



Lægemedelforskning

2012

Lægemiddelforskning

Udgivet af Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet
Københavns Universitet
Blegdamsvej 3b
2200 København N

Redaktion

Rolf Haugaard, Tommy Panduro og Lise Moesby (ansvarshavende)

Design og layout

Malene Hald

Fotos, grafik og illustrationer

Henning Dalhoff
Jens Bøgeskov
Malene Hald
iStockphoto
Ghent University
wikipedia/michale linnenbach
Nilla Björklund
Karin Björklund
Erland Björklund
Carin Flensburg
Martin Bjerregaard Jensen
Fyens Stiftstidende
Creas Imageclub
AV-afd., Sygehus Vendsyssel
Emil Meng-Lund
Tommy Panduro
Jette Kastrup
Kasper Dyrberg Rand

Tryk

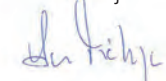
Best-Buy-Broker A/S
ISSN 0905-0051

Bedre lægemidler

Formålet med udviklingen af lægemidler er at diagnosticere, forebygge, behandle og lindre sygdomme og symptomer bedst muligt. Det kræver i udpræget grad, at forskerne arbejder på tværs af faglige discipliner, hvor biomedicinsk grundforskning spiller sammen med blandt andet de farmaceutiske og naturvidenskabelige fagområder samt klinisk forskning. Det er alle områder, hvor danske forskere og virksomheder klare sig rigtig godt – også efter en international målestok. På de farmaceutiske institutter på Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet på Københavns Universitet bidrager vi på mange måder med et stærk input til fremtidens medicin til gavn for såvel patienter som det danske samfund.

Det er mit håb, at nærværende udgave af Lægemedelforskning illustrerer nogle af de vigtige udfordringer inden for lægemiddelområdet i 2012. Og samtidig giver indblik i en række af de spændende og udfordrende forskningsprojekter, der udspringer fra det farmaceutiske område på Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet på Københavns Universitet.

God fornøjelse.



Sven Frøkjær
prodekan

Mød os on/offline

LÆGEMIDDEFORSKNING

Vidste du, at du kan finde alle tidligere årgange af Lægemedelforskning online? Gå på opdagelse og find inspiration på pharmaschool.ku.dk/lmf

BESØG OS SOM GYMNASIEKLASSE

Tag hele klassen med på besøg på farmaceutuddannelsen og mød både forskere, studerende og undervisere. Et besøg kan bestå af foredrag eller øvelser, som er rettet mod enten kemi- eller biologiundervisningen. Læs mere på pharmaschool.ku.dk/besoeg

GYMNASIELÆRERDAG

Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet på Københavns Universitet inviterer i samarbejde med Det Natur- og Biovidenskabelige Fakultet til den årlige gymnasielærerdag, hvor du har mulighed for at stikke snablen i den nyeste forskning inden for natur-, sundheds- og biovidenskab. Dagen byder på både foredrag, workshops og socialt samvær kollegaer fra hele landet. Du kan læse mere på inspirationsdag.ku.dk

BESØG OS SOM GYMNASIEELEV

Som gymnasieelev har du mange muligheder for at blive klogere på, hvad farmaci (eller farmaceutuddannelsen) går ud på. Du kan stifte bekendtskab med studiet og studiemiljøet ved enten at være studerende for en dag eller komme i 3-dages studiepraktik. Du kan også vælge at skrive dit studieretningsprojekt hos os, eller du kan møde os til åbent hus, på uddannelsesmesser rundt omkring i landet og på kulturnatten. Men du kan læse meget mere på pharmaschool.ku.dk/besoeg.



9



25



23



6



48



31



18

Indhold

- 6 Ny metode skal afsløre forgiftning med Fantasy
af Jesper L. Kristensen, Ida N. Petersen, Christian Tortzen, Daniel Sejer Pedersen og Torben Breindahl.
- 9 Et nyt våben mod multiresistente bakterier
af Jens K. Munk, Paul R. Hansen og Henrik Franzyk
- 12 Håb om at ramme latente bakterier i deres skjul
af Jesper Bahnsen, Jorrit Water, Camilla Foged, Henrik Franzyk og Hanne Mørck Nielsen
- 15 Kombinationslægemiddel reducerer bivirkningerne ved smertebehandling
af Ole J. Bjerrum, Anna Basnet, Per H. Honoré og Yvonne Gautam
- 18 Blå medicin mod smerter
af Athanasia Boulakou, Ole J. Bjerrum og Per Hartvig Honoré
- 20 Hvorfor dør man, hvis man spiser for meget medicin?
af Lotte Stig Nørgaard, Susanne Kaae, Ebba Holme Hansen og Line Holst
- 23 Teenagers brug af smertestillende medicin afhænger af etnisk baggrund
af Lourdes Cantarero-Arévalo og Ebba Holme Hansen
- 25 Kontinuerlig lægemiddelfremstilling – en ny rockstjerne i den farmaceutiske industri?
af Kaisa Naelapää, Niels Peter Aae Christensen og Jukka Rantanen



