme.



EFFEKTEN AF FEDTHOLDIG KOST PÅ OEA-NIVEAUET I TARMEN



Søjlediagrammet viser niveauet af OEA i tarmvævet fra rotter, som enten er fodret med rottefoder indeholdende 13 energiprocent fedt eller med rottefoder iblandet forskellige spiseolier og et fedtindhold på 45 energiprocent. Højere fedtindhold i foderet reducerer mængden af hormonet, som signalerer mæthed. I typisk dansk kost udgør fedtet 30-35 procent af energiindholdet.

Studier i rotter

Vi har undersøgt effekten af lokalhormonet via indgift af syntetisk OEA til rotter. Indgiften er enten sket ved indsprøjtning i doser på 10-30 mg pr. kg kropsvægt, ved at blande stoffet i foderet svarende til 100 mg pr. kg kropsvægt eller via sondefodring med hormonet i mængder på 10-100 mg pr. kg kropsvægt.

Uanset den anvendte metode fører indgiften af OEA både til nedsat fødeindtag og nedsat vægtforøgelse. Ved faste falder niveauet af OEA i tarmen, mens det normaliseres ved genfodring af rotterne. OEA er derfor et af mange "mæthedssignaler", der dannes i tarmen, og som via vagusnerven bidrager til styring af fornemmelsen for sult og mæthed i hjernens appetitcenter.

Rotter er natdyr, som jager og spiser deres små, men hyppige måltider, når det er mørkt. Virkningsmekanismen for OEA's appetithæmmende effekt er, at den forlænger tidsintervallet mellem to på hinanden følgende måltider. Derfor spiser rotterne mindre i løbet af natten, når de behandles med hormonet.

Vi har fundet, at fodring af voksne rotter med en fedtholdig

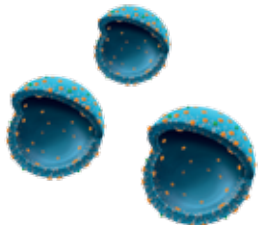
kost, hvor 45 procent af energien kommer fra fedt, sænker niveauet af OEA i tarmen, uanset hvilken fedttype foderet indeholder. Niveauet af hormonet i tarmen er betydeligt lavere end hos rotter, som har fået almindeligt rottefoder med en fedtenergiprocent på 13. Det betyder, at et øget fedtindtag via kosten reducerer OEA-niveauet i tarmen, og i teorien vil det stimulere til at indtage mere føde. Dette kan være en af de virkningsmekanismer, hvorved et øget fedtindtag via kosten kan fremme forekomsten af fedme.

Mindre fedt i maden

Indledende forsøg med rotter har vist, at faldet i niveauet af OEA i tarmvævet i stigende grad sker, når fedt udgør 20-45 procent af foderets samlede energiindhold. Til sammenligning udgør fedt 30-35 procent af energien i en typisk dansk kost. At niveauet af lokalhormonet i tarmen er omvendt proportionalt med mængden af fedt i kosten, betyder, at selv en lille sænkning af fedtmængden i den danske kost potentielt set vil øge niveauet af OEA i tarmen og have gavnlig effekt på folkesundheden i form af nedsat fødeindtag og dertilhørende vægttab.

Cand.scient. Thi Ai Diep er ph.d.-studerende på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Ph.d. Andreas Artmann er Director of In Vivo Pharmacology ved Action Pharma AIS
Stud.pharm. Niels W. Andersen er specialestuderende på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Dr.pharm. Steen Honoré Hansen er professor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Dr.scient. Harald S. Hansen er professor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi

Innovativt nanopartikeldesign bag skræddersyede vacciner



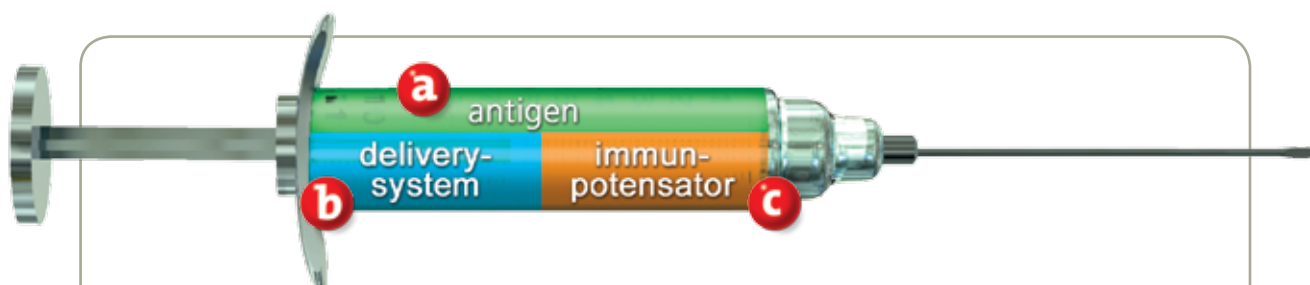
Vaccination er en af de største succes historier inden for moderne medicin. Dødelige sygdomme som kopper og polio er af WHO erklæret for udryddet, og flere andre sygdomme er ikke længere en trussel mod folkesundheden takket være effektive børnevaccinationsprogrammer. Det til trods er der stadig mange infektionssygdomme, som vi ikke kan vaccinere imod. Men nu har helt nye gennembrud i forståelsen af, hvordan immunsystemet bekæmper infektionssygdomme, givet os viden til at kunne designe og skræddersy nye og forbedrede vacciner mod de infektionssygdomme, hvor vi i vaccinationsøjemed hidtil er kommet til kort.

Af Pernille Nordly, Else Marie Agger, Hanne Mørck Nielsen og Camilla Foged

Mange infektionssygdomme såsom malaria, tuberkulose og respiratoriske infektioner (fx influenza og streptokokker) er på verdensplan skyld i massevis af dødsfald hvert år. Derfor forskes der i at udvikle nye vacciner mod disse sygdomme eller forbedre allerede eksisterende vacciner. Moderne vacciner (subunit-vacciner) er baseret på udvalgte komponenter (antigener) fra den sygdomsfremkaldende mikroorganisme. Det er muligt at producere disse komponenter i en meget høj renhedsgrad, hvilket bevirker, at de ikke udgør nogen sikkerhedsrisiko for mennesker i modsætning til tidligere tiders vaccination med levende mikroorganismer. Den høje

renhedsgrad betyder imidlertid, at komponenterne ikke er i stand til at aktivere immunforsvaret og tilkalde og aktivere de celler, som sætter kroppens immunforsvar i gang. Derfor kombineres antigenet oftest med et eller flere hjælpestoffer, der kan aktivere immunsystemet. Disse hjælpestoffer kan enten være deliverysystemer, fx nanopartikler, der afleverer antigenet til immunsystemet på den rette måde, eller immunpotensatorer, der stimulerer eller modulerer aktiveringen af et beskyttende immunrespons. Tilsammen kaldes disse hjælpestoffer en adjuvans, som kommer af det latinske ord adjuvare, der betyder at hjælpe.

I et samarbejde mellem Københavns Universitet og Statens Serum Institut arbejdes der på udvikling af effektive vaccine-adjuvanter baseret på positivt ladede nanopartikler af lipider, kaldet liposomer. Disse liposomer består af det kationiske og overfladeaktive stof dimethyldioctadecylammoniumbromid (DDA) og immunpotensatoren trehalosedibehenat (TDB). Dette adjuvanssystem kaldes CAF01 og har vist sig meget effektivt og sikkert i dyreforsøg, og i år testes det for første gang i mennesker i forbindelse med en tuberkulosevaccine. Formålet med det nuværende projekt er at justere og skræddersy dette adjuvanssystem til vacciner mod flere forskellige sygdomme. Ideen er først at målrette adjuvansen til brug i vacciner mod bl.a. klamydia, streptokokker og influenza, men på længere sigt forventes det, at den nye adjuvans også kan bruges i vacciner mod andre sygdomme.



Moderne subunit-vacciner består typisk af tre komponenter: **a** Et eller flere antigener der giver et specifikt immunsvare over for en bestemt mikroorganisme. Antigener kan være proteiner, peptider eller DNA. **b** Et deliverysystem, ofte en partikelstruktur, der kan præsentere og aflevere antigener på rette vis til immunforsvaret. **c** En immunpotensator som modulerer eller stimulerer et immunrespons mod antigenet. Tilsammen kaldes deliverysystemet og immunpotensatoren for en adjuvans.

- DDA
- TDB
- Immunpotensator
- Antigen

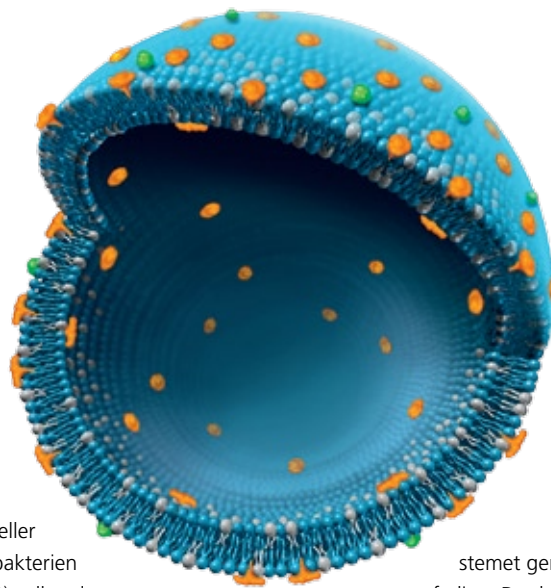


Illustration af DDA/TDB-liposomer med immunpotensator og antigen.

Skræddersyede vacciner

Forskellige former for infektioner skal bekæmpes forskelligt af kroppens immunsystem. Immunsystemet benytter to overordnede principper for at komme af med sygdomsfremkaldende bakterier eller vira: 1) antistoffer, der direkte binder til bakterien eller virussen og eliminerer den og/eller 2) celler, der aktiverer andre dele af immunsystemet til at eliminere sygdomsramte celler. De få adjuvanter, der markedsføres i dag, aktiverer kun dannelsen af antistoffer. Derfor er der brug for adjuvanter, der også kan inducere et cellulært respons, hvor forskellige immunceller bliver aktiveret (fx mod tuberkulose, influenza og AIDS). Vaccinerne skal netop målrettes, så de kan inducere forskellige typer immunrespons karakteriseret ved aktivering af forskellige typer celler. Hypotesen er, at vi kan skræddersy adjuvanssystemet ved at inkorporere nogle ekstra komponenter i liposomstrukturene, så det kan benyttes i en række forskellige vacciner. Det vil medføre, at immunsystemet vil reagere med et respons, der egner sig til eliminering af en given sygdomsfremkaldende mikroorganisme. Disse komponenter kaldes immunpotensatorer, da de er i stand til at potensere (forstærke virkningen af) den måde, som immunsystemet reagerer på.

Immunpotensatorer

Immunpotensatorer er såkaldte pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), dvs. strukturer, der er unikke for sygdomsfremkaldende mikroorganismer, og som immunsy-

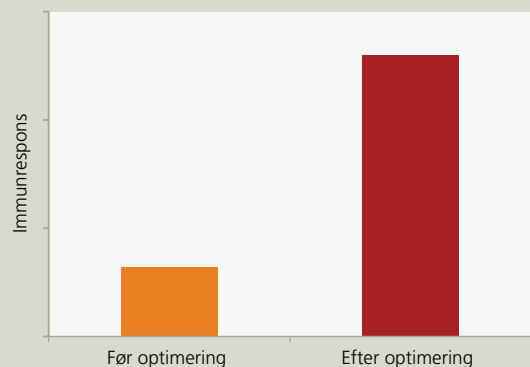
stemet genkender som fremmede og farlige. Det kunne fx være komponenter fra bakteriers cellevæg eller arvemateriale fra vira (dobbeltstretet RNA). Vi har screenet flere immunpotensatorer, blandt dem Poly IC, som er et syntetisk dobbeltstretet RNA. Ved at benytte Poly IC kan vi få immunsystemet til at reagere "kunstigt", som hvis det havde set virus. Vores foreløbige resultater viser, at ved at tilsætte dette RNA til vores nanopartikler induceres der i mus et immunrespons karakteriseret ved aktivering af en bestemt type celler, kaldet cytotoxiske T-lymfocytter. Disse celler er helt essentielle for at bekæmpe visse sygdomme som fx AIDS og tuberkulose. Det er planen, at denne nye adjuvans skal testes som en del af en influenzavaccine i dyremodeller.

Formulering af vacciner med immunpotensatorer

Et vigtigt aspekt i udviklingen af vacciner er selve formuleringen (dvs. design og fremstilling) af vaccinerne. Formuleringen af vacciner er essentiel og har stor betydning for en lang række faktorer, heriblandt for den kemiske og fysiske stabilitet af vacciner, for hvordan antigener og immunpotensatorer præsenteres for immunforsvaret og for evt. bivirkning-



Vaccineformuleringerne er testet i mus med et modelantigen. Der blev observeret et meget højere immunrespons i de mus, der blev vaccineret med den optimerede formulering af vaccinen end i de mus, der blev vaccineret med vaccinen før optimering.



ger og er dermed afgørende for, om vaccinerne virker efter hensigten eller ej. Det er vigtigt at opnå en stabil vaccine, der har betydelig holdbarhed, så den kan transporteres til fjerne dele af verden, uden at der sker nedbrydning eller sammenklumpning (aggregering), der kan medføre ændringer i vaccinens virkningsgrad.

Formuleringsdesignet er meget vigtigt for at inducere et godt immunrespons. En af de adjuvanter, som vi arbejder på, var i begyndelsen meget ustabil, og der blev dannet store aggregater, når immunpotensatoren blev tilsat. Den var dog i stand til at inducere et immunrespons. Men ved at optimere fremstillingsmetoden er adjuvansen blevet forbedret, således at der nu induceres et immunrespons, der er mange gange højere end før optimering af formuleringen (se ill. side 20). Ved at optimere formuleringen blev det også muligt at tilsætte en højere mængde af immunpotensatoren end tidligere, da dannelsen af store aggregater således undgås. Efter optimeringen var der ikke længere aggregater tilstede i vaccineformuleringen, og indtil videre ser det ud til, at den er stabil i køleskab i minimum tre måneder.

Formulering på molekylært plan

For at kunne målrette og optimere vacciner er det vigtigt at forstå, hvordan vaccineformuleringen ser ud på molekylært plan. Nanopartikler, i dette tilfælde liposomer blandet med immunpotensatorer, udgør komplicerede strukturer, og der kræves avancerede karakteriseringsteknikker for at undersøge og forstå deres opbygning. Vigtige parametre at karakterisere er i denne forbindelse fysisk-kemiske egenskaber så som partikelstørrelse, overfladeladning, lipidernes smeltepunkt (faseovergangstemperatur) og deres tredimensionelle struktur. Det er vigtigt at forstå disse egenskaber for at kunne optimere selve designet og fremstillingen af vaccinerne, så der kan opnås en effektiv, stabil og reproducerbar vaccineformulering med færrest mulige bivirkninger.

De fysisk-kemiske egenskaber er ikke kun vigtige for formuleringen af vaccinen, men de har også betydning for induktion af et immunsvær. Fx viser forskning, at liposomer skal have en faseovergangstemperatur over den normale krops-

temperatur på 37 °C for, at de virker mest effektivt som vaccineadjuvanter.

Overfladeladningen af liposomerne har også betydning, da positive ladede partikler lettere vil kunne interagere med de negativt ladede celler i immunsystemet og dermed fremme et immunrespons.

Rationelt design

Vores foreløbige resultater tyder på, at det er muligt at lave skræddersyede vacciner ved inkorporering af forskellige immunopotensatorer i liposomerne gennem et rationelt formuleringsdesign. Ydermere viser resultaterne, at formuleringsdesignet og fremstillingsmetoden af liposomer med immunpotensatorer ikke blot er vigtig for at opnå en stabil vaccineformulering, men også for at inducere et højt immunsvær. Det er altså ikke tilstrækkeligt bare at blande de forskellige vaccinekomponenter sammen i et mix på samme måde som tidligere, hvor adjuvansen blev betegnet som "The Immunologist's dirty little secret". Derimod er det vigtigt at karakterisere og forstå komponenternes fysisk-kemiske egenskaber for at kunne lave en god vaccineformulering. Det er derfor planen også i fremtidige studier at karakterisere formuleringerne yderligere og analysere interaktionen mellem adjuvans og antigen, da dette ligeledes forventes at have betydning for vacciners effektivitet.



Der er synlig forskel på adjuvansformuleringen før og efter optimering. Før optimeringen ses tydelige aggregater i en uhomogen suspension, mens der efter optimering ses en ensartet mælkevid formulering.

Cand.polyt. Pernille Nordly 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. Else Marie Agger er associate director for Afdelingen for Infektionsimmunologi, SSI samt sektionschef for vaccine delivery og formulering

Ph.d. Camilla Foged er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi

Gaboxadol

bliver absorberet via en aminosyretransportør

Efter indtag gennem munden bliver lægemiddelstoffet gaboxadol transporteret via transportør-proteiner over tarmens cellemembraner til blodbanen og herfra videre til hjernen. Mens man længe har kendt til GABA-transportører i hjernen, har først nyere forskning påvist en transportør for GABA og GABA-analoger som gaboxadol i tarmvæggen.

Af Mie Larsen, Rene Holm, Klaus Gjervig Jensen, Birger Brodin og Carsten Uhd Nielsen

Langt de fleste lægemidler indtages gennem munden, hvorefter de bevæger sig ned gennem mave-tarm-kanalen. Hidtil har man troet, at næsten alle lægemiddelstoffer blev optaget fra mave-tarm-kanalen ved passiv diffusion over tarmepithellet. Imidlertid har det vist sig, at mange lægemiddelstoffer bliver absorberet via aktive membran-transportører. Membrantransportører er transportproteiner, der findes i epithelaget i tarmen for at optage næringsstoffer fra føden og føre dem over i blodet.

Lægemiddelstoffer, der har samme struktur som næringsstofferne aminosyrer og peptider, kan optages via forskellige aminosyre- og peptid-transportører. Lægemiddelstoffet gaboxadol ligner gamma-aminosyrer som neurotransmitteren GABA (se ill. side 23). Gaboxadol har ved fysiologiske pH-værdier en positivt ladet aminogruppe og en negativt ladet 3-isoxazolol enhed, som minder om en syregruppe.

Når et lægemiddelstof absorberes fra tarmen til blodet via en aktiv membrantransportør, sker det ved at lægemiddelstoffet binder sig til en lomme i membrantransportøren. Derefter ændrer membranproteinet facon og bringer lægemiddelstoffet gennem cellemembranen. Denne form for aktiv transport er forskellig fra passiv diffusion, fordi den er mætbar, dvs. den har en maksimal kapacitet. Desuden kan der opstå konkurrence mellem forskellige substrater og inhibitorer ved membrantransportørens bindingssted, dvs. der kan ske en hæmning af transporten.