- 20
- 38
- 41
- 34
- 15
- 54
- 28 Fra industrielt madspild til sundhedsfremmende fødevarer og målrettet medicin
af Jeppe Secher Schmidt, Anna Katharina Jäger og Dan Stærk
- 31 Kostens sammensætning kan påvirke optagelsen af lægemiddelstoffer
af Carsten Uhd Nielsen, Sidsel Frølund, Martha Thomsen, Birger Brodin og René Holm
- 34 Ordnung muss (nicht) sein!
af Korbinian Löbmann, Katrine Tarp Jensen, Holger Grohganz og Thomas Rades
- 38 Ny metode skal øge biotilgængeligheden af lægemiddelstoffer:
Overmætning i kapsler eller i tarmen
af Nicky Thomas, René Holm, Thomas Rades and Annette Müllertz
- 41 Modelforsøg baner vejen: Effektiv optagelse af lægemidler gennem kindslimhinden
af Emil Meng-Lund, René Holm, Anette Müllertz og Jette Jacobsen
- 44 Massespektrometri viser vejen til forbedrede proteinlægemidler
af Hongjian Song og Kasper Dyrberg Rand
- 48 Snegleprotein øger forståelsen af vigtige receptorer i hjernen
af Azadeh Shahsavari, Elsebet Ø. Nielsen, Jesper L. Kristensen, Michael Gajhede, Thomas Balle og Jette S. Kastrop
- 51 Kvalitetssikring af målrettede nanopartikler til kemoterapi
af Tam Nguyen, Jesper Østergaard, Stefan Stürup og Bente Gammelgaard
- 54 Forekomst af lægemiddelstoffer i grundvand og havvand på Mallorca
af Erland Björklund, Carlos Rodriguez Navas, Martin Hansen, Víctor Cerdà og Kristine A. Krogh



*Man skal holde øje
med sin drink i nat-
telivet. Fantasy sma-
ger ikke af noget.*

Ny metode skal afsløre forgiftning med Fantasy

STOFFET FANTASY (GHB) ER ET MISBRUGSSTOF, DER OGSÅ ANVENDES SOM ET »DATE RAPE DRUG« I NATTELIVET. FANTASY NEDBRYDES MEGET HURTIGT I KROPPEN, SÅ HVERKEN MISBRUG ELLER FORSØG PÅ BEDØVELSE AF VOLDTÆGTSOFRE ER NEMT AT PÅVISE VED LABORATORIEANALYSER AF BLOD ELLER URIN. VI HAR FUNDET EN METABOLIT, SOM MÅSKE HAR POTENTIALTIL AT AFSLØRE MISBRUG ELLER FORGIFTNING MED FANTASY I LÆNGERE TID EFTER INDTAGELSEN, END DET ER MULIGT I DAG.

Stoffet γ -hydroxymørsyre (GHB) findes naturligt i kroppen i ganske små mængder, men dets biologiske funktion er stadig ukendt, selv om man ved, at stoffet er et nedbrydningsprodukt fra et af hjernens signalstoffer, som indgår i nervecellernes kommunikation. Hvis man indtager syntetisk GHB i moderate mængder, har stoffet euforiske og afslappende effekter, og derfor sælges det som rusmiddel på det sorte marked under navne som 'Fantasy' og 'Flydende ecstasy'. I højere doser bevirker stoffet, at man mister bevidstheden og går i koma, og ved meget høje doser kan GHB være livstruende.

Forskellen på den dosis, der giver en rus, og den dosis, som medfører en alvorlig forgiftning, er lille, og derfor er risikoen for forgiftning stor. Kombination med alkohol er særligt farlig, fordi alkohol øger stoffets sløvende virkning og dermed risikoen for koma. Der er mange tilfælde af skadestueindlæggelser og alvorlige forgiftninger med GHB, nogle med døden til følge. GHB er også kendt som et 'Date Rape Drug', hvor stoffet kommer i ofrets drink, hvorefter offeret voldtages uden at være i stand til at flygte eller gøre modstand.

På Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi har vi fremstillet et stof, som forhåbentligt kan bruges til at udvide det tidsrum efter indtagelsen, hvor det er muligt at påvise forhøjet GHB i en urinprøve. Klinisk Biokemisk Afdeling på Sygehus Vendsyssel har for nylig påvist, at stoffet er til stede i urinprøver og potentielt kan bruges som biomarkør for indtagelse af GHB. Hvis dette er tilfældet, vil det markant kunne ændre de procedurer og analysemetoder som hospitaler og retskemikere i dag benytter ved påvisning af misbrug eller udredning af forgiftninger.

HURTIG NEDBRYDNING I KROPPEN

Normalt kan en persons indtag af et givent stof påvises efterfølgende ved at analysere en urinprøve, men dette er kun i begrænset omfang muligt med GHB, fordi kroppen nedbryder stoffet i løbet af 3-12 timer og derved fjerner sporene fra forgiftningen. Hvis en person ingenting kan huske fra aftenen før, men har mistanke om at have været udsat for en forbrydelse, er det derfor afgørende, at vedkommende henvender sig meget hurtigt til myndighederne, så der kan tages en urinprøve, inden det er for sent. Desværre sker dette sjældent, fordi ofret normalt er konfus dagen efter. Derfor er der desværre meget få formodede bedøvelsesforsøg, der kan reelt dokumenteres.

Kroppen har mange måder at skille sig af med fremmede stoffer på. En af dem er, at stoffet glucuronideres, hvilket indebærer, at enzymer hæfter sukkerstoffet glucuronsyre på det fremmede stof. Det medfører, at stoffet typisk mister den effekt, det ellers ville have i kroppen, og samtidig bliver stoffet mere vandopløseligt, så det nemmere udskilles i urinen i takt med, at blodet renses, når det passerer gennem nyrerne. Vi besluttede os derfor til at undersøge, om kroppens skiller sig af med GHB på denne måde. I givet fald måtte man forvente, at stoffet GHB-glucuronid kan påvises i urinen.

NEDBRYDNINGSPRODUKT PÅVIST I URIN

Urin indeholder en masse forskellige forbindelser – salte, peptider, hormoner og diverse nedbrydningsprodukter, som kroppen udskiller. I princippet kunne vi godt have startet med at lede efter GHB-glucuronid i urinprøver, men det ville svare til at skulle finde en nål i en høstak. Derfor greb vi tingene an på en anden måde og fremstillede en syntetisk

FORFATTERE

Ph.d. Jesper L. Kristensen er lektor ved Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Ida N. Petersen er specialestuderende ved Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Cand. scient. Christian Tortzen er videnskabelig assistent ved Kemisk Institut, Københavns Universitet.

Ph.d. Daniel Sejer Pedersen er lektor ved Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Cand. scient. Torben Breindahl er analysekemiker ved Klinisk Biokemisk Afdeling på Sygehus Vendsyssel.

BIOMARKØRER KAN AFSLØRE EN FORGIFTNING

En biomarkør er et stof, som bruges til at indikere en biologisk tilstand. Inden for klinisk diagnostik anvendes biomarkører til at afsløre infektioner, diabetes, hjertesygdomme og kræft. Biomarkører er typisk stoffer tilstedeværelse eller ændrede koncentration i en biologisk prøve skyldes en ændret helbredstilstand.

Der stilles store krav til anvendelsen af biomarkører. Især må de kun udvise et meget lavt antal falske positive eller falske negative resultater, således at man får stillet den rigtige diagnose for den testede person.

Biomarkører kan også bruges til at finde spor af skadelige miljøpåvirkninger eller forgiftninger. For indtagelse af alkohol anvendes nedbrydningsproduktet ethylglucuronid som biomarkør, idet dette stof har meget længere påvisningstid i urin end alkohol.

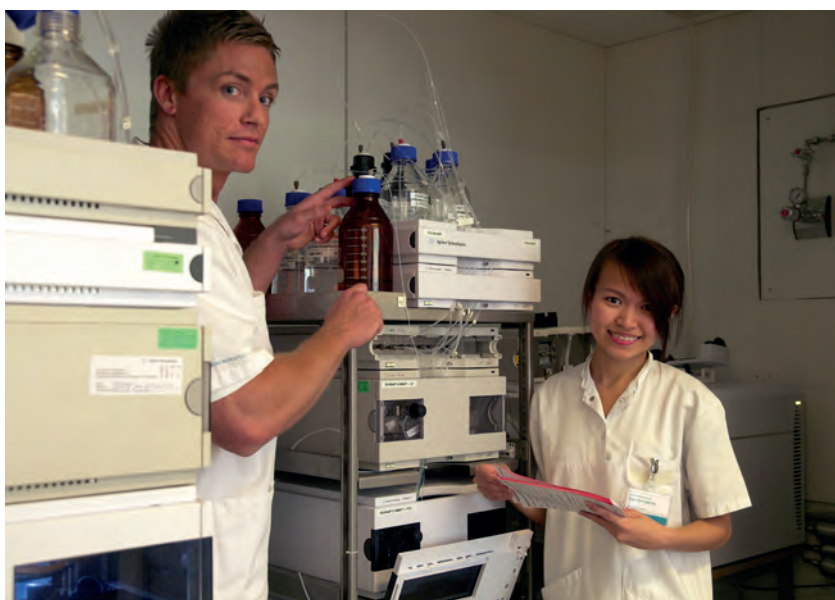


FOTO: ANALYTIKERELEVER KLARGØR LC-MS UDSYRET PÅ SYGEHUS VENDSYSSEL.

version af stoffet. At fremstille det stof, man vil lede efter, giver mulighed for at etablere og validere en robust analysekemisk metode, inden man går i gang med at undersøge urinprøver.