Gaboxadol absorberes via den proton-koblede aminosyretransportør 1, PAT1

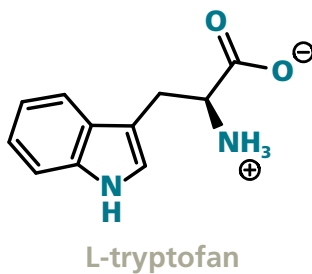
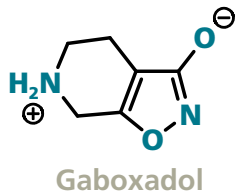
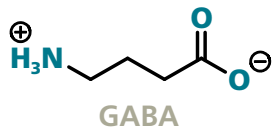
I menneskers tarm findes en proton-koblet aminosyretransportør, der kaldes PAT1. Transportøren sidder i de yderste

tarmceller i den membran, der vender ind mod tarmlumen (se ill. side 23), hvor den kan optage små neutrale aminosyrer fra føden, fx glycin, prolin og alanin. Men transportøren kan også optage aminosyre-lignende stoffer som osmolytterne sarcosin, betaine og taurine samt lægemiddelstofferne D-cycloserine, vigabatrine og neurotransmitteren GABA. PAT1 er en proton-koblet transportør, hvilket betyder, at den også flytter en proton hen over cellemembranen, hver gang den transporterer et aminosyre-lignende stof. Proton-koblingen er speciel for PAT1, da de fleste andre aminosyretransportører og andre transportører for neurotransmittere er koblet til natrium- eller chloridioner.

I Caco-2 celler (en cellekultur af tarmceller) er det vist, at gaboxadol binder til og transporteres af PAT1. Transporten af gaboxadol hen over tarmcellerne er blevet karakteriseret grundigt for at bevise translokationen/overflytningen via PAT1 og for at undersøge, om der var andre aminosyretransportører involveret i absorptionen af gaboxadol. Det viste sig, at uden en tilstedeværende proton-gradient over cellelaget var der næsten ingen gaboxadol-transport – og netop denne proton-kobling peger på, at gaboxadol hovedsagelig bliver transporteret via PAT1.

Plasmakoncentration af gaboxadol

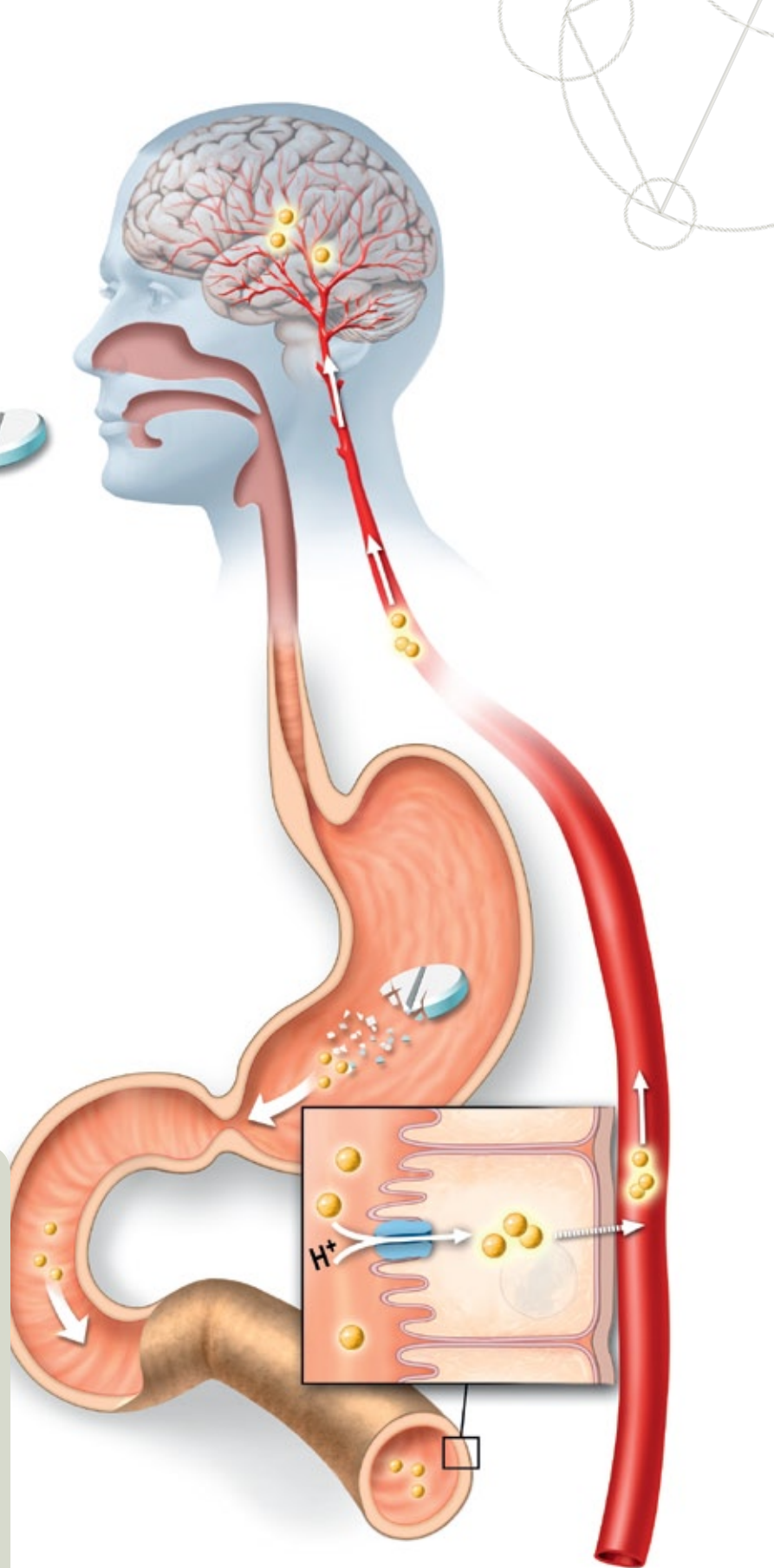
Når lægemiddelstoffer som gaboxadol er kommet over epithellets første cellemembran (se ill. side 23) og ind i tarmcellerne, er det næste trin at komme over den bagerste cellemembran og over i blodbanen. Derefter bliver lægemiddelstoffet fordelt i kroppen. Man ved endnu ikke, hvordan gaboxadol kommer over den næste cellemembran, for PAT1 sidder kun på den luminale side af cellerne. Men det kan tænkes, at det sker via en anden aminosyretransportør. Når gaboxadol bliver absorberet og findes i blodet, er det forholdsvis let at måle, hvordan mængden af lægemiddelstoffet i blodet ændrer sig med tiden. Man kan tage blodprøver, analysere dem og derefter tegne en plasmakoncentrationsprofil. Den sorte kurve i diagrammet på side 24 viser plasmakoncentrationsprofilen af gaboxadol i hunde. Hundene har fået 2.5 mg/kg gaboxadol som en oral opløsning, og derefter tager man blodprøver fra hundene gennem 6 timer. Med en plasmakoncentrationsprofil kan man følge gaboxadolkoncentrationens fordeling i hundens kredsløb.



Strukturen af GABA, gaboxadol og L-tryptofan.

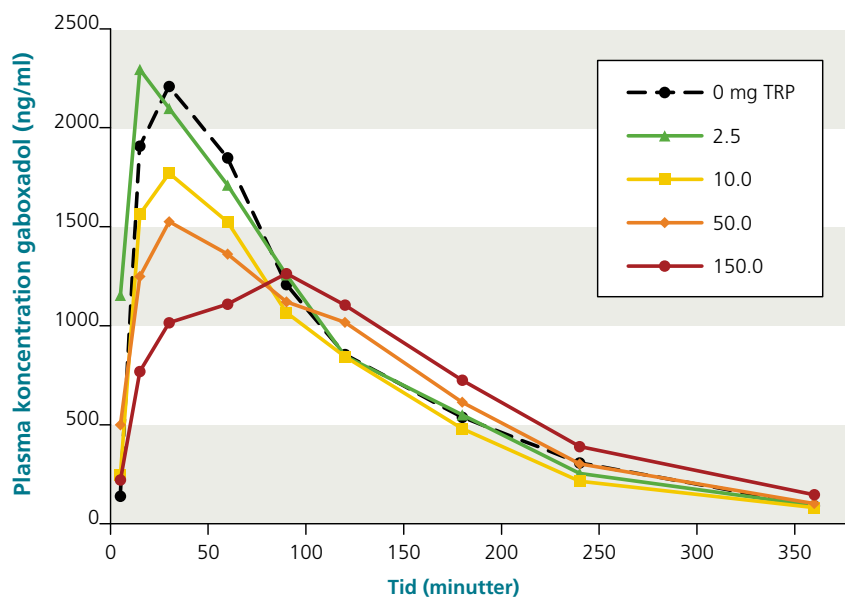
GABA-TRANSPORTØRER SIDDER IKKE KUN I CNS

I hjernens neuroner og gliaceller sidder nogle membrantransportører, der sørger for at regulere mængden af neurotransmitteren GABA i synapseløften mellem nervecellerne. Den frie mængde GABA er vigtig for kommunikation mellem nerveceller og er med til at styre hjernens funktion. Der er forsket meget i disse humane GABA-transportører (GAT), som hedder GAT-1, GAT-2, GAT-3 og BGT-1. De forekommer hovedsagelig i CNS, og derfor tænker man ofte på GABA-transportører som værende GAT-1-3 og BGT-1. Selvom den proton-koblede aminosyretransportør PAT1 er af en anden familie, er PAT1 også en GABA-transportør. PAT1 er indtil videre bedst karakteriseret i tarmen hos mennesker, hunde og rotter, men det er påvist, at PAT1 også forekommer i CNS i neuroner. PAT1 kan vise sig at være vigtig for oral drug delivery af GABA-lignende lægemiddelstoffer, som vi har set det med gaboxadol.



Lægemiddelstoffet gaboxadol indtages gennem munden, bliver absorberet via aminosyretransportøren i tarmen, hvorefter det bliver ført via blodbanen til hjernen, hvor det skal udføre sin virkning. Figuren sætter fokus på den proton-koblede aminosyretransportør 1, PAT1, som medierer den intestinale absorption af gaboxadol.

Den gennemsnitlige plasmakoncentration af gaboxadol i hunde efter oral administration af 2.5 mg/kg gaboxadol (sort kurve). Plasmakoncentrationen af gaboxadol når hundene samtidig fik 2.5 mg/kg gaboxadol og 2.5-150 mg/kg L-tryptofan (TRP) (farvede kurver).



Absorption: når koncentrationen stiger i den første halve time efter indtag, er det fordi gaboxadol bliver absorberet.

Fordeling, absorption og elimination:

Når kurven topper, er det fordi lægemiddelstoffet bliver fordelt i kroppen på hunden, og den mængde, der fordeles og udskilles, er lig med den mængde, der absorberes.

Elimination: I den sidste del af plasmaprofilen regner man med, at alt gaboxadol er optaget, og nu ser man, at koncentrationen falder, fordi lægemiddelstoffet udskilles fra hunden. I både mennesker og hunde udskilles gaboxadol hovedsageligt som uomdannet stof via nyrerne.

PAT1-inhibitoren L-tryptofan hæmmer absorptionen af gaboxadol

Ved at give hundene stigende mængder af aminosyren L-tryptofan samtidig med opløsningen af gaboxadol, ser man på plasmaprofilen, at absorptionen af gaboxadol ændres (de farvede kurver i ovenstående diagram). Grunden til, at absorptionen ændres, er, at gaboxadolen nu konkurrerer med L-tryptofan om at komme ind i cellerne gennem transportøren PAT1. Når koncentrationen af L-tryptofan i den orale opløsning stiger, binder tryptofanen sig i højere grad til PAT1-transportøren og mindsker derved transporten af gaboxadol. L-tryptofan kan dog ikke hindre absorptionen af gaboxadol gennem lang tid, fordi L-tryptofan selv bliver absorberet via andre aminosyretransportører og forsvinder fra tarmlumen. Absorptionen af Gaboxadol bliver altså forsinket. Absorptionen sker sandsynligvis langsommere og længere nede i tarmen pga. konkurrencen med L-tryptofan. Konklusionen fra forsøget er, at gaboxadol i hundene bliver absorberet via PAT1, og at der er en sammenhæng mellem det, der ses i cellekulturer, og det der ses i hundene. Fra forsøget i hunde ses det, at man kan ændre plasmakoncentrationsprofilen af gaboxadol markant ved samtidig at give en PAT1-hæmmer

– her L-tryptofan. På den måde kan man sandsynligvis slippe for eventuelle bivirkninger i forbindelse med høje plasmakoncentrationer af gaboxadol, hvorfor en forståelse af absorptionsmekanismen kan være til stor fordel for patienterne.

Gaboxadol skal fordeles til hjernen

Både neurotransmitteren GABA og gaboxadol kan blive absorberet fra tarmen til blodet via PAT1 i mennesker. Begge stoffer er agonister til GABA_A-receptorer, der findes i centralnervesystemet (CNS). GABA_A-receptorerne, er involveret i hæmmende signaler mellem neuronerne i hjernen. Derfor har gaboxadol været undersøgt som lægemiddelstof til behandling af bla. smerte, epilepsi og søvnløshed. Gaboxadol må altså passere den tætte blod-hjerne-barriere for at komme ind i hjernen, før det kan have en effekt. Det har længe været en gåde, hvordan lægemiddelstoffet blev transporteret hele vejen fra tarmen til hjernen. Nu har man løst en del af gåden; nemlig hvordan det kommer fra tarmen til blodet. Men hvordan gaboxadol kommer fra blodet over blod-hjerne-barrieren til hjernen, vides endnu ikke med sikkerhed.

Ph.d. Mie Larsen er adjunkt på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
 Ph.d. Rene Holm er afdelingsleder for Department of Preformulation, H. Lundbeck A/S
 Ph.d. Klaus G. Jensen er associate director for Drug ADME Research, H. Lundbeck A/S
 Ph.d. Birger Brodin er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
 Ph.d. Carsten Uhd Nielsen er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi



Nye analysemetoder viser lægemidlers fordeling i blodet

Lægemidler kan cirkulere frit i blodbanen eller binde sig til proteiner i blodet. Omfanget af proteinbindingen kan have stor betydning for både virkningen og bivirkningerne. Metalholdige lægemidler, som anvendes til kemoterapi, har stor affinitet for proteiner. Derfor udvikler vi nye højfølsomme analysemetoder, som kan bestemme mængden af frit og proteinbundet lægemiddel i blodet.

Af Charlotte Møller, Bente Gammelgaard, Helle Rüzsz Hansen og Stefan Stürup

Mange former for kræft behandles i dag med lægemidler, som indeholder grundstoffet platin. I Europa er der godkendt tre platinholdige lægemidler: cisplatin, carboplatin og oxaliplatin. Cisplatin er effektiv i behandlingen af fx testikelkræft, men der er mange andre kræftformer, for hvilke virkningen er begrænset, eller hvor patienten udvikler resistens under behandlingen. Hertil kommer, at kemoterapi har mange bivirkninger såsom nedsat immunforsvar, hårtab, kvalme, træthed og i nogle tilfælde nyreskader, nedsat hørelse og nervebeskadigelse. Derfor forskes der i udviklingen af nye lægemidler med bedre effekt og færre bivirkninger.

Kemoterapi

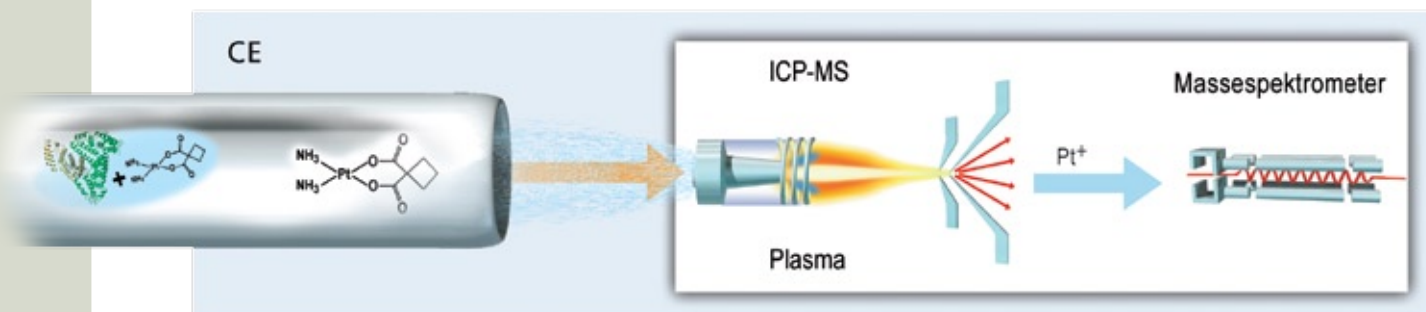
De fleste lægemidler, som anvendes til kemoterapi, indgives intravenøst, dvs. direkte i blodbanen. I blodet kan lægemidlet binde sig til proteiner, og mængden af frit lægemiddelstof kan dermed blive reduceret kraftigt. Konsekvensen af,

at det platinholdige lægemiddel binder til proteiner i blodet, er ukendt. På den ene side kan proteinbinding være en måde effektivt at transportere lægemidlet hen til kræftcellerne, men på den anden side kan bindingen til proteiner også hæmme optaget af lægemiddelstoffet i kræftcellerne. For at cisplatin kan udøve sin effekt, skal stoffet optages i kræftcellen og trænge ind i cellekernen, hvor cisplatin binder sig til DNA. Når det sker, bøjes DNA'et, hvilket hindrer replikation af cellen. Til sidst dør kræftcellen.

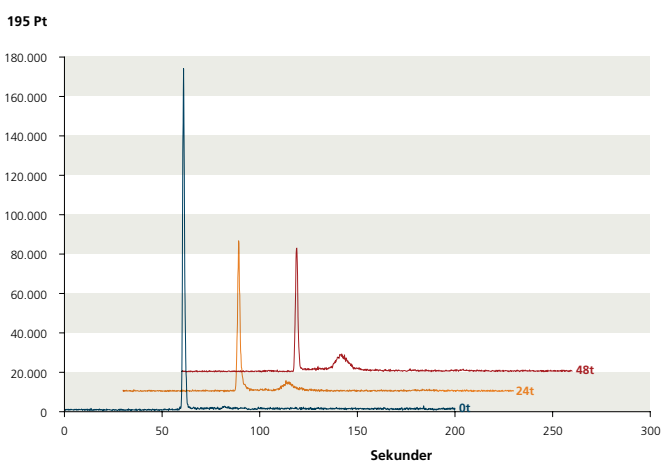
I udviklingen af nye lægemidler er det vigtigt at undersøge mængden af frit og proteinbundet lægemiddelstof. For at kunne bestemme dette, må man råde over analysemetoder, som kan separere det frie og det proteinbundne lægemiddelstof – selv i meget lave koncentrationer. Vi har udviklet en velegnet analysemetode, som kan adskille og derpå bestemme koncentrationen af det frie og det proteinbundne lægemiddelstof. Teknikken er baseret på kobling af separationsmetoden kapillarelektroforese (CE) og detektionsmetoden induktivt koblet plasma-massespektrometri (ICP-MS). Den koblede metode kaldes CE-ICP-MS.