Vores analysemetode kaldes LC-MS, hvilket er en kombination af væskechromatografi (LC) og massespektrometri (MS). Ved væskechromatografien adskilles en blanding af stoffer i de enkelte komponenter, hvorpå massespektrometret bestemmer identiteten af hvert eneste af de fundne indholdsstoffer. Fordelen ved at anvende en syntetisk »nål« er, at man på forhånd ved, hvordan nålen ser ud, og hvor i høstakken man skal lede efter den, når man efterfølgende begynder at analysere urinprøver.

Da metoden var på plads, indsamlede personalet på Sygehus Vendsyssel 50 anonyme urinprøver, som vi analyserede for deres indhold af GHB-glucuronid. Det viste sig, at stoffet var til stede i alle prøverne i større eller mindre mængder som følge af kroppens naturlige indhold af GHB. Et lille antal prøver fra kendte forgiftninger med syntetisk GHB blev ligeledes analyseret, og stoffet blev også fundet i disse prøver. Det

viser, at vores hypotese om, at GHB nedbrydes i kroppen via glucuronidering er korrekt, og vi arbejder nu videre med at undersøge om GHB-glucuronid kan benyttes som biomarkør for GHB.

UDVIKLING AF EN BRUGBAR BIOMARKØR

Hvis GHB-glucuronid skal bruges som biomarkør, er det vigtigt, at stoffet er stabilt og ikke nedbrydes i de indsamlede urinprøver. Derfor har vi undersøgt stabiliteten ved forskellige pH-værdier, som efterligner de ydre grænser, man normalt finder i urin – svarende til pH-værdier på 5 og 9. Forsøgene viste, at stoffet ikke nedbrydes indenfor dette pH-interval. Bagefter opvarmede vi urinprøverne og fulgte, hvorledes stoffet opførte sig undervejs. Det viste sig, at GHB-glucuronid er overraskende stabilt, og selv efter flere døgn ved temperaturer på 90 °C var der ikke sket noget med stoffet. Den høje stabilitet lover godt for, at GHB-glucuronid i praksis kan bruges som biomarkør for GHB.

Der forestår dog stadig et omfattende forskningsarbejde for at afklare dette. Der skal indsamles prøver fra flere hundrede forsøgspersoner for at bestemme det normale niveau af biomarkøren i kroppen. Vi skal også afklare, i hvor høj grad variationer i dette niveau afhænger af køn, alder og tidspunktet for prøvetagningen. Ligeledes skal forsøg under kontrollerede forhold vise, hvordan niveauet af GHB-glucuronid ændrer sig over tid i blodprøver og urinprøver efter, at en frivillig forsøgsperson har indtaget en kendt dosis GHB. Kort sagt skal stoffets farmakokinetiske egenskaber undersøges grundigt. Hvis vores hypotese er korrekt, bliver det muligt at påvise, at GHB er blevet indtaget, i længere tid end det i dag er muligt. •

Princippet i glucuronidering – den mekanisme, hvormed kroppen skiller sig af med fremmede stoffer – er her eksemplificeret ved UDP-glucuronosyltransferase. Det er et vigtigt enzym i stofskiftet, som omdanner funktionelle grupper som alkoholer og carboxylsyrer til deres respektive β -glucuronid-derivater.

Derivaterne har generelt en længere halveringstid i kroppen end de umodificerede stoffer, hvilket gør det muligt at bruge glucuronid-derivater som biomarkører, der kan udvide perioden for påvisning af et stof betydeligt. Vi mener, at GHB kan blive glucuronideret af enzymet og dermed producere et GHB-glucuronid der kan anvendes som en biomarkør med et udvidet detektionsvindue for forgiftninger med GHB.

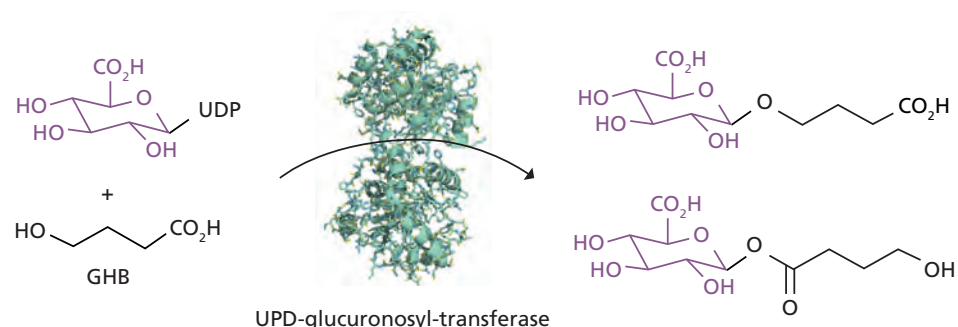


ILLUSTRATION: MALENE HALD

Antimikrobielle peptider:

Et nyt våben mod multiresistente bakterier

DER RAPPORTERES STADIGT OFTERE OM SYGDOMSTILFÆLDE, SOM SKYLDES DØDSENSFARLIGE INFEKTIONER MED MULTIRESISTENTE BAKTERIER, SOM IKKE ELLER KUN VANSKELIGT KAN BEHANDLES MED KLASSISKE ANTIBIOTIKA. DERFOR ER DER HÅRDT BRUG FOR NYE TYPER LÆGEMIDLER, SOM GØR DET SVÆRT FOR BAKTERIERNE AT UDVIKLE RESISTENS. ANTIMIKROBIELLE PEPTIDER OG STABILE SYNTETISKE ANALOGER ER EN LOVENDE MULIGHED.

Siden Anden Verdenskrig har antibiotika gjort det muligt at kurere bakterieinfektioner, som tidligere ofte var dødelige. Men i de senere år er virkningen af antibiotika faldet stærkt, fordi bakterierne i stigende omfang har udviklet resistens. I dag flourer der mange steder i verden bakterier, som er modstandsdygtige over for næsten alle kendte antibiotika, og selv om de fleste multiresistente bakterier stadig kan elimineres med et enkelt lægemiddel eller to, vil de ofte nå at slå patienten ihjel, inden lægerne får fundet frem til netop det antibiotikum, der virker.

Der er flere årsager til de stigende problemer med multiresistens. Den væsentligste grund er et overforbrug af de mest effektive lægemidler, for jo mere antibiotika befolkningen bruger, jo bedre muligheder får bakterierne for at mutere og udvikle resistens. Et andet problem er forkert brug

af antibiotika, hvor patienten ikke gør kuren færdig. På den måde dræber lægemidlet de følsomme bakterier, mens de mest modstandsdygtige bakterier overlever og formerer sig i kroppen. Antibiotika til behandling af infektioner hos mennesker anvendes desuden i udstrakt grad i dyreproduktionen med deraf følgende risiko for, at kød og visse andre fødevarer bliver forurenet med multiresistente bakterier.

Desværre er udviklingen af nye våben i det medicinske arsenal imod bakterier nærmest gået i stå, fordi det er urentabelt for medicinalindustrien at investere store summer i forskning i nye antibiotika. Det har nemlig gentagne gange vist sig, at mikroorganismen hurtigt udvikler resistens imod et nyt antibiotikum efter dets lancering i klinikken, og hvis et antibiotikum bevarer sin virkning gennem en længere periode, kurerer lægemidlet hurtigt patienterne, som