Fordelen ved ICP-MS er, at man kan detektere lægemidler, som indeholder metaller i meget lave koncentrationer, end det er muligt at bestemme med UV-detektion. Følsomheden ved ICP-MS-detektion er typisk tusind gange bedre end ved UV-detektion. Det betyder, at man kan detektere platin i koncentrationer på helt ned til nanogram pr. milliliter. ICP-MS giver også mulighed for at analysere forskellige cellefraktioner, hvor koncentrationen af platin er meget lav og prøveluminet er begrænset.

CE-ICP-MS



Ved kapillarelektroforese (CE) adskilles frit lægemiddelstof, her carboplatin, fra proteinbundet lægemiddelstof. Efter adskillelsen sendes fraktionerne hver for sig ind i massespektrometret, hvor prøven atomiseres og ioniseres (ICP-MS). Ved at måle platinindholdet i de adskilte fraktioner, kan forholdet mellem bundet og frit lægemiddelstof bestemmes.



Elektroferogrammet viser separation af frit og proteinbundet carboplatin efter forskellige inkubationsperioder. Målinger efter forskellige inkubationsperioder kan bruges til at beregne hastighedskonstanten for bindingen af carboplatin til albumin.

Kapillarelektroforese (CE) er en separationsmetode, hvor en blanding af analytter adskilles på baggrund af deres ladning og størrelse. Det gøres ved at lægge en spænding på 10-30kV hen over et kapillar – et tyndt rør – hvori der er en buffer. Prøven injiceres i kapillaret, og de ladede analytter vil bevæge sig mod elektroden med den modsatte ladning. Små molekyler bevæger sig hurtigere end de større molekyler, da små ioner møder mindre friktion i bufferen. Neutrale molekyler påvirkes ikke af det elektriske felt, men trækkes med hen mod elektroden med det elektroosmotiske flow, som opstår på grund af ladningsforskellen mellem kapillaroverfladen og bufferen. Neutrale molekyler kan derfor ikke adskilles med denne form for CE. Kapillaret, som anvendes til CE har en indre diameter på 50µm, og med denne teknik kan man analysere et prøvevolumen på få nanoliter.

ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) er en detektionsmetode, hvor stofferne detekteres ud fra deres indhold af metaller. Prøven føres ind i et argonplasma, som er ca. 8000 °C varmt. Alt organisk materiale brændes af og efterlader kun metalioner. Ved analysen af fx carboplatin dannes der platinioner, som efterfølgende kan detekteres med massespektrometret.

CE-ICP-MS er en kobling af de to metoder. Ved kapillar elektroforese adskilles blandingen af stoffer, i dette tilfælde separeres det fri lægemiddel fra det proteinbundne lægemiddel. De adskilte stoffer føres videre til massespektrometret, hvor indholdet af platin bestemmes. Forløbet vises i et elektroferogram, hvor platinsignalet ses som funktion af tiden.

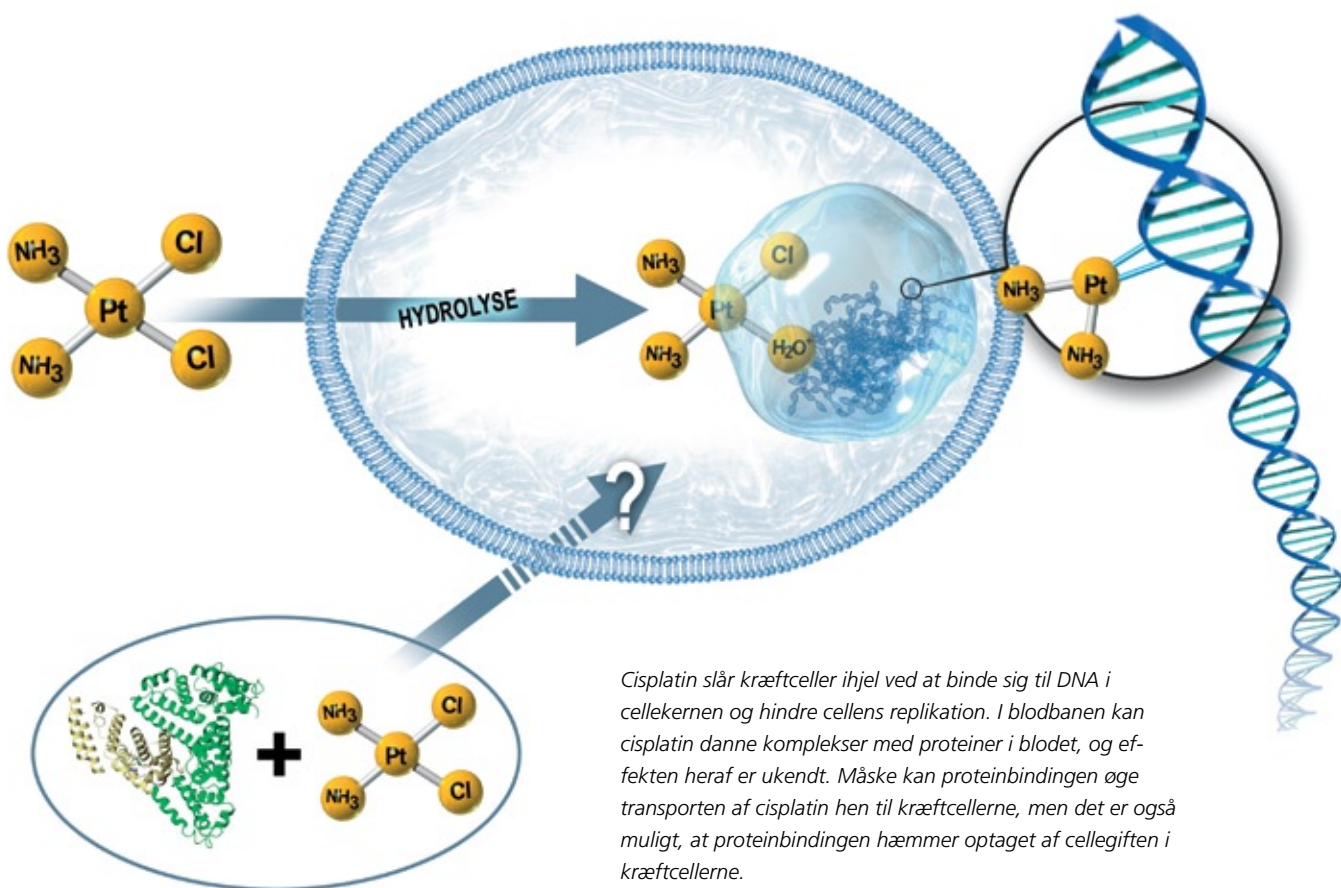
Måling af proteinbinding

Hastigheden, hvormed lægemidlet bindes til et protein, kan undersøges ved at inkubere cisplatin og proteinet ved 37 °C for at simulere fysiologiske betingelser. Efter forskellige inkubationsperioder, udtages der prøver, som analyseres. Dermed kan vi se, hvor meget frit cisplatin der er, samt hvor meget af stoffet, som er bundet til proteinet. Ved at anvende data fra alle inkubationsperioder kan vi beregne hastighedskonstanten for bindingen af cisplatin til proteinet.

CE-ICP-MS kan også bruges til analyse af platinholdige lægemidler i mere komplicerede systemer som blodplasma. Her viser vore undersøgelser, at carboplatin ikke i udstrakt grad bindes til proteiner eller andre stoffer i blodplasma. Carbo-

platin findes altså overvejende frit i blodplasmaet, og efter inkubation i 48 timer er 65 procent af den totale mængde carboplatin frit. Den resterende del er bundet til albumin, som er det hyppigst forekommende protein i blodet. Til sammenligning vil cisplatin hurtigt binde til albumin og allerede efter 6 timer er 85 procent af den totale mængde cisplatin bundet til albumin. Forskellen mellem de to lægemidler har betydning for deres omsætning og udskillelse af kroppen, og dermed for den dosis man kan give.

Der arbejdes konstant på at udvikle nye forbedrede lægemidler til behandlingen af kræft, men det er en lang og svær proces, og succesraten er lav. Gode og følsomme analysemetoder kan understøtte udviklingen af fremtidens lægemidler.



Cand.scient. Charlotte Møller er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Bente Gammelgaard er lektor ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Helle Rüzsz Hansen er lektor ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Stefan Stürup er lektor ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi



Elektrokemi til karakterisering og kvantitativ analyse af lægemiddelstoffer

Det er af afgørende betydning for at lægemiddelstoffer kan optages i kroppen, at de er egnede til at indgå i en formulering – fx en tablet. Lægemiddelstofoptagelse, fordelingen af lægemiddelstoffet i kroppen, nedbrydning og endelig udskillelse af kroppen kan forudsiges ud fra en række fysisk-kemiske parametre.

Af Henrik Jensen, Maria A. Deryabina, Steen Honoré Hansen og Jesper Østergaard

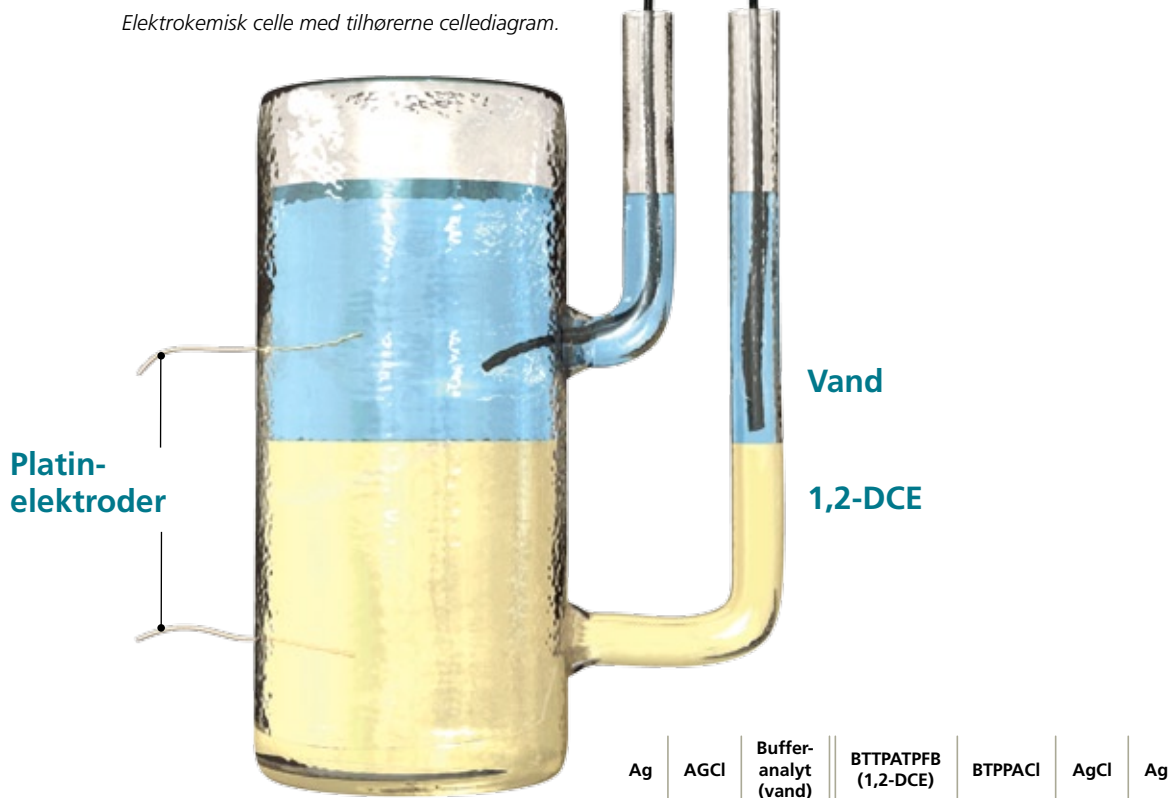
Igenem de seneste år har vi på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi udviklet nye metoder baseret på elektrokemi til fysisk-kemisk karakterisering af lægemiddelstoffer. Metoderne er specielt velegnede til at beskrive ladede lægemiddelstoffers fordeling ind i lipofile (fedtelskende) miljøer samt til studier af lægemiddelstoffernes vekselvirkninger med hhv. lipofile og hydrofile kompleksbindere. Undersøgelser viser også, hvordan en potentialforskel på dramatisk vis kan påvirke fordelingsforholdene. Endelig har vi været i stand til at miniaturisere metoden, så vi kan analysere ganske få mikroliter ($1 \text{ mikroliter} = 10^{-6} \text{ L}$) prøve. Det miniaturiserede format har også vist sig velegnet som en ekstremt følsom detekti-

onsteknik, idet vi har demonstreret detektion af stoffer i en koncentration på få nanomolær ($1 \text{ nanomolær} = 1 \text{ nM} = 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$).

To-fasesystem

Potentielle nye lægemiddelstoffer bliver i første omgang testet for deres evne til at binde til specifikke sygdomsrelaterede receptorer. Lægemiddelstofoptagelse, fordelingen af lægemiddelstoffet i kroppen, nedbrydning og endelig udskillelse er bl.a. bestemt af en række fysisk-kemiske parametre som fx opløselighed, pK_a -værdi, fordelingskoefficient ($\log P$) og kompleksbinding.

Fordelingskoefficienten kan bestemmes ved at se på fordelingen ved ligevægt af lægemiddelstoffet i et to-fasesystem bestående af en vandfase og en oliephase. Denne metode er velkendt og meget anvendt for neutrale stoffer, men for ladede lægemiddelstoffer er den problematisk. Det skyldes, at det ikke er muligt at ekstrahere enkelte ioner, da der altid vil være modioner tilstede for at sikre elektroneutralitet. Med den elektrokemiske teknik kan det imidlertid lade sig gøre, da vi med nøje udvalgte elektroder kan danne en kompenserende ladning og derved sikre elektroneutraliteten. I alt



anvendes 4 elektroder: to elektroder bruges til at etablere en spændingsforskel mellem de to faser, og to elektroder sikrer elektroneutralitet i hhv. vand- og oliefasen.

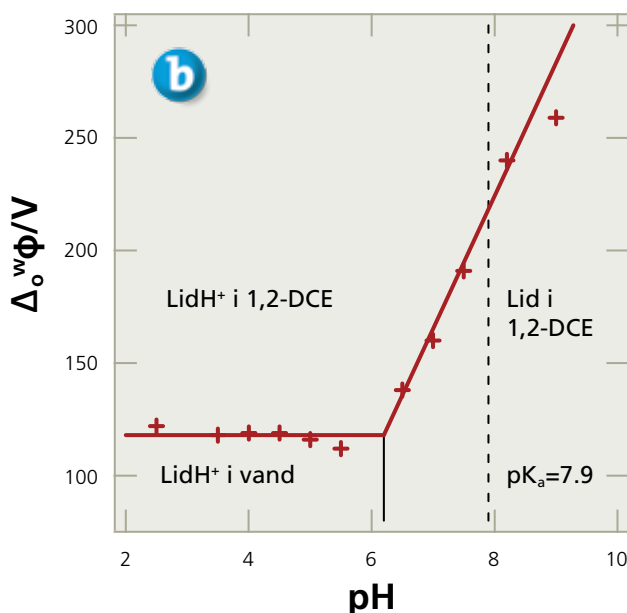
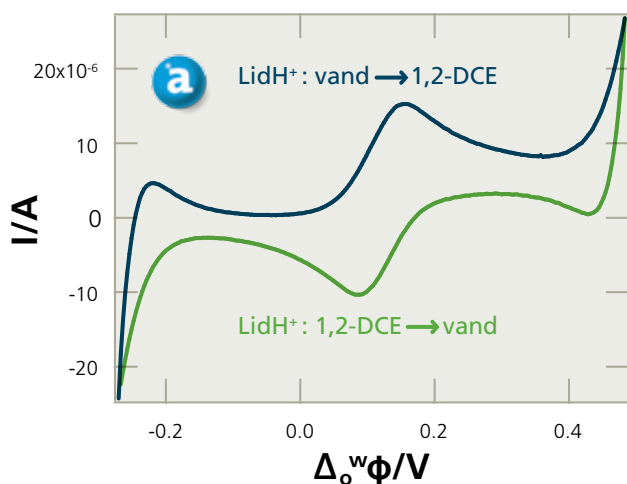
Cyklisk voltammetri

I vores eksperimenter består "oliefasen" af 1,2-dichlorethan (1,2-DCE). I et typisk eksperiment varieres spændingsforskellen lineært over tid, samtidig med at ionstrømmen måles. Først varieres signalet lineært i positiv retning, hvorefter potentialet varieres i negativ retning tilbage til udgangspotentialet. Denne type eksperimenter betegnes cyklisk voltammetri, og resultatet rapporteres i et cyklisk voltammogram som vist i figur a på side 30. Det cykliske voltammogram viser overførslen af lidokainkationen. Lidokain (svag base) er et lokalanalgetikum, hvor syreformen (i det følgende betegnet LidH⁺) har en pK_a-værdi på 7,9, dvs det fortrinsvist er positivt ladet ved pH 4,0. Ved lave potentialforskelle ses overførslen af negative ioner fra bufferopløsningen. I midten af potentialvinduet er der et signal stammende fra overførslen af LidH⁺ fra vand til 1,2-DCE. Ved høje potentialer ses signalet svarende til overførslen af bufferopløsningens positivt ladede ioner fra vand til 1,2-DCE. Når potentialet varieres lineært til-

bage til udgangspotentialet ses de samme transportprocesser, blot fra 1,2-DCE til vand. Overførselspotentialer for LidH⁺ beregnes som gennemsnittet af de to toppotentialer i midten af vinduet. Overførselspotentialer svarende til LidH⁺ er proportionalt med fordelingskoefficienten for LidH⁺ og indeholder ikke bidrag fra modioner, som det er tilfældet med andre teknikker.

Eksperimentet giver altså information om LidH⁺ fordelingskoefficienten. I eksperimentet er pH-værdien af vandfasen fastholdt på 4,0 med en eddikesyrebuffer. Øges pH til en værdi tæt på lidokains pK_a-værdi bliver fortolkningen af overførselspotentialerne lidt mere kompliceret. Nærmer pH sig 7,9 må der også tages hensyn til den uladede form af lidokain (den frie base) som bliver fordelt ind i 1,2-DCE fasen. I praksis betyder det, at det målte overførselspotential bliver afhængigt af pH i vandfasen.

I figur b er vist et såkaldt fordelingsdiagram, hvor overførselspotentialer er målt som funktion af pH i vandfasen. Ved lav pH er overførselspotentialer uafhængige af pH, men ved pH større end 6,1 stiger overførselspotentialer med pH. Ved meget høj pH ses der ikke noget signal, da lidokain er på den uladede Lid-form. Liniere i diagrammet viser, hvordan



Cyklisk voltammogram svarende til overførslen af LidH⁺ mellem vandig buffer og 1,2-DCE **a**.