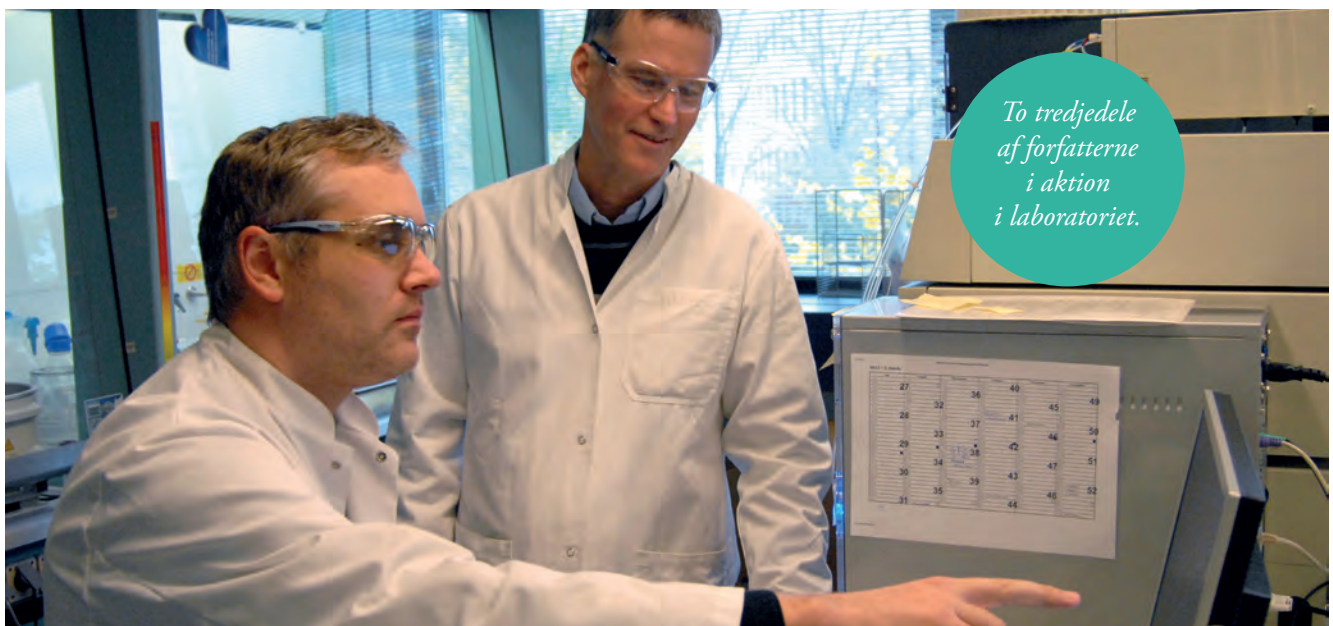
FORFATTERE

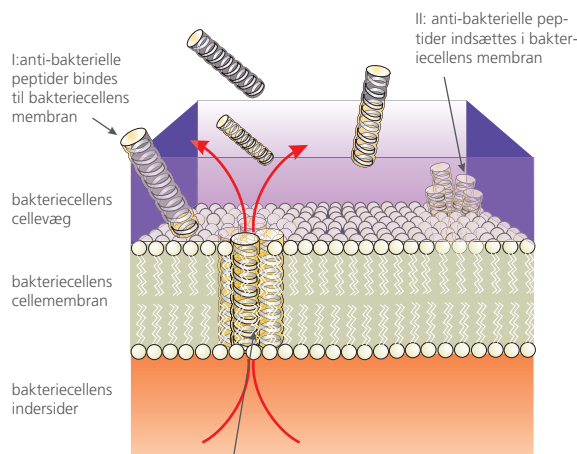
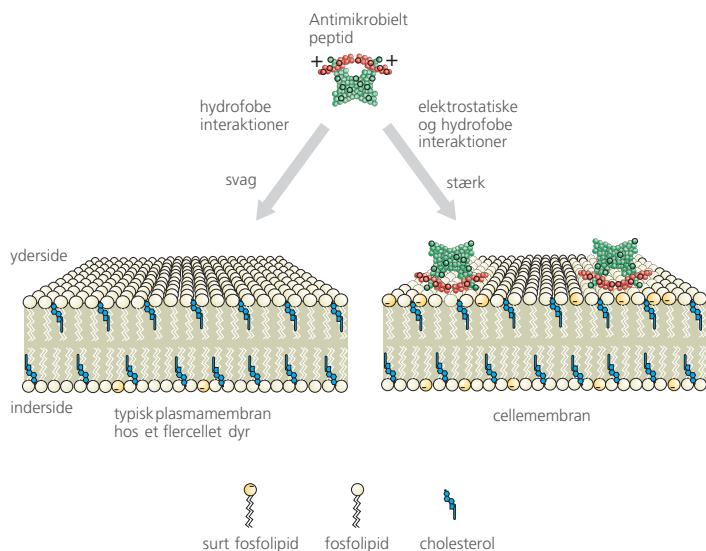
Cand.scient. Jens K. Munk er ph.d.-studerende på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi

Ph.d. Paul R. Hansen er lektor på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi

Ph.d. Henrik Franzyk er lektor på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi

FOTO: TOMMY PANDURO





Venstre: I humane celler er cellemembranens yderside elektrisk neutral. Positivt ladede antimikrobielle peptider binder sig kun svagt til membranen og skader derfor ikke cellerne. Ydersiden på bakterielle cellemembraner indeholder negativt ladede grupper, hvorfor de positivt ladede peptider binder sig stærkt til membranen. **Højre:** Peptiderne maser sig ind i membranen og danner porer, som punkterer bakteriecellen

ILLUSTRATION: JENS BØGESKOV

derpå ikke længere har brug for medicinen. Derimod opnår den farmaceutiske industri en langt større indtjening ved at udvikle lægemidler, der anvendes til behandling af kroniske sygdomme som fx diabetes i resten af patientens levetid.

Disse fakta betyder tilsammen, at antallet af effektive antibiotika efterhånden er blevet dramatisk lavt, samt at der kun sjældent introduceres nye antibiotika. Tendensen bringer patientsikkerheden i fare, hvilket tydeligt

ses i statistikkerne, hvori der optræder et stigende antal dødsfald som følge af simple infektioner, som tidligere let kunne behandles. Nu er der risiko for, at sådanne infektioner igen kan blive »betydelige dræbere« på linje med kræft og hjerte-kar-sygdomme.

ANTIMIKROBIELLE PEPTIDER – EN UNIVERSEL FORSVARSTRATEGI

Det er således vigtigt, at udvikle helt nye typer lægemidler, som bakterierne får svært ved at udvikle resistens imod. Her er antimikrobielle peptider (AMP) et godt bud. Alle planter, dyr og mennesker danner antimikrobielle peptider, der indgår i det medfødte immunsystem, som er vores væsentligste forsvar imod bakterieangreb.

Alle klassiske antibiotika vekselvirker med specifikke mål molekyler i bakterierne, og derfor er der altid en risiko for, at bakterierne muterer og ændrer mål molekylet, hvorved de opnår resistens. Antimikrobielle peptider aggregerer og destabiliserer (og danner evt. porer i) bakteriens cellemembran. Bakterier har meget svært ved at udvikle resistens imod denne mekanisme, fordi det kræver en omstrukturering af hele cellemembranen, hvilket forudsætter, at et stort antal gener muterer samtidigt. Derfor ses resistensudvikling over for antimikrobielle peptider sjældent til trods for, at de har været til stede under det meste af evolutionen.

Klassen af positivt ladede antimikrobielle peptider er særligt interessante som mulige nye lægemidler, da de selektivt kan vekselvirke med mikroorganismers negativt ladede cellemembraner, mens peptiderne ikke binder sig i nær samme omfang til humane celler, hvor cellemembranens yderside er næsten neutral.

PRINCIPPET I FASTFASESYNTESE

Ved fastfasesyntese fremstilles peptider ved at sætte aminosyrerne sammen som byggesten. Den første aminosyre bindes til uopløselige polymerpartikler, hvorpå de øvrige aminosyrer påsættes én for én, indtil peptidkæden er færdig. Metoden kan med fordel automatiseres.

1

linker

OH

aktivt reagens

2

N⁺-debeskyttelse

3

Kobling

Debeskyttelse

Fraspaltning med syre og isolering

4

Trin 1: Påsætning af den første aminosyre på den uopløselige polymer

I alle aminosyrebyggesten er α-aminogruppen beskyttet med en beskyttelsesgruppe, som kan fjernes med en base (gul □). Såfremt aminosyrens sidekæde er reaktiv, må denne beskyttes med en beskyttelsesgruppe (rød Δ), som er spaltbar med syre, og som først fjernes efter endt syntese. Carboxylsyren i den aminosyrebyggesten, som skal bindes til polymeren, omdannes nu på stedet til en aktiveret ester ved hjælp af et aktiveringsreagens. Byggestenen reagerer herefter med den frie aminogruppe på den uopløselige polymer og danner en amidbinding.

Trin 2: Påsætning af den næste aminosyre

α-Aminobeskyttelsesgruppen fjernes med en base, og den nye aminosyrebyggesten kobles på.

Trin 3: Peptidet opbygges trin for trin

Denne cyklus med afbeskyttelse og kobling gentages, indtil det ønskede peptid er fremstillet.

Trin 4: Peptidet frigøres

Peptidet spaltes fra polymeren med syre samtidigt med, at sidekædernes beskyttelsesgrupper (røde Δ) fjernes. Endelig udfældes peptidet i æter og frysetørres, hvorpå det er klar til endelig oprensning.

ILLUSTRATION: MALENE HALD

SYNTEKISKE ANALOGER AF ET PEPTID FRA HVEPSE

Et eksempel er det positivt ladede peptid anoplin, som er isoleret fra en japansk hveps. Anoplin virker specifikt imod bakterier og anses derfor for at være et godt udgangspunkt for udvikling af antibiotika. Vores forskning er målrettet en optimering af de egenskaber, som det naturlige peptid har. Således forsøger vi at øge specificiteten for Gram-negative bakterier, primært *Escherichia coli*, fordi visse multiresistente stammer af kolibakterier udgør et betydeligt sundhedsproblem. Samtidig vil det være fordelagtigt, hvis den terapeutiske dosis kan nedbringes ved at forbedre peptidets evne til at slå bakterier ihjel. Naturlige antimikrobielle peptider har typisk en kort levetid i kroppen, fordi de nedbrydes af enzymer i blodet, hvilket begrænser deres medicinske anvendelighed. Analogier med bedre stabilitet har derfor større potentiale som lægemidler. Forskellige modifikationer kan øge stabiliteten, fx inkorporering af unaturlige aminosyrer. Det er aminosyrer, som ikke indgår i det alfabet af 20 naturlige aminosyrer, som alle proteiner og peptider i levende organismer er opbygget af.