Fordelingsdiagram for lidokain i vandig buffer / 1,2-DCE systemet. Hvert punkt svarer til et målt overførselspotential **b**.

lidokain fordeles i vand/1,2-DCE-systemet som funktion af pH og overførselspotentialer. For eksempel svarer det øverste venstre hjørne til betingelser, hvor Lidokain er protoneret og fordelt ind i oliefasen. Som det ses af fordelingsdiagrammet, kan en potentialforskel mellem de to faser altså på dramatisk vis påvirke fordelingsforholdene.

Når lægemiddelstoffer optages i kroppen skal de ofte passere membraner (fx cellemembraner), hvor der er betydelige potentialforskelle. Den elektrokemiske metode kan give et billede af, hvordan disse potentialforskelle kan påvirke fordelingen og dermed optagelsen af ladede lægemiddelstoffer i kroppen.

Lad os se på eksemplet LidH⁺ ved pH 4,0. Ved en potentialforskel på 120 mV er fordelingskoefficienten for LidH⁺ 1. Ved 0 mV er fordelingskoefficienten 0,01, mens den er 100 ved 240 mV! En relativt beskedne ændring i potentialforskellen mellem væsker kan altså have en meget kraftig påvirkning på fordelingen.

Kompleksbinding

Et andet fænomen, der har indvirkning på fordelingen, er kompleksbinding. Man kan både forestille sig en kompleksbinding af lægemiddelstoffet i den lipofile samt i den hydrofile fase. Cellemembraner og andre lipofile barrierer har i reglen en heterogen sammensætning, hvor specifikke vekselvirkninger (kompleksbinding) i membranen spiller en rolle for lægemiddelstoftransporten. Vi har anvendt den elektrokemiske teknik til at måle vekselvirkningen mellem kolesterol opløst i 1,2-DCE og en serie lægemiddelstoffer. Resultaterne viste bl.a., at fordelingen af LidH⁺ ind i 1,2-DCE øges i tilstedeværelse af kolesterol, mens fordelingen af Lid ikke påvirkes af kolesterol. På lignende vis har vi studeret, hvordan en kompleksbinder i vandfasen påvirker fordelingen.

Som eksempel på en vandopløselig kompleksbinder valgte vi α -cyclodextrin, som har en cyklisk struktur sammensat af 6 glukosemolekyler. Cyclodextriner anvendes bl.a. som tilsætningsstoffer i lægemidler. Deres særlige struktur betyder, at de kan kompleksbinde organiske molekyler; styrken af kompleksbindingen er bl.a. afhængig af molekylets størrelse. For α -cyclodextrin kunne vi også observere en effekt på lægemiddelstoffets fordeling og dermed få en ide om effekten af α -cyclodextrin som tilsætningsstof i lægemidler.

Der arbejdes i øjeblikket på at videreudvikle metoden, så den kan anvendes til særligt små prøvemængder og til detektion af ladede lægemiddelstoffer. Strømmen svarende til overførslen af et ladet lægemiddelstof er nemlig direkte proportional med koncentrationen af lægemiddelstoffet. Vi har været i stand til at kvantificere meget små koncentrationer af lægemiddelstof (nM), så metoden kan konkurrere med andre følsomme detektionsprincipper baseret på massespektrometri eller fluorescens.

Ph.d. Henrik Jensen er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi

Maria A. Deryabina er postdoc på Institut for Mikro- og Nanoteknologi, Danmarks Tekniske Universitet

Dr.pharm. Steen Honoré Hansen er professor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi

Ph.d. Jesper Østergaard er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi

GABA_A-receptoren:

Bedre modeller – bedre lægemidler

Nye, forbedrede modeller giver grundlag for syntese af nye lægemidler med mere specifik virkningsprofil.

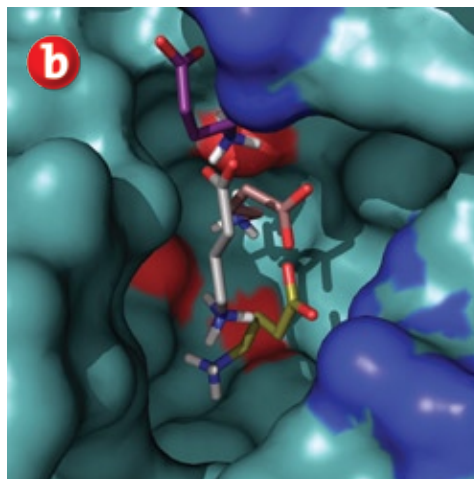
Af Bente Frølund, Tommy Sander, Henriette Hansen og Thomas Balle

Det optimale udgangspunkt for udvikling af lægemidler er et kendskab til den tredimensionelle struktur af målmolekylet og de nødvendige interaktioner mellem lægemiddelstoffet og målmolekylet, fx en receptor. For de målmolekyler, hvor den tredimensionelle struktur endnu ikke er kendt, er udviklingen af ligander endnu baseret på intuition og inspiration fra tidligere høstede erfaringer. GABA_A-receptoren har længe været en af disse.

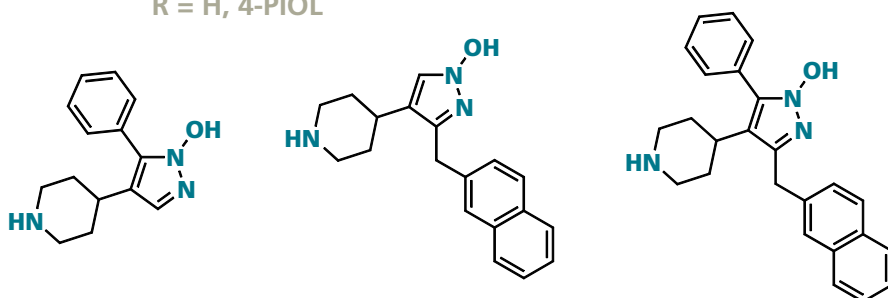
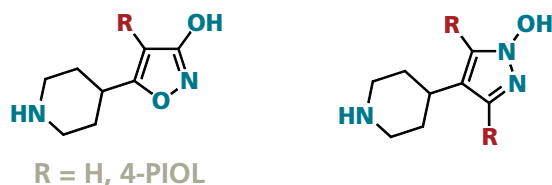
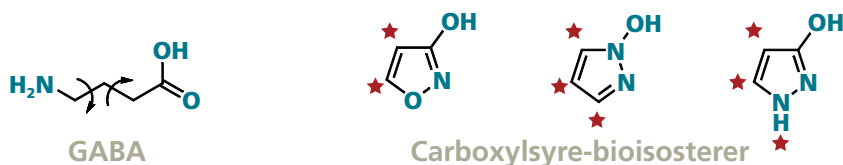
På Det Farmaceutiske Fakultet har vi i en årrække arbejdet med at udvikle ligander til GABA_A-receptoren. Arbejdet har ført til syntese og karakterisering af et stort antal stoffer for at opnå et tilstrækkeligt klart billede af sammenhængen mellem stoffernes struktur og biologiske virkning. Dette arbejde har ført til ny indsigt i opbygningen af receptorlommen og interaktionen mellem ligand og receptor.

GABA_A-receptorer

GABA (γ-aminosmørsyre) er hjernens overordnede hæmmende signalstof, som dæmper aktiviteten af nervecellerne. Størstedelen af hjernens nerveceller indeholder receptorer for GABA, hvilket giver mange muligheder for at gribe ind med medicin ved defekte signalprocesser. GABA_A-receptorerne har været anvendt som terapeutisk mål i mange år til behandling af bl.a. angst, smerte, søvnløshed og krampes. Desværre er brugen af mange af de lægemidler, der er rettet mod GABA_A-receptorerne forbundet med uønskede bivirkninger som sløvhed, afhængighed og tolerance. Derfor er der brug for en øget indsigt i opbygning og funktion af denne receptorgruppe i udviklingen af nye og bedre lægemidler. GABA_A-receptorerne tilhører en større familie af strukturelt og funktionelt beslægtede receptorer kaldet ligandstyrkede ionkanaler. GABA_A-receptorerne er opbygget af fem enheder, som danner en kanal, der er gennemtrængelig for kloridioner. Når GABA binder til et specifikt bindingssted på receptoren, åbnes ionkanalen, og kloridioner strømmer ind i cellen. Indstrømningen af kloridioner bevirker, at det bliver sværere at aktivere nervecellen, og kommunikationen



- a** Overordnet struktur af to af de fem enheder, der udgør receptoren. Tilsammen danner de bindingslommen for GABA (atomer vist med van der Waals radier). Nogle af de aminosyrer, man fra mutationsstudier ved er placeret i bindingslommen, er fremhævet med turkis kulstofatomer.
- b** Close-up af bindingslommen (her vist som turkis van der Waals overflade) med fire forskellige placeringer/orienteringer af det lille og fleksible GABA-molekyle. Røde og blå overflader markerer udvalgte oxygen- og nitrogenatomer i receptoren, der alle er mulige interaktionspartnere for GABA.



Øverst ses strukturen af GABA, hvor pilene viser de bindinger, der kan drejes. Tre carboxylsyre-bioisoster-byggeblokke anvendt i dette studie er vist til højre herfor. De røde stjerner angiver positioner, der kan udbygges kemisk. I midten ses 4-PIOL samt analoger heraf baseret på de to af byggeblokkene, med en generel angivelse af indførte kemiske grupper (R). Nederst er vist eksempler på forbindelser, som har vist sig at binde stærkt til GABA_A-receptoren.

FASTLÅSTE BYGGEBLOKKE SOM CARBOXYLSYRE-BIOISOSTERER

Da vi ved, at en carboxylsyrefunktion er nødvendig, for at en ligand kan binde til GABA_A-receptoren, har vi fokuseret på byggeblokke med samme funktion som carboxylsyren i GABA, også kaldet carboxylsyre-bioisosterer. Disse byggeblokke har en mere fastlåst struktur end GABA, hvilket betyder at der er færre muligheder for forskellige konformationer af molekylet (se ill.). Desuden indeholder byggeblokkene positioner, hvor man nemt kan udbygge strukturen kemisk. Den nedsatte flexibilitet og muligheder for kemisk udbygning giver samlet set basis for at finde frem til en sandsynlig placering af forbindelserne og en karakterisering af bindingslommen i veldefinerede områder.

Med GABA_A-receptorliganden 4-PIOL som grundstruktur har vi fremstillet en række forbindelser baseret på disse byggeblokke og indført kemiske grupper med forskellig størrelse og elektroniske egenskaber i de tilgængelige positioner som vist ovenfor. Den biologiske karakterisering af disse forbindelser har vist, at stofferne binder til receptoren, hvilket betyder, at der i nærheden af bindingslommen for GABA i flere områder er forholdsvis meget plads. De biologiske resultater viser desuden, at forbindelserne ikke som GABA aktiverer, men derimod blokerer receptoren.

mellem nervecellerne hæmmes. Der findes flere forskellige undertyper af GABA_A-receptorer med specifik funktion og placering i hjernen. Det betyder, at man har mulighed for at ramme en enkelt undergruppe og derved opnå en mere selektiv effekt, men også at studier af receptorgruppen bliver mere komplekse.

Modeller for GABA_A-receptoren på vej

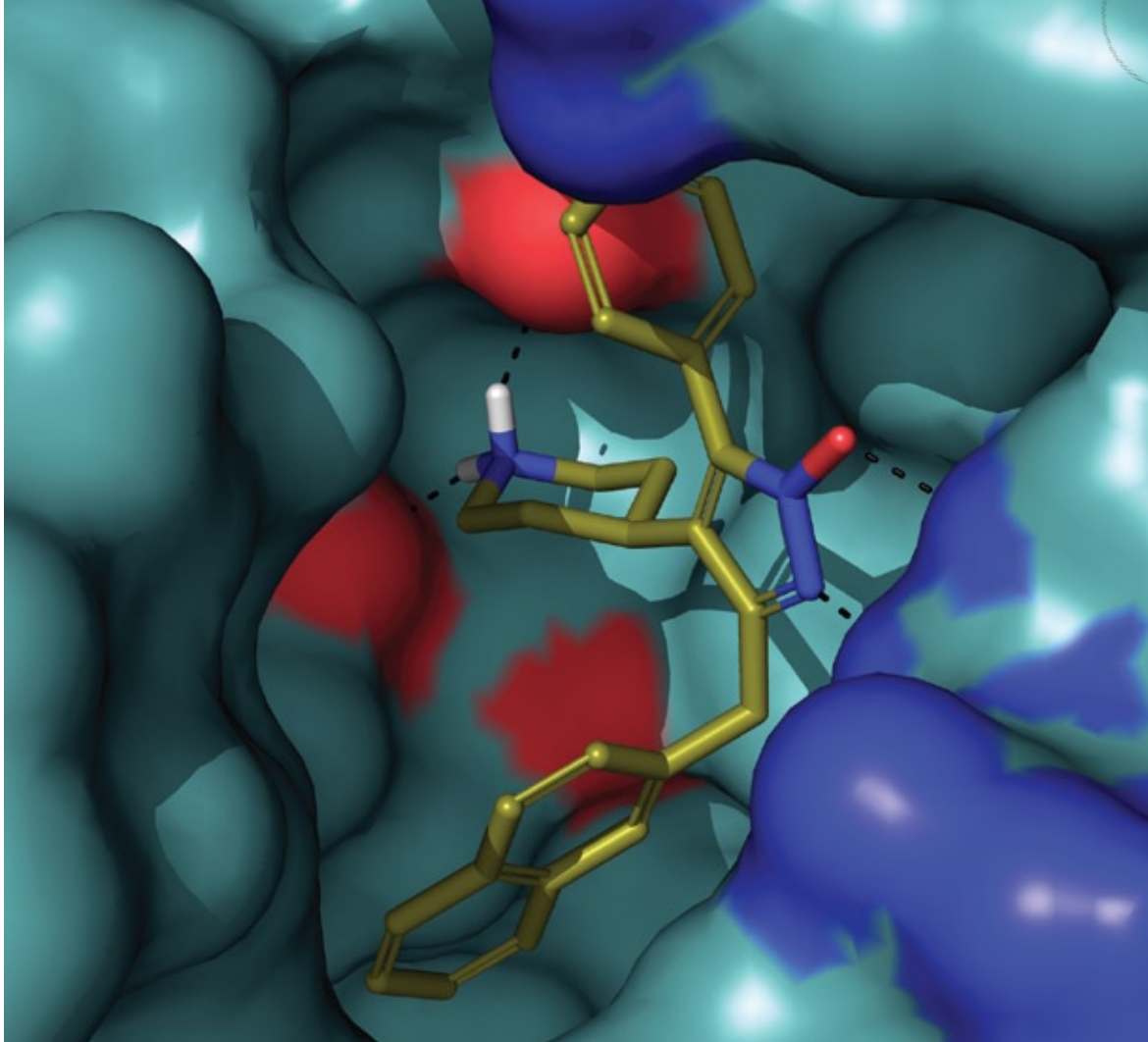
Vi har i dag en god idé om den overordnede struktur af GABA_A-receptoren, men den tredimensionelle struktur af receptoren med detaljerede strukturelle informationer er endnu ikke fundet. I stedet anvendes en model, der primært er baseret på en røntgenstruktur af et protein isoleret fra en snegl. Proteinet har essentielle ligheder med den del af GABA_A-receptoren, der binder GABA. Ved at kombinere aminosyresekvensen af GABA_A-receptoren og den eksperimentelle tredimensionelle struktur af proteinet er en model af GABA_A-receptoren foreslået. Da den samlede aminosyresekvenslighed mellem det isolerede protein fra sneglen og GABA_A-receptoren er forholdsvis lav, er modellen forbundet med en vis usikkerhed og en lav detaljeringsgrad.

Modellen er desuden kun en overordnet model og dækker ikke den mangfoldighed af undergrupper af GABA_A-receptorer, der adskiller sig fra hinanden med små forskelle i struktur og funktion.

For at få indsigt i hvad der kræves af en ligand for at opnå binding til GABA_A-receptoren, har man indlejret strukturen af GABA i denne præliminære model. Da GABA er et lille og meget fleksibelt molekyle, har det været svært at finde en entydig placering af molekylet i den forholdsvis store lomme, der ved hjælp af mutationsstudier er defineret som bindingsstedet for GABA_A-ligander (se ill. side 31).

Placering af liganderne i bindingslommen

De nye ufleksible forbindelser (se tekstboks ovenfor) har været en stor hjælp i udviklingen af en ny og forbedret receptormodel. Den store gruppe, der er koblet på 4-PIOL strukturskelettet, kan nærmest kun placeres på én måde i modellen, baseret på at aminen og carboxylsyre-bioisosteren, henholdsvis positiv og negativ ladet ved fysiologisk pH, samtidig skal kunne interagere med komplementære ladninger i bindingslommen. På side 33 er det illustreret, hvordan en



Forbindelsen, der er vist nederst til højre på illustrationen side 32, er her indlejret til 3D-modellen af GABA_A-receptorbindingslommen. De aromatiske substituent er med til at definere, hvordan liganden formentlig skal orienteres, idet de skal placeres i hver sin hydrofobe lomme. Dermed opnås samtidig optimale interaktioner (stiplede linjer) mellem, på den ene side, ligandens positivt ladede aminogruppe og elektronrige glutaminsyre- og carbonylgrupper i receptoren (rød overflade), og på den anden side mellem carboxylsyre-bioisosteren og en af de positivt ladede arginin sidekæder (blå overflade).

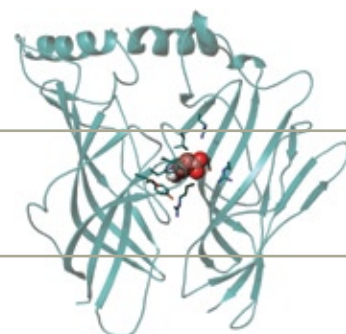
af liganderne passer optimalt ind i receptorlommen. Baseret på modellen er det lykkedes at designe og efterfølgende syntetisere en ny forbindelse som binder 410 gange bedre end udgangspunktet – et meget tilfredsstillende resultat som også er med til at validere modellen.

Da man kun har en model for den del af receptoren, der binder GABA, og ikke en model for hele receptoren, er det stadig uklart, hvilke faktorer der er ansvarlige for receptoraktivering, efter at liganden har bundet sig til receptoren. Man mener dog, at en rotation af en del af receptoren er en del af aktiveringsprocessen. I receptormodellen medfører placeringen af vore modelstoffer, at de store aromatiske grupper, der er indført i molekylerne, bliver placeret i et område af bindingslommen, som er involveret i den foreslåede rotation og derved fungerer som en kile i aktiveringsprocessen. Dette

kunne være en forklaring på den hæmmende effekt, forbindelserne har på GABA_A-receptorerne.

Hvad kan det så bruges til?

Den nye forbedrede receptormodel har indtil videre kunnet forklare de forskelle, der er observeret i bindingsaffinitet for forskellige GABA_A-hæmmere, og vi er så småt ved at bevæge os i retning af at studere stoffer, der aktiverer receptoren. Målet er at kunne forklare forskellene mellem stoffer, der binder til receptoren, og stoffer der både binder og aktiverer. Samtidig vil vi også gerne rationelt kunne designe stoffer, der kun binder til en enkelt af de ca. 20 forskellige undergrupper af GABA_A-receptoren, hvoraf mange spiller en helt specifik rolle i hjernen.



Ph.d. Bente Frølund er lektor på Institut for Medicinalkemi
 Cand.pharm. Tommy Sander er ph.d.-studerende på Institut for Medicinalkemi
 Ph.d. Henriette Hansen ansat på H. Lundbeck A/S
 Ph.d. Thomas Balle er lektor på Institut for Medicinalkemi



Ind i hjernen med nye stoffer

En ny gruppe af stoffer, NHP5G, er designet og fremstillet på Det Farmaceutiske Fakultet. De aktiverer selektivt en gruppe af receptorer kaldet NMDA-receptorer. NHP5G-stofferne kan give os vigtig information om denne receptorgrubes betydning i hjernen.

Af Rasmus Prætorius Clausen, Simon Dalsgaard Nielsen, Jesper Kristensen og Kasper Bø Hansen

Vi ved, at NMDA-receptorerne spiller en stor rolle for indlæring og hukommelse, men de menes også at være involveret i psykotiske lidelser som skizofreni og i de såkaldte neuro-degenerative hjernesygdomme såsom multipel sclerose og Parkinsonisme. NHP5G-stofferne kan derfor bane vejen til nye måder at behandle disse og beslægtede lidelser.

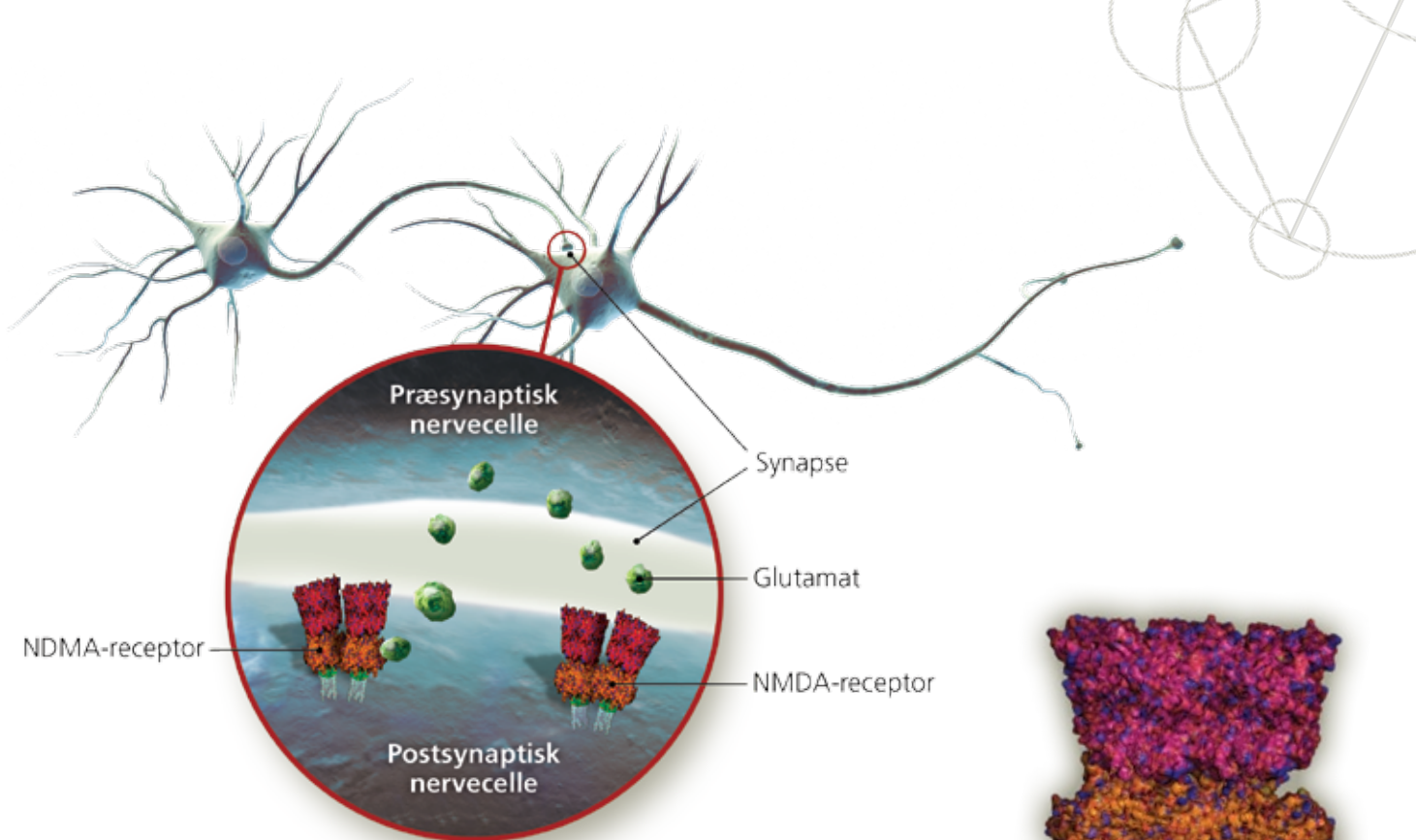
I psykotiske lidelser som skizofreni er der meget, der tyder på, at NMDA-receptorerne er centralt involveret. NMDA-receptorer genkender det signalstof i hjernen, der hedder glutamat. Glutamat kendes også som smagsforstærkeren det tredje krydderi eller *umami* (umami er betegnelsen for det femte smagelement – de øvrige er de gamle kendinge: sødt, salt, surt og bittert), fordi det aktiverer glutamatreceptorer på tungen.

Glutamat aktiverer også glutamatreceptorer i hjernen, og det er i det hele taget det mest udbredte signalstof i hjernen. De receptorer i hjernen, der genkender glutamat, er derfor meget vigtige for mange af centralnervesystemets funktioner og dermed også involveret i en række hjernelidelser.

Selektiv påvirkning af subtyper med nye stoffer

Der har gennem flere årtier foregået intens forskning i at udvikle nye kemiske stoffer, der påvirker glutamatreceptorer i hjernen, og det er nu lykkedes en forskningsgruppe på Det Farmaceutiske Fakultet at udvikle de første stoffer, der selektivt kan påvirke subtyper af NMDA-receptorer. Disse stoffer vil være vigtige redskaber til at klarlægge, hvilken rolle forskellige subtyper af NMDA-receptorer spiller i hjernen.

Der findes fire forskellige under typer af NMDA-receptorer kaldet NR2A, NR2B, NR2C og NR2D. Bortset fra en række antagonist, som selektivt rammer NR2B, aktiverer eller blokerer de stoffer, som findes i dag, generelt alle fire under typer. Det udgør et problem, da receptorerne ikke kun spiller en rolle i forbindelse med hjernelidelser, men også i normale funktioner som hukommelse og indlæring. Derfor ses en række bivirkninger ved benyttelse af disse uselektive stoffer. Man ved ikke, hvilke af de fire under typer der er involveret



Nervoceller kommunikerer ved hjælp af kemiske signalstoffer i forbindelsespunkter, der kaldes synapser. Glutamat er det mest udbredte signalstof i hjernen. Dette kemiske stof frigives fra en nervecelle (præsynaptisk nervecelle) og genkendes af receptorer på overfladen af en anden nervecelle (postsynaptisk nervecelle). Derved aktiveres den anden nervecelle. Der findes flere forskellige grupper af glutamatreceptorer. På illustrationen ses NMDA-receptorer.

NMDA-receptorens rumlige struktur, som man mener den ser ud. Den grønne del sidder i cellemembranen mens resten sidder udenfor. Den orange del genkender glutamat og aktiverer dermed receptoren.

Den øverste røde del kender man endnu ikke helt funktionen af. Gruppen af NMDA-receptorer findes i forskellige klonede udgaver, der kaldes NR2A, NR2B, NR2C og NR2D, som også har samme rumlige opbygning men indbyrdes varierende overflader. De aktiveres alle af NMDA, men NHP5G-stofferne er i stand til at kende forskel på disse undertyper og aktivere dem forskelligt.

i sygdommene, da man hidtil ikke har haft kemiske stoffer, der selektivt kan blokere eller aktivere en enkelt undertype – bortset fra NR2B. Det har derfor ikke været muligt at undersøge de enkelte undertypers bidrag i forbindelse med sygdomme eller normale funktioner.

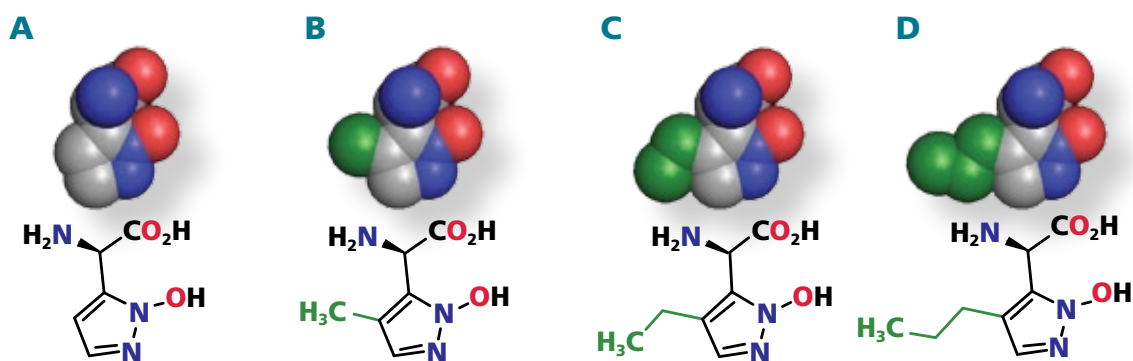
Men med den nyudviklede gruppe NHP5G-stoffer, er det nu muligt at gå målrettet efter de enkelte subtyper.

Docking til design af stoffer

En tredimensionel struktur af receptorproteinet med glutamat i bindingslommen har været til rådighed i flere år. Ved hjælp computerberegninger kan man docke det nye stof ind i stedet for glutamat (dvs. placere det nye stof i en model i stedet for glutamat). På den måde kan man få en idé om, hvordan stoffet vil blive genkendt af receptoren, og hvor det kan være gunstigt at bygge videre på stoffet.

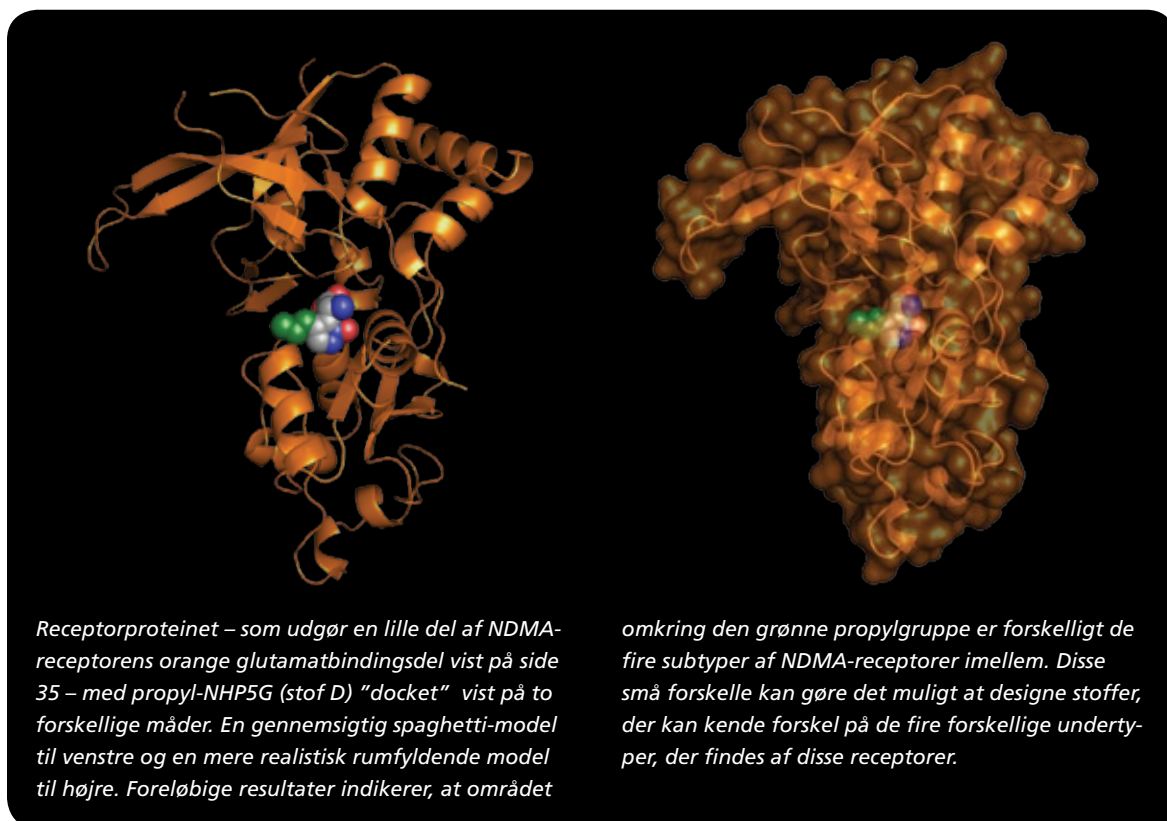
På side 34 er vist stof D docket i en af NMDA-receptorundertyperne. Receptorproteinet er vist på to måder. Dels som en gennemsigtig "spaghetti"-model til venstre og dels som en mere retvisende udfyldt model til højre. Her ses, at den

grønne kæde med tre kulstofatomer, en såkaldt propylkæde, er på vej ud af bindingslommen. Mange af områderne i proteinet er ens i de fire undertyper, men der er også områder, der ikke er ens. Og netop området omkring den grønne propylkæde varierer mellem de forskellige undertyper. At det kan udnyttes til at designe stoffer, der kan differentiere undertyperne af NMDA-receptorer, er demonstreret af forskelle mellem de fire stoffer vist øverst side 36 (se figurteksten). Således er stoffet uden kulstofkæde i stand til at aktivere alle fire undertyper lige meget, mens stoffet med propylkæden aktiverer de fire undertyper meget forskelligt og er faktisk ikke i stand til at aktivere en af undertyperne. Vi planlægger at udvide denne serie af stoffer. Således vil vi i fremtiden prøve at sætte mange andre "grønne" grupper på. Målet er at udvikle stoffer, der er i stand til at aktivere eller blokere en enkelt undertype. Vi bruger docking til at hjælpe os med at designe sådanne stoffer, men det er først, når de er syntetiseret og afprøvet på receptorerne i laboratoriet, at vi ved, om det, vi designer virtuelt på computeren, også fungerer efter hensigten i virkeligheden.



Fire NHP5G-analoger både som kemisk formel og i deres rumlige 3D-struktur. De fire stoffer adskiller sig fra hinanden ved at have kulstofkæder af forskellig længde på den femkantede pyrazolring. På figuren er kulstof farvet grøn, ilt rød og kvælstof blå. Kulstof, der bygges på den femleddede pyrazolring, er angivet med grøn. NHP5G uden grønne atomer (stof A) viser sig at aktivere alle fire under typer af NMDA-receptorer lige meget (ca. 50%).

Men når der sættes et eller to kulstofatomer på (stof B og C), er der stor forskel på, hvor meget de enkelte under typer aktiveres. Med tilføjelse af tre kulstofatomer har man et stof, der ikke aktiverer NR2A, men stadig kan aktivere NR2D ca. 37%. Det er første gang man ser store forskelle i graden af aktivering af forskellige NMDA-receptor under typer, og det er perspektivrigt i håbet om at kunne udvikle selektive stoffer.



Ph.d. Rasmus Prætorius Clausen er lektor på Institut for Medicinal kemi
 Ph.d. Simon Dalsgaard Nielsen er postdoc på Institut for Medicinal kemi
 Ph.d. Jesper Kristensen er lektor på Institut for Medicinal kemi
 Ph.d. Kasper Bø Hansen er postdoc på Institut for Medicinal kemi



Peptider

som vaccine mod sclerose

Multipel sklerose er en kronisk sygdom, hvor nervecellerne gradvist ødelægges. Immunisering af mus med små peptider, kan få musen til at danne antistoffer, som kan blokere for immunforsvarets aggressive T-celler. På sigt er der håb om, at en sådan vaccinstrategi vil kunne være med til at standse sygdommen i mennesker.

Af Rebekka Dam-Tuxen og Erik Riise

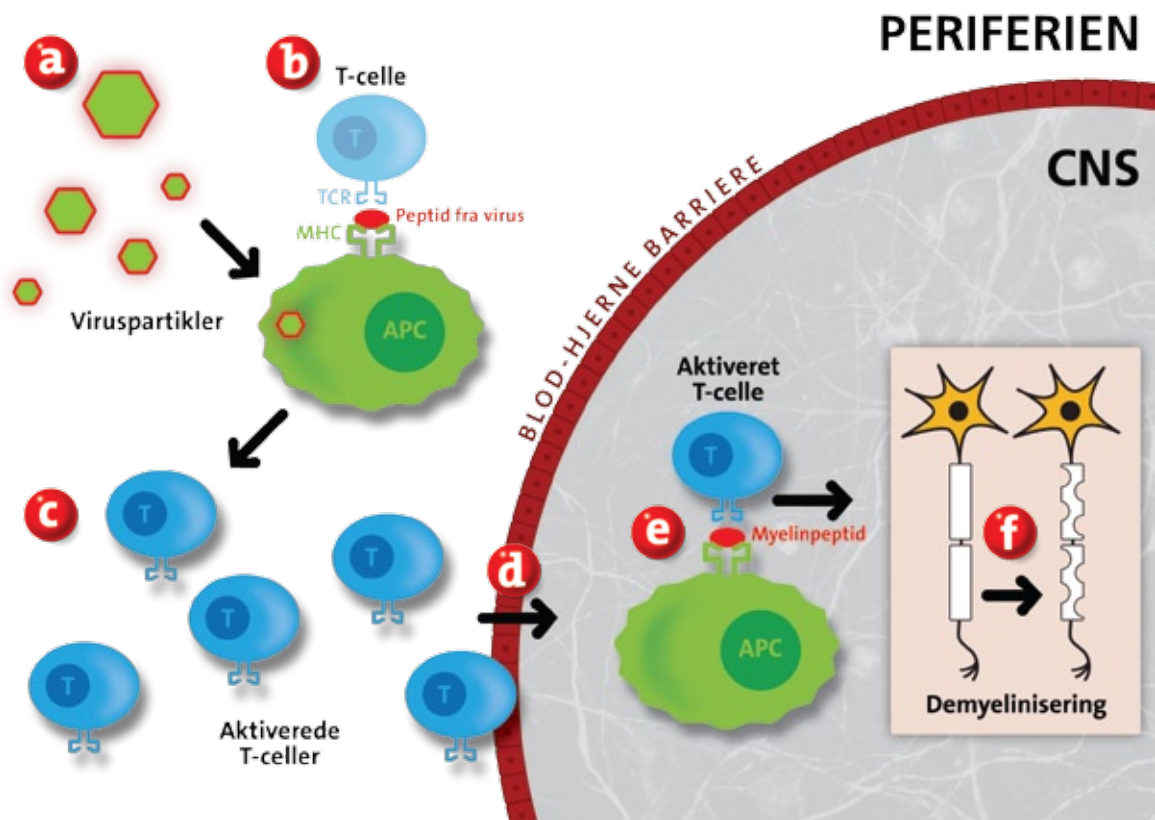
Multipel sklerose (MS) er en kronisk sygdom, hvor nervecellerne i centralnervesystemet gradvist ødelægges. Den rammer hyppigst unge mennesker i alderen 20-40 år og rammer dobbelt så mange kvinder som mænd. I Danmark er der ca. 7000 MS-patienter og hvert år kommer ca. 300 nye til. Sygdommen menes at være autoimmun – dvs. at det er kroppens eget immunforsvar, der angriber nervecellerne og beskadiger dem. Det giver anledning til symptomer så som træthed, svækkelse af muskler, lammelser, vandladningsbesvær, talebesvær, problemer med synet og balanceevnen. Sygdommen udvikler sig meget forskelligt fra person til person, og symptomerne varierer alt efter hvilke nerver, der beskadiges. Som oftest udvikler sygdommen sig gennem serier af anfald, hvor patientens tilstand forværres, og symptomerne øges. Mellem anfald kan der være perioder,

hvor patienten er i bedring, indtil næste anfald kommer med værre symptomer end ved det foregående tilfælde. Der stilles heldigvis til stadighed bedre behandlingsmuligheder til rådighed, men det er endnu ikke muligt at kurere sygdommen – kun at mindske forværringen og behandle de symptomer, der opstår.