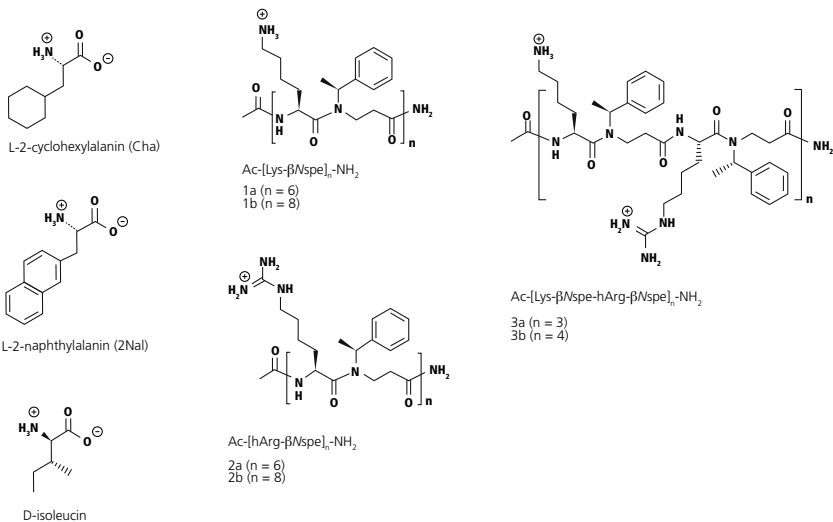
FASTFASESYNTSE AF PEPTIDANALOGER

Vi fremstiller syntetiske analoger af anoplin ved hjælp af fastfasesyntese. Her bindes den første aminosyre til små partikler af en fast polymer hvorpå peptidet opbygges ved at påsætte én aminosyre ad gangen. På den måde har vi fremstillet og karakteriseret en række nye analoger af anoplin.

Desuden har vi syntetiseret adskillige peptidanaloger med et nyt molekyllært design bestående af skiftende aminosyrer og peptoidenheder, hvor sidekæderne er placeret på nitrogenatomet i stedet for på carbonatomet imellem amino- og carboxylgruppen. Ved sådanne organisk-kemiske synteser har vi erstattet en eller flere naturlige aminosyrer med unaturlige byggesten, hvilket gør analogerne langt mere stabile over for kroppens nedbrydningsprocesser.

HØJ EFFEKT, LAV TOKSICITET

Ud over at et nyt antibiotikum skal være effektivt til at dræbe bakterier, er det afgørende, at stoffet ikke skader kroppens egne celler som fx de røde blodceller. Bestemmelse af denne effekt indgår derfor i evaluering



gen af mulig toksicitet. Kun peptider med lav tilbøjelighed til at ødelægge blodcellerne set i forhold til deres antibakterielle aktivitet undersøges nærmere. Så testes peptidets evne til at forhindre vækst af mange forskellige sygdomsfremkaldende bakteriestammer. Hvis disse resultater er lovende, afprøves peptiderne i mus for at sikre, at dyrenes organer ikke tager skade af behandlingen. Disse studier kan føre til, at stofferne senere testes i kliniske studier. Vi har undersøgt de syntetiske peptiders evne til at stoppe vækst af fire forskellige bakterier, heraf to Gram-positive, methicillin-resistent *Staphylococcus aureus* og vancomycin-resistent *Enterococcus faecium*, samt to Gram-negative bakterier, *Escherichia coli* og *Pseudomonas aeruginosa*.

Peptidanaloger med et nyt molekyllært design bestående af skiftende α-aminosyrer og β-peptoidenheder udviser god effekt på både Gram-positive og Gram-negative bakterier. Test på sårinficerende stafylokokker, *S. aureus* og *S. epidermidis*, samt de fødevarerelaterede *E. coli* og *Listeria monocytogenes* har vist, at de nødvendige minimumsdoser ligger på 1-8 µg/mL. Endvidere giver dette design fuld stabilitet over for enzymatisk nedbrydning i kroppen samt minimal tendens til ødelæggelse af røde blodceller.

Det mest lovende af vore antimikrobielle peptider er bakteriedræbende ved en koncentration, som er 100 gange lavere end den koncentration, som kan skade humane celler. Det vil dog tage mange års udvikling, før disse syntetiske analoger vil kunne bruges til at behandle mennesker, men potentielt kan morgendagens antibiotikum være afledt af peptidet anoplin fra hvepsgift eller bestå af skiftende α-aminosyrer og β-peptoidenheder. •

Venstre: Eksempler på unaturlige aminosyrer. I midten og til højre: Eksempel på en peptidanaloger med en unaturlig "rygrad".

ILLUSTRATION: MALENE HALD

Håb om at ramme latente bakterier i deres skjul

TILBAGEVENDENDE INFEKTIONER MED MULTIRESENTENTE BAKTERIER PÅ HOSPITALER OG I SAMFUNDET ER BÅDE DYRE OG RISIKABLE. EN DEL AF FORKLARINGEN PÅ BAKTERIERNES SEJLIVETHED ER, AT DE GEMMER SIG INDE I MENNESKELIGE CELLER, FX I LUFTVEJENE, HVORVED DE BÅDE UNDSLIPPER KROPPENS IMMUNFORSVAR OG MEDICINSK BEHANDLING MED ANTIBIOTIKA. VED AT KOMBINERE NOGLE AF NATURENS VÆRKTØJER TIL AT TRÆNGE GENNEM CELLEMEMBRANER KAN MAN SANDSYNLIGVIS RAMME DISSE DVÆLENDE BAKTERIER.

FORFATTERE

Cand.pharm. Jesper Bahnsen er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci.

Cand.pharm. Jorrit Water er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci.

Ph.d. Camilla Foged