Immunforsvaret angriber nerverne

Den præcise årsag til, at nogle mennesker udvikler sklerose, kendes endnu ikke, men man mener, at det både skyldes genetiske og miljømæssige faktorer. De genetiske faktorer, hvor man indtil videre har fundet den største tilknytning til MS, er vævstypemolekyler kaldet MHC II-komplekser. De sidder på overfladen af nogle af immunforsvarets celler og hjælper til med at fortælle kroppen, om den har en infektion eller ej. Det gør de ved at fremvise stumper af proteiner, kaldet peptider, fra os selv eller fra fremmede organismer så som bakterier og vira. Disse peptider sidder i MHC II-komplekset og genkendes af en anden gruppe af immunforsvarets celler, der kaldes T-celler.

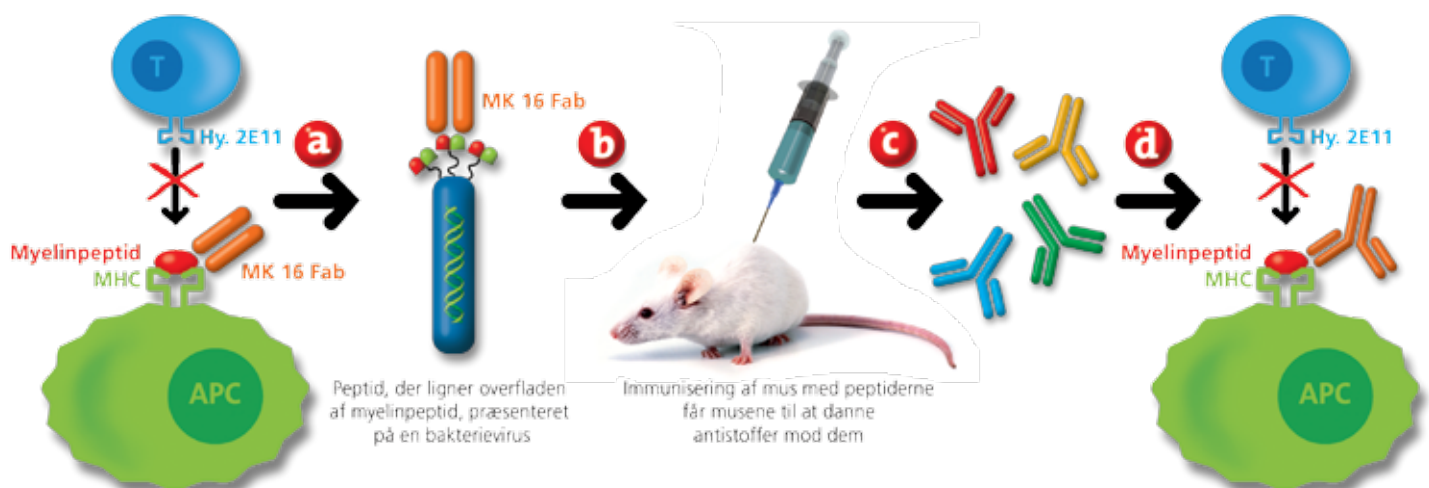
T-cellernes opgave er at fortælle resten af immunforsvaret, hvorvidt peptiderne stammer fra os selv eller fra en fremmed organisme, der har inficeret os. Hvis T-cellerne genkender peptidet som værende fremmed, sætter de immunforsva-



Mulig mekanisme for udviklingen af multipel sklerose:

a Et virus bliver under en virusinfektion optaget af immunforsvarets antigenpræsenterende celler (APC) og peptidstykker fra virusproteiner bliver præsenteret sammen med MHC II-komplekser. **b** En T-celle genkender viruspeptiderne i MHC-komplekserne som fremmede, den bliver aktiveret og sætter et immunrespons imod virus i gang. **c** Den aktiverede T-celle deler sig og **d** de aktiverede T-celler kan krydse

blod-hjerne-barrieren og komme ind i centralnervesystemet. **e** Inde i centralnervesystemet møder den aktiverede T-celle en anden antigenpræsenterende celle, der viser peptider fra myelinnet omkring nervecellerne frem i sine MHC-komplekser. Disse peptider ligner viruspeptiderne, og de aktiverede T-celler genkender dem derfor som "fremmede" og **f** sætter et immunrespons i gang mod myelinnet, hvilket fører til skader på nervecellerne.



Strategi bag vores immuniseringsforsøg: **a** Vi har udviklet et antistof (MK16), der genkender myelinpeptidkomplekset med et peptid fra myelin og blokerer for T-cellens genkendelse af samme kompleks. **b** Vi har isoleret 3 peptider, der genkender dette antistof, og brugt dem til at immunisere mus.

c Vi formoder, at musen vil danne antistoffer mod peptiderne, og **d** at disse antistoffer vil binde samme sted på MHC-peptidkomplekset som både MK16 og T-cellerne og derfor også blokere for de aktiverede T-celler.

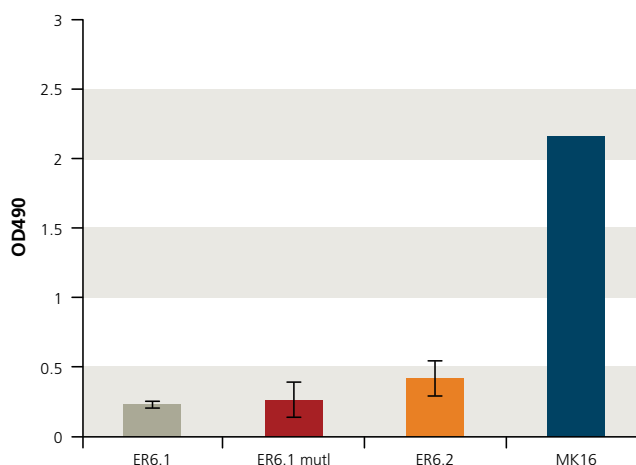
ret i gang med at bekæmpe den invaderende bakterie eller virus. Imidlertid hænder det, at T-cellerne ser et peptid fra egen organisme og fejlagtigt tror, at der er tale om fremmed indtrængen. Sker det, vil T-cellen forsøge at fjerne denne "fremmede" organisme og derved starte et angreb på egne rækker. I MS går cellerne til angreb på det myelin, der ligger beskyttende rundt om nervecellerne og hjælper dem med at sende impulser over lange afstande.

Man har hos sklerosepatienter fundet sådanne peptider fra myelin omkring nervecellerne præsenteret i et MHC II-kompleks – kaldet DR2-komplekset. Derudover har man også fundet T-celler, der reagerer på DR2-komplekset med peptider fra myelin. Disse T-celler kan også findes i blodet hos raske mennesker, men da er de ikke aktiverede og giver derfor ikke anledning til sklerose. Hos sklerosepatienterne er de aktiverede, og kan derfor give anledning til at immunforsvaret forsøger at nedbryde myelin rundt om nervecellerne. Vi ved ikke med sikkerhed, hvorfor T-cellerne hos sklerosepatienterne er aktiverede, men det er muligt, at det skyldes en tidligere infektion. Nogle af disse T-celler kan nemlig også genkende MHC-komplekser med et peptid fra virus. Man kan tænke sig, at patienten som udgangspunkt har haft en ganske normal virusinfektion. Peptider fra viruspartiklen er blevet præsenteret i MHC II-komplekser, og T-cellerne har genkendt dem som værende fremmede. Derfor er immunforsvaret blevet sat i gang med at ødelægge viruspartiklerne, og infektionen er blevet nedkæmpet. Disse aktiverede T-celler genkender nu MHC-komplekset med peptider fra myelin og tror, at der også her er tale om virusinficerede celler. Derfor sætter de et angreb i gang mod kroppens eget myelin i den tro, at det er en virusinfektion.

Udvikling af en immuniseringsstrategi

I vores laboratorium har vi forsøgt at udvikle en immuniseringsstrategi mod sklerose. Vi har tidligere isoleret et antistof kaldet MK16, der genkender og binder til MHC med et peptid fra myelin, og som blokerer for binding af den aktiverede T-celle. Vi har identificeret små peptidstykker, der præsenteres på overfladen af bakterievirus, og som ikke har noget at gøre med MS, men som genkender antistoffet MK16, og som derfor formodes at ligne det MHC-peptidkompleks, som de aktiverede T-celler binder til. Vi har immuniseret mus med disse peptidbærende bakterievirus, og håbet var, at de ville ligne overfladen af MHC-komplekset med myelinpeptidet tilstrækkeligt til at få musen til at danne antistoffer mod dette kompleks. Formålet var at få disse antistoffer til at blokere for T-cellernes genkendelse af MHC-komplekset med myelin og på den måde standse deres angreb på nervecellerne. Forsøgene viste, at musene dannede antistoffer, der bandt MHC-komplekset med myelinpeptidet, men desværre også i nogen grad antistoffer, der genkendte MHC-komplekset alene. Nogle af de dannede antistoffer blokerede for bindingen mellem MK16- og MHC-komplekset med myelinpeptidet. Forhåbentlig vil de derfor også blokere for T-cellen og derved forhindre, at T-cellen kan starte et immunrespons mod myelin rundt om nervecellerne. For at finde ud af om det er muligt, er det nødvendigt at teste forsøget i forskellige egnede dyremodeller. Der findes en model for sklerose med transgene mus, der har de samme MHC-komplekser og T-celler som sklerosepatienter, og som udvikler en sygdom, der ligner MS. Det vil derfor være oplagt at teste vores peptider i en sådan model for at se, om de dannede antistoffer også blokerer for de aktiverede T-celler. Indtil videre ser resultaterne lovende ud, og vi håber, at de også vil vise sig at virke i en musemodel for MS.

Forsøget viser, at de antistoffer, som musene har dannet, kan fjerne bindingen mellem MK16 og MHC-komplekset med et myelinpeptid. Søjlerne med serum fra mus immuniseret med de tre peptider ER6.1, ER6.1mut1 og ER6.2 er meget lavere en søjlen for MK16 alene. Det betyder, at når der er tilsat serum fra musene til blandingen af MHC-myelinpeptidkomplekset med myelinpeptid og MK16-antistoffet, så forhindrer serum at MK16 kan binde. Dvs. at der i serum fra musene findes antistoffer, der ligner MK16. Forhåbentlig vil de også forhindre T-cellens genkendelse af MHC-komplekset med et myelinpeptid.



Ph.d. Rebekka Dam-Tuxen er postdoc på Institut for Systembiologi, DTU
Ph.d. Erik Riise er lektor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi

Helping Hand

– patientens forlængede arm



Helping Hand med indsat blisterkort indeholdende tabletter. Et grønt lys minder patienten om at tage tabletter til tiden. Et rødt lys viser, at tabletten ikke blev taget.

Sundhedsvæsenet har mulighed for at tilbyde glemsomme patienter en hjælpende hånd. Et nyt studie viser, at en elektronisk påmindelse med apparatet Helping Hand forbedrer medicin efterlevelsen hos blodtrykspatienter med 15% i kombination med individuel rådgivning.

Af Arne Christensen og Ebba Holme Hansen

Det er et faktum, at patienter sjældent tager medicinen som ordineret. Forskellige undersøgelser har dokumenteret manglende medicin efterlevelse fra 1/3 til op mod 90% af patienterne. Undertiden kan afvigelse fra ordineret medicinering være hensigtsmæssigt, men sædvanligvis har det negative konsekvenser for patienternes helbred, sundhedssystemets ressourceforbrug og samfundets økonomi. Der kan være mange grunde til, at patienter ikke tager deres medicin som ordineret, men ofte bunder manglende medicin efterlevelse i hverdagslivets sociale kontekst, patientens

værdier, opfattelser og evner – eller der kan være tale om simpel glemsomhed, frygt for medicinens bivirkninger, dårlige erfaringer med lægemidler eller manglende tillid til den læge, som udskriver medicinen.

Manglende medicin efterlevelse er en individuel problematik. Det er både unge og ældre, mænd og kvinder, der ikke lever op til receptens ordlyd og rådgivningen fra læge og farmaceut. Der er ikke noget, som tyder på, at ældre patienter er mere glemsomme end resten af befolkningen. Faktisk er den ældre del af befolkningen bedre til at huske at tage medicinen – måske fordi de er mere medicin vante og mere autoritetstro.

En mulighed for at forbedre medicin efterlevelsen kan være brug af såkaldte *reminder devices*. Disse apparater minder patienterne om at tage den rette medicin til den rette tid. Helping Hand er et sådant device, og vi har underkastet brugen af apparatet en undersøgelse for at finde ud af, om den elektroniske påmindelse fungerer efter hensigten. Studierne har drejet sig om både patienters og sundhedsprofessionelles (læger, farmaceuter, sygeplejersker osv.) accept af Helping Hand og om dens effekt på medicin efterlevelsen hos patienter med forhøjet blodtryk.

Apparatet resulterede i en forbedret medicin efterlevelse på ca. 6%, og det er i sig selv ret meget. Kombineret med målrettet rådgivning, som bygger på data fra apparatet, var der en næsten tre gange så stor effekt, som når den hjælpende hånd blev benyttet alene.

En elektronisk hjælper ved hånden

Helping Hand er et apparat, som kan rumme såkaldte blisterkort med tabletter. Blisterkort er plastikkort med små bobler (engelsk 'blister'), som ofte bruges til indpakning af tabletter. Disse blisterkort bliver skubbet ind i apparatet, som har cirka samme taskevenlige størrelse som en lille fjernbetjening eller en mobiltelefon. En gang om dagen minder Helping Hand så



med et stærkt blinkende lys og en høj bippende lyd patienten om, at det er tid til at indtage dagens dosis. Patienten fjerner blisterkortet, tager tablettten og sætter kortet tilbage i apparatet. Til brug for forskere findes en særlig version af apparatet, som gemmer data om, hvornår patienten har taget tabletterne, og disse data kan downloades til en computer for nærmere analyse.

Bred accept blandt patienter og sundhedsprofessionelle

Vi gennemførte flere spørgeskemaundersøgelser blandt både patienter og læger på internettet, hvor de blev bedt om at tage stilling til Helping Hand. Desuden spurgte vi patienter, som deltog i kliniske forsøg, og deres behandlende læger om, hvad de synes om Helping Hand. Resultaterne viste, at cirka tre ud af fire synes, at Helping Hand er en rigtig god ide, og at dens reminderfunktion er nyttig.

To ud af tre adspurgte ville gerne begynde – eller fortsætte – med at bruge Helping Hand. Nogle af patienterne så dog også ulemper ved apparatet, som for eksempel at det kun kan bruges med bestemte blistere og kun med én slags medicin ad gangen. For nogle var det desuden problematisk, at apparatet giver lyd på samme tid hver dag – måske vil patienten gerne sove længe om søndagen, og så kan 'Helping Hand' være et irritationsmoment.

Helping Hands effekt på medicin efterlevelse

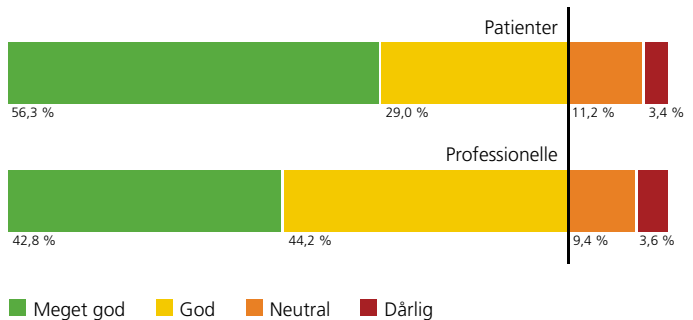
I et klinisk forsøg med blodtryks-sænkende medicin med ca. 400 patienter undersøgte vi, om Helping Hand kunne forbedre patienters medicin efterlevelse. I undersøgelsen brugte den ene halvdel af patienterne apparatet sammen med deres blodtryksmedicin i et halvt år. Efter det halve år blev deres medicin efterlevelse og blodtryk så sammenlignet med den anden halvdel af patienterne, som ikke havde haft apparatet. Samlet set havde patienterne taget deres medicin i ni ud af ti dage (medicin efterlevelse på knap 90%). De patienter, som havde brugt Helping Hand havde dog en 6% højere medicin efterlevelse. Med andre ord glemte de kun ca. halvt så mange tabletter, som patienterne uden ekstra hukommelseshjælp.

Patienternes blodtryk blev derimod ikke påvirket af brugen af apparatet. Blodtrykket var, efter patienterne var begyndt at tage medicinen, faldet i begge grupper, og i begge grupper var blodtrykket ved slutningen af studiet, som det burde være. Den forskel, at patienterne i Helping Hand-gruppen tog en ekstra tablet hver attende dag, var ikke stor nok til at sænke blodtrykket yderligere. Derfor ser det ud til, at det med den undersøgte medicin ikke har nogen alvorlig betydning for blodtrykket, hvis man glemmer en tablet i ny og næ.

Tilbage melding om medicin efterlevelse til patienter

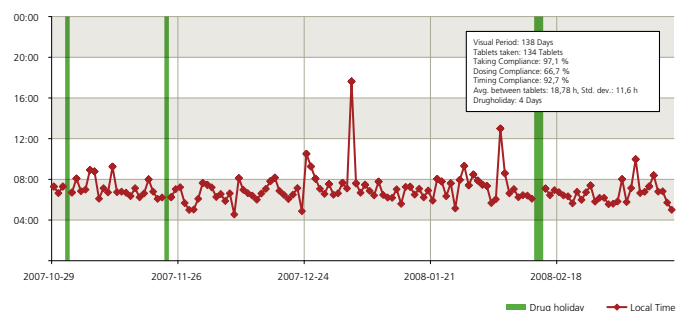
Helping Hand blev brugt i et andet forsøg til at monitorere patienternes medicin efterlevelse elektronisk. Det skete naturligvis for at hjælpe de patienter, som glemmer at tage deres medicin, men også for at komme de patienter i møde som synes, at de egentlig ikke behøver at tage deres medicin – og de der ikke tager medicin af frygt for bivirkninger. Grunden til at patienterne glemmer blodtryksmedicinen kan være, at for højt blodtryk ikke giver besværlige symptomer, og sygdomstilstanden kan derfor føles meget abstrakt for patienten. Der er ingen umiddelbar konsekvens ved at glemme en dosis her og der – medicinen giver måske bivirkninger, og det er svært at forholde sig til et alvorligt sygdomsscenario,

REMINDER



Patienters og sundhedsprofessionelles opfattelse af Helping Hand's reminderfunktion.

TIDSPUNKT FOR TABLETINDTAG



Eksempel på en patients indtagelse af tabletter gennem flere måneder.

Helping Hand – også til at monitorere patienternes medicin efterlevelse elektronisk.



der ligger langt ude i fremtiden, som konsekvens af mange år med for højt blodtryk.

Medicinefterlevelsen blev gennemgået gentagne gange af en farmaceut sammen med patienten. Ved disse møder viste farmaceuten en graf over forløbet af medicinindtagelsen, som så var udgangspunkt for en samtale. På denne måde er det muligt at hjælpe patienten med dennes individuelle problemer med lægemiddelbehandlingen. Forsøget foregik på apoteker i Tyskland.

I dette forsøg blev medicin efterlevelsen forbedret med 15%. Imidlertid indgik der relativt få patienter i undersøgelsen, så resultaterne gælder ikke nødvendigvis for en større gruppe patienter. Heller ikke i dette forsøg var der forskel på patientgruppernes blodtryk, hvilket igen viser, at moderne blodtryksmedicin virker efter hensigten, selv når enkelte tabletter udelades i behandlingen. Både patienter og farmaceuter var generelt meget glade for denne mere dybdegående kon-

takt, hvor det var muligt at afhjælpe individuelle problemer mere målrettet end det er tilfældet i den almindelige, travle apotekshverdag.

Hjælper den?

Helping Hand er accepteret af et flertal af patienter og sundhedsprofessionelle. Apparatet ser ud til at forbedre medicin efterlevelse med 6%, og kombineret med individuel rådgivning er der tale om en forbedring på 15%. Der var imidlertid ikke forskel på patienternes blodtryk i de to patientgrupper (med og uden brug af Helping Hand).

Patientens forlængede robotarm hjælper med at forbedre medicin efterlevelsen. Det skyldes andre forhold, at det ikke kom klart til udtryk i forskelle i patientgruppernes blodtryk. Der vil derfor være et større potentiale i at anvende HH i forbindelse med lægemidler som fx p-piller, HIV-medicin eller lægemidler mod epilepsi, hvor en nøjagtig medicin efterlevelse er afgørende for behandlingsresultatet.

MEDICINEFTERLEVELSE

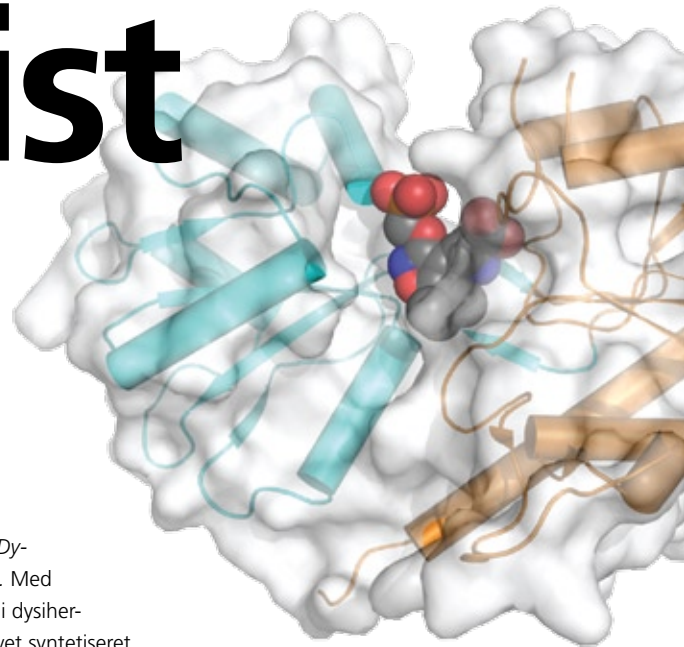
Medicinefterlevelse er graden af overensstemmelse mellem patientens faktiske medicinindtagelse og den ordinerede behandling. Medicinefterlevelse opgives ofte i procent. På engelsk hedder medicin efterlevelse *compliance* eller *adherence*.

COMPLIANCE DEVICES

Der findes en række hjælpemidler, som skal sikre, at medicin bliver taget regelmæssigt. Det kan være doseringsæsker med rum til alle ugens dage, eller armbåndsure som kan programmeres til at minde patienten om, at det er tid til at tage medicinen. Disse betegnes på engelsk *compliance devices*. Apparatet Helping Hand er et compliance device.

*Cand.pharm. Arne Christensen er ph.d.-studerende på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Cand.pharm. Ebba Holme Hansen er professor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi*

At være eller ikke være en antagonist



Antagonisten der i virkeligheden er en agonist – og som opfører sig, som var den begge dele. Et dansk-amerikansk samarbejde søger at klarlægge, hvorfor en analog syntetiseret med udgangspunkt i et giftstof fra en tropisk marin svamp opfører sig så usædvanligt.

Af Karla Frydenvang, Peter Naur, Michael Gajhede og Jette Sandholm Kastrup

I 2006 blev vi kontaktet af en amerikansk forsker fra et universitet i Chicago om samarbejde vedrørende stofferne dysiherbain og MSVIII-19. De mente, at disse to stoffer virker som henholdsvis en agonist og en antagonist på ionotrope glutamatreceptorer i centralnervesystemet. Ofte er antagonist større molekyler end agonister, og det vakte straks vores interesse, at det omvendte så ud til at være tilfældet her. Vores forskningsresultater viste da også, at MSVIII-19 slet ikke var en antagonist men derimod en såkaldt svag partiel agonist.

Ionotrope glutamatreceptorer

Glutamat er et af hjernens vigtigste signalstoffer, som påvirker stort set alle nerveceller i centralnervesystemet. Signalstoffet aktiverer nervecellerne ved at binde sig til glutamatreceptorer, der sidder i cellemembranen. En tilstrækkelig glutamatstimulering af receptorerne er af afgørende betydning for, at hjernen fungerer normalt. En vigtig klasse af glutamatreceptorer er de ionotrope glutamatreceptorer, der medvirker til hurtig overførsel af information mellem nerveceller. Disse receptorer danner ligandaktiverede ionkanaler.

Naturstoffer er ofte lead stoffer

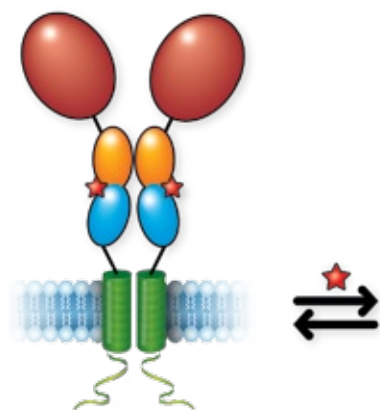
Kainat-receptorer danner en underklasse af ionotrope glutamatreceptorer. Disse receptorer har vist sig at binde en række naturstoffer. Et eksempel er naturstoffet dysiherbain, som

er et giftstof (toxin) fra den marine svamp *Dysidea herbacea*. Med udgangspunkt i dysiherbain er der blevet syntetiseret en række analoger, deriblandt stoffet MSVIII-19. Denne analog er forskellig fra dysiherbain ved at mangle de to funktionelle grupper på det sekslede ringsystem. Funktionelle studier har vist, at dysiherbain er en potent agonist på kainat-receptoren GluR5, mens MSVIII-19 tidligere er rapporteret som værende en potent antagonist på GluR5. Det er usædvanligt, at en antagonist er et mindre molekyle end en agonist med næsten samme struktur. Ofte blokerer antagonist netop aktiveringen af receptorerne ved at indeholde en stor rumlig gruppe, som vil forhindre den del af receptoren, som binder ligander, i at lukke sammen om liganden. Dermed forhindres det, at receptoren antager den aktive form, hvor ionkanalen er åben.

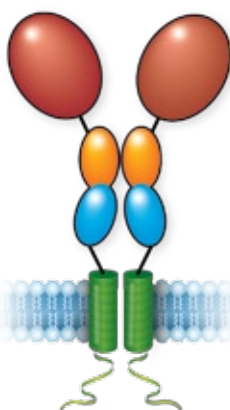
Tre-dimensionel struktur viser uventet resultat

For at forstå forskellen i aktivitet af dysiherbain og MSVIII-19, henvendte en amerikansk forskningsgruppe ved et universitet i Chicago sig til os. Vi har nemlig siden 2004 været i stand til at producere en opløselig form af den del af GluR5-receptoren, som binder ligander, samt at bestemme tre-dimensionelle strukturer af opløseligt GluR5 med forskellige ligander bundet. De foreslog os at indgå i et samarbejde, hvor vores bidrag bestod i at krystallisere og bestemme den tre-dimensionelle struktur af GluR5 med henholdsvis dysiherbain og MSVIII-19 bundet til receptoren. En krystalstruktur af en receptor med en ligand giver mulighed for at studere vekselvirkningen mellem receptor og ligand i detaljer. En sådan struktur kunne måske forklare, hvorfor MSVIII-19 opfører sig som en antagonist. Vi fik krystaller af GluR5 med begge stoffer, og efter opsamling af røntgendiffractionsdata kunne vi

ANTAGONIST BUNDET

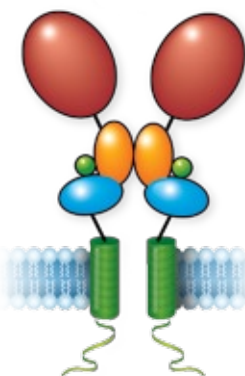


IONKANAL LUKKET

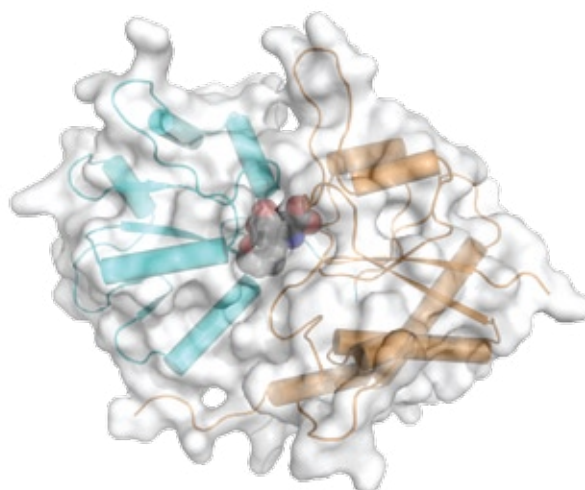
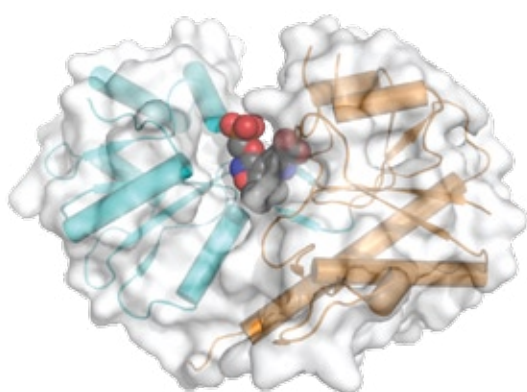


★ Antagonist ● Agonist

AGONIST BUNDET



IONKANAL ÅBEN



Gennem de seneste 10 år er der opnået en ret detaljeret forståelse af de ionotrope glutamatreceptorers struktur og funktion. Denne forståelse er primært opnået ved at bestemme røntgenstrukturer af en opløselig form af den del af receptoren, som binder ligander. Ved stimulering af receptoren med en agonist, fx neurotransmitteren glutamat, lukker receptoren sig fuldstændig sammen om liganden (figur øverst til højre). Herved sker der en ændring af receptorens

form, der fører til åbning af ionkanalen og dermed aktivering af receptoren. Antagonister virker derimod som en stopklods og blokerer herved for aktivering af receptoren (figur øverst til venstre). Nederst er vist strukturen af kainat-receptoren GluR5 med en antagonist bundet (venstre) og med stoffet MSVIII-19 bundet (højre). Læk mærke til, hvordan receptoren lukker sig sammen om MSVIII-19, hvilket den ikke gør om antagonistten.

Ph.d. Karla Frydenvang er lektor på Institut for Medicinalkemi

Ph.d. Peter Naur er postdoc på Institut for Medicinalkemi

Ph.d. Michael Gajhede er professor på Institut for Medicinalkemi

Erhvervsforsker, cand.pharm. Jette Sandholm Kastrup er professor på Institut for Medicinalkemi

^{11}C -mærkede lægemiddelstoffer til scanning af hjernen

I moderne syntese af lægemiddelstoffer benyttes mange forskellige kemiske reaktioner med en bred anvendelse af stoffer fra det periodiske system. Til fremstilling af stoffer til billeddannelsesteknikker, som fx PET-scanning, anvendes radioaktive grundstoffer. Med PET-scanning kan man få 3-dimensionelle billeder, der viser, hvordan radioaktivt mærkede stoffer fordeles sig, efter de er kommet ind i kroppen. Binder sporstoffet til en bestemt receptor, afsløres dennes position. Det gør det muligt med PET-scanning at teste, om nye potentielle lægemiddelstoffer binder sig til netop den receptor, man tilstræber.

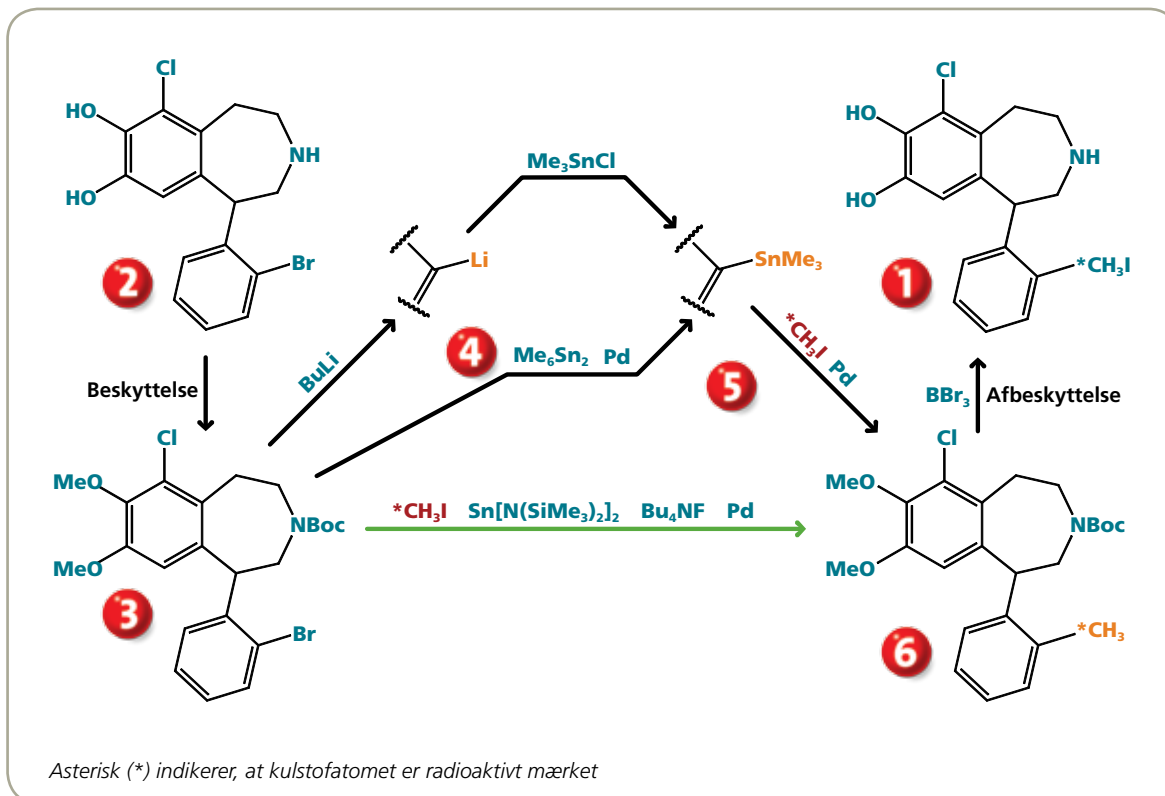
Af Jesper Christensen og Mikael Begtrup

Dopamin-receptorer

Dopamin er et vigtigt signalstof i hjernen, der binder til dopamin-receptorerne. Disse receptorer spiller en stor rolle i sygdomme såsom Alzheimers, Huntington, Parkinsons, skizofreni og depressioner. Der findes to grupper af dopamin-receptorer: D_1 og D_2 . D_1 -receptorer påvirker appetit og indlæring og spiller en rolle ved en række sygdomme i nervesystemet som fx ADHD (tidligere kaldet DAMP), der ytrer sig ved hyperaktivitet og mangel på koncentration. Inden for lægemiddelforskning tilstræbes at udvikle specifikt virkende lægemiddelstoffer, da disse er karakteriseret ved at have færre bivirkninger end lægemiddelstoffer med mindre specifik virkning. Derfor ønsker man at kortlægge D_1 - og D_2 -receptorerne, for sidenhen specifikt at kunne påvirke disse.

H																			He
Li	Be											B	C	N	O	F			Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl			Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br			Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I			Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi					
Eu	Yb	Sm	Ce																

En betydelig del af grundstofferne i det periodiske system deltager i de omtalte få syntesetrin. Deltagende grundstoffer er indrammet med blåt.



Ved en PET-scanning indgives et markørstof, som binder sig til en bestemt receptortype. Derpå foretages målingen, der viser, hvor markørstoffet opholder sig. Markørstoffets placering afslører dermed, hvor i hjernen den pågældende receptortype befinder sig.

På denne måde er D_2 -receptorernes placering blevet bestemt med stor nøjagtighed. Derimod har det været vanskeligt at fremstille markørstoffer, der kun binder til D_1 -receptorerne og dermed kan give oplysninger om, hvor i hjernen, disse receptorer befinder sig.

Phenylbenzazepiner

Ved målinger på cellekulturer har man fundet, at phenylbenzazepiner, heriblandt methylforbindelsen **1** (se illustrationen ovenfor), binder specifikt til D_1 -receptorer. For at man kan måle, hvor markørstoffet **1** sætter sig i hjernen, må det gøres radioaktivt. Dette kan ske ved at indbygge en methylgruppe ($-CH_3$) der indeholder den radioaktive kulstofisotop ^{11}C , som fremstilles i en cyclotron. Kemikeren skal arbejde hurtigt ved fremstillingen, da ^{11}C nedbrydes så hurtigt, at halvdelen er væk på bare 20 min. Derfor må indbygningen af CH_3 -gruppen i markørstoffet ske så sent som muligt ved fremstillingen. En anden vanskelighed er at indføre methylgruppen netop på det ønskede C-atom i **1**. Ved traditionelle metoder vil methylgruppen hellere placere sig på O- og N-atomerne i molekylet, og det giver stoffer, der ikke binder sig specifikt til D_1 -receptoren.

Syntesevej I

For at løse dette skisma blev der udtænkt en syntesestrategi, hvor de reaktive O- og N-atomer først beskyttes (**2**→**3**). Derpå indføres methylgruppen på det ønskede C-atom ved en katalyseret kemisk reaktion mellem methyljodid (CH_3I) og

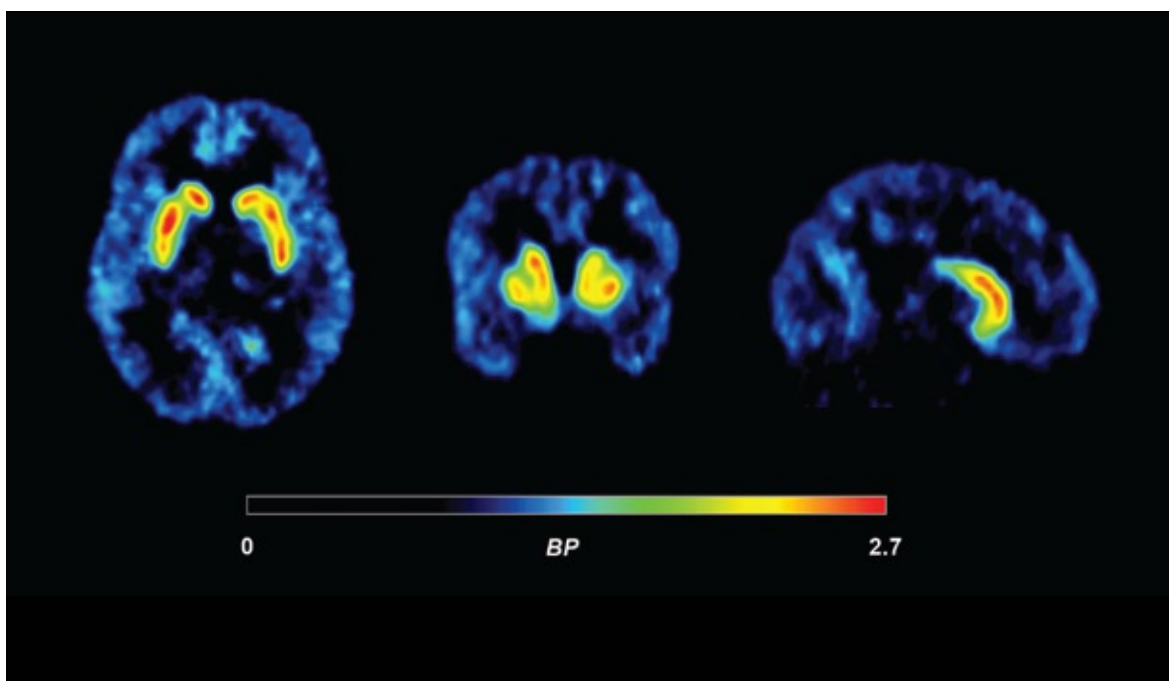
en aromatisk tinforbindelse (**3**→**6**). Tinforbindelser tåler ikke luftfugtighed, derfor må reaktionerne udføres i en nitrogenatmosfære.

For at sikre at methylgruppen kommer til at sidde i den rigtige position benyttedes **2** som udgangstof, idet dette har et bromatom i den samme position som **1**. Først beskyttes O- og N-atomerne med passende grupper (**2**→**3**); derpå erstattes bromatomet med lithium ved behandling med *tert*-butyllithium (**3**→**4**). *tert*-butyllithium er et højreaktivt reagens, der let bryder i brand, hvis det kommer i kontakt med luften. Herefter erstattes lithium med tin ved at tilsætte en tin-halogenforbindelse (**4**→**5**).

Da udbyttet af reaktion ikke var tilfredsstillende, blev det forsøgt at bytte brom-atomet direkte ud med tin (**3**→**5**). Det kræver det eksotiske grundstof palladium som katalysator.

Palladium (Pd) er syntesechemikerens tryllepulver. Blot et lille drys Pd kan facilitere ellers umulige reaktioner. Pd er et ædelmetal, der minder om platin. Det kan både optage og afgive elektroner og er derfor fortrinligt i arbejdet med at danne kemiske bindinger.

Palladiumkatalysatoren er dyr, men der går næsten intet til spilde, og katalysatoren kan genbruges mange gange. Desværre var udbyttet i dette tilfælde også utilfredsstillende. Tinforbindelsen blev nu koblet sammen med en methylhalogenforbindelse (**5**→**6**). Sammenkoblingen, der også kræver en palladiumkatalysator, gav kun et beskedent udbytte, og der opstod desuden to biprodukter. Der blev derfor forsøgt en alternativ syntesevej – syntesevej II.



PET-scanning, der viser D1-receptorernes placering i hjernen.

To muligheder

Når en kemisk binding skal dannes mellem to udgangsstoffer A og B for at give produktet A-B, kan enten A eller B levere elektronerne, som bindingen består af. I vores tilfælde er det tinnforbindelsen, der leverer elektronerne. Ved syntesevej II skal tin og halogen direkte bytte plads, det vil sige, at tinnet skal sidde på methylgruppen, mens halogenatomet skal sidde på den aromatiske ring (**3**→**6**). Det ene udgangsstof ved koblingen bliver hermed bromforbindelsen **3**, mens det andet skal være en methyl-tin-forbindelse.

Syntesevej II

Som tinnforbindelse valgtes $(\text{Sn}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]_2)$, med kælenavnet Lapperts stannylene. Denne kan methyleres kvantitativt (100 %) til methyltinnforbindelsen ved reaktion med CH_3I . Reaktionen er momentan og velegnet til udførelse med radioaktivt mærket CH_3I . Ved den efterfølgende sammenkobling pepes tinnforbindelsen op med fluoridioner (**3**→**6**). Fluoridionerne gør yderligere gavn ved at fange det brugte tin og give tungtopløselige tinfluorider, hvorved produktet bliver frit for giftige tinnforbindelser.

Den alternative syntesevej gav et væsentligt højere udbytte. Derudover er den et syntesetrin kortere og giver ingen biprodukter, så produktet er lettere at rense.

Perspektiver

Metoden må kunne bruges til radioaktiv mærkning af andre stoffer, der blot skal have et bromatom, hvor den radioaktivt mærkede methylgruppe skal sidde. Syntesen er nu klar til afprøvning med radioaktivt mærket CH_3I . Forhåbentligt vil disse PET-studier tilvejebringe den manglende basale viden om D₁-receptorerne, og dermed bane vejen for udvikling af mere specifikke lægemidler rettet mod enten D₁- eller D₂-receptorerne.

PET er en forkortelse for Positron-Emissions-Tomografi.

Radioaktivitet er der tale om, når ustabile atomkerner udsender stråling. Denne stråling kan måles, og herved opnås informationer om, hvor det radioaktivt mærkede atom befinder sig.

Receptorer er proteinmolekyler. For at et stof kan binde sig til receptorstrukturen, skal stoffets struktur være specifik, hvilket vil sige, at stoffet skal være formet præcist som en nøgle til en lås.

¹¹C udtales carbon-11.

Cand.scient. Jesper Christensen er ph.d.-studerende på Novartis, Basel, Schweiz
Ph.d. Mikael Begtrup er professor på Institut for Medicinalkemi

Bivirkningsmonitorering af lægemidler – en ny udfordring for apoteksfarmaceuter



Af Søren Troels Christensen og Ole J. Bjerrum

Ibrugtagning af nye lægemidler sker på baggrund af kliniske undersøgelser, hvor antallet af undersøgte patienter tælles i tusinder. Sådanne undersøgelser kan desværre ikke fuldt ud belyse risi-

koen for sjældne bivirkninger, fordi lægemidlet først efter markedsføringen afprøves i den praktiske verden med alle aldersgrupper af patienter med hver deres livsstil og vaner.

En opinionsundersøgelse foretaget af analyseinstituttet Zapera i sommeren 2009 fandt, at 41 procent af danskerne er "medicinskeptikere" på grund af frygt for bivirkninger. Nogle har som konsekvens ligefrem stoppet deres behandling uden samråd med deres læge. Samtidig har det aktuelle fokus på lægemiddelbivirkninger i Danmark ført til, at der er blevet påvist en underrapportering i antallet af bivirkningsindberetninger fra både sundhedsprofessionelle og borgere til Lægemiddelstyrelsen. Dette er vurderet ud fra forholdet mellem antallet af modtagne rapporter og det samlede lægemiddelforbrug i Danmark. Derfor har myndighederne begrænsede muligheder for at iværksætte nye sikkerhedsmæssige tiltag. Gennem bedre og mere effektiv rapportering og kommunikation om bivirkninger kan der skabes øget tillid til lægemid-

ler i befolkningen. Apoteksfarmaceuter, som er i tæt kontakt med den enkelte lægemiddelbruger, kan spille en væsentlig rolle i en forbedret bivirkningsmonitorering. Generelt er der altid grund til at være opmærksom på, om der er knyttet bivirkninger til medicin – og herunder bivirkninger, som endnu ikke er kommet til myndighedernes kendskab. Markedsføringstilladelse for nye lægemidler sker nemlig på baggrund af en konkret vurdering af forholdet mellem effekt og risiko. Hvis effekten af et nyt lægemiddel er bedre eller i det mindste lige så god som eksisterende lægemidler, og hvis risici i form af bivirkninger er mindre end for eksisterende medicin, gives der markedsføringstilladelse. Denne indledende vurdering kan imidlertid ikke give fuld sikkerhed for lægemidlets videre brug, fordi det kun er testet på et begrænset antal patienter.

BIVIRKNINGER OPDAGET EFTER MARKEDSFØRING



Det anti-inflammatoriske lægemiddel Vioxx® (tv.) var effektivt, og ved markedsføringen fremhævedes det, at lægemidlet ville medføre færre bivirkninger og lavere dødelighed end tilsvarende lægemidler. Det holdt ikke stik, og Vioxx® blev trukket tilbage fra markedet i 2008. Hormonpræparatet Eltroxin® (th.) har været markedsført i over 50 år uden at volde problemer. En ny formulering førte til overdoseringssymptomer.

Sjældent forekommende bivirkninger opdages ofte først efter markedsføringen af et lægemiddel. Et eksempel er det anti-inflammatoriske lægemiddel Vioxx®, der havde god effekt, men også kendte bivirkninger i form af risiko for blodpropper og nyresygdomme. Derimod gav det nye lægemiddel ikke umiddelbart anledning til mavesårsblødninger som tilsvarende gængse lægemidler. Da Vioxx® skulle erstatte andre anti-inflammatoriske lægemidler, som i Danmark forårsager mellem 20-30 dødsfald årligt, vurderedes risikoen for alvorlige bivirkninger som mindre end for de øvrige lægemidler i gruppen. Først efter 5 år på markedet viste det sig ikke at være tilfældet, og lægemidlet blev trukket tilbage. I mellemtiden havde det forårsaget unødvendige lidelser og dødsfald.

Lægemidlet Eltroxin®, et hormonpræparat, der anvendes mod for lavt stofskifte ved sygdommen Myxødem, har været markedsført i mere end 50 år og anses for at være et uproblematisk lægemiddel. I 2008 oplevede myndighederne i New Zealand en pludselig stigning i antallet af rapporterede bivirkninger ved Eltroxin®. De danske myndigheder har tilsvarende i 2009 oplevet et stigende antal bivirkningsrapporter vedrørende Eltroxin®. Forklaringen på det pludselige markante antal indberetninger skyldes, at producenten af Eltroxin® har introduceret en ny formulering af præparatet. Tabletten kan ikke længere deles, og sammen med en ændret absorption af aktivt hormon giver dette anledning til bivirkninger i form af overdoseringssymptomer. Dette vidste patienterne ikke og troede sig i første omgang syge.

Eksemplet illustrerer, at lægemidler, som har været anvendt i adskillige år, kan give bivirkninger. Producenten af Eltroxin® og myndighederne kunne forud for relanceringen have udarbejdet en monitoreringsplan for at detektere eventuelle bivirkninger knyttet til den nye formulering.

Udvikling af forbedret monitorering

Der er brug for løbende, effektiv og simpel registrering af lægemiddelbrugerens oplevelser af bivirkninger efter markedsføring, som kan bidrage til en tidlig opdateret og skarpere sikkerhedsprofil for lægemidler. Det vil give myndighederne mulighed for at gribe ind i tide ved at advare, begrænse eller helt stoppe salget af et lægemiddel, så unødigt lægemiddelinduceret sygdom begrænses mest muligt. Indsatsen vil være til gavn både for den enkelte lægemiddelbruger i form af mindre gener og for samfundet, som vil spare hospitalsindlæggelser.

I Danmark er læger, tandlæger og dyrlæger lovmæssigt forpligtet til at indberette enhver formodet bivirkning til den danske Lægemiddelstyrelse. Derudover har øvrige sundhedsprofessionelle, patienter og pårørende mulighed for at indberette lægemiddelbivirkninger. Farmaceuter har pligt til at assistere patienter med indberetninger.

Apotekerne selv tegner sig for et yderst begrænset antal indberetninger årligt – kun godt 1 procent af samtlige spontane bivirkningsindberetninger kommer fra danske apoteker, hvilket står i skærende kontrast til den hyppige kontakt, det lokale apotek har med den enkelte lægemiddelbruger. Apotekerne har gennem de senere år medvirket til gennemførelse af udviklingsprojekter med fokus på kvalitets sikring af danskernes lægemiddelanvendelse. Indsatsen er i høj grad sket gennem øget dialog med den enkelte lægemiddelbruger, hvor omdrejningspunktet har været korrekt lægemiddelanvendelse for at sikre det bedst mulige resultat af behandlingen samt for at forebygge lægemiddelrelaterede problemer. I forlængelse af disse brugerorienterede tiltag er det kun naturligt, at apotekerne fokuserer på at opspore lægemiddelbivirkninger så tidligt som muligt.

Registrering gennem apoteker

I foråret 2009 gennemførte farmaceutstuderende et studium på danske apoteker for at undersøge og belyse apotekernes mulige rolle som proaktive medspillere i monitorering og indsamling af brugeroplevede lægemiddelbivirkninger. Det overordnede fokus for forsøget var at afprøve en spørgealgoritme i praksis samt at undersøge den faglige og organisatoriske forankring på apoteket i forhold til monitorering og registrering af bivirkninger.

20 studerende blev forud for selve undersøgelsen gennem en workshop trænet til konkret identifikation af symptomer på bivirkninger omkring modellægemidlet Ibuprofen. Ibuprofen tilhører gruppen af anti-inflammatoriske lægemidler, der bl.a. som bivirkning nedsætter mave- og tarmslimhindens modstandskraft, hvilket kan lede til sår dannelse og blødning, som i værst tænkelige tilfælde kan blive fatal. De studerende udsurgte ved hjælp af et spørgeskema brugere af Ibuprofen, som accepterede at deltage i undersøgelsen, om oplevede gener i forbindelse med deres lægemiddelanvendelse. Forsøget viste, at apotekerne med apoteksfarmaceuter i spidsen efter passende træning kan indsamle relevant information, klar til at blive indsendt til Lægemiddelstyrelsen. Tildeles apotekerne en selvstændig rolle i forbindelse med monitorering og rapportering af lægemiddelbivirkninger, vil apoteksfarmaceuter kunne indgå i konkrete sammenhænge såsom styrket bidrag til den eksisterende spontane indberetning, intensiv monitorering af et nyintroduceret lægemiddel eller klinisk orienteret forskning i en hverdagskontekst. I forbindelse med intensiv monitorering af et nyt lægemiddel, vil apoteksindberetninger tjene et dobbelt formål i form af en tidlig varslingsforanstaltning samt som forskning i lægemiddelsikkerhed. Ved ekspedition af lægemiddel udsørger den enkelte løbende om eventuelle oplevede gener; første gang ved anden ekspedition af det pågældende lægemiddel.

FORSKNING I LÆGEMIDDELSIKKERHED

Farmakovigilance – forskning som omhandler detektion, vurdering, forståelse og forebyggelse af bivirkninger – har fået stigende interesse blandt forskere og studerende på Det Farmaceutiske Fakultet. Således blev 5 procent af farmaceutårgang 2008 ansat i farmakovigilancestillinger. Fakultetets ekspertise spænder fra metodeudvikling til tidlig detektion af brugeroplevede lægemiddelbivirkninger gennem en kobling til traditionel klinisk farmakologi, farmaci og epidemiologi.

*Cand.pharm., ph.d. Søren Troels Christensen er videnskabelig assistent på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Dr.med. Ole J. Bjerrum er professor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi*

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

Lægemiddelforskning

udgives af Det Farmaceutiske Fakultet, Københavns Universitet

Redaktion

Jesper Munck, Rolf Haugaard og Mette Rasmussen (ansvarshavende)

Billedredaktion

Jesper Munck og Jens Raadal

Fotos

iStockphoto (10)
CEM Corporation (10)
Stock.xchng (9, 13, 17, 25, 41)
Jesper Munck (13, 14, 21)
SPL (16)
Mikal Schlosser (28, 49)
Public Health Image Library (37)
Bang & Olufsen Medicom a/s (40, 42)
Keoki Stender (44)
FOCI (46)
Lars Farde og Andrea Varrone, Karolinska Sjukhuset (48)

Grafik/illustrationer

Henning Dalhoff (4, 6, 8, 19, 20, 23, 26, 27, 29)
Jens Raadal (5, 7, 16, 17, 18, 35, 38, 45)
Simon B. Larsen (8)
Tommy Sander (31, 33)
CREAS (34)
Rasmus Prætorius (36)

Grafisk design og produktion

Jens Raadal

Tryk

Best-Buy-Broker

ISSN 0905-0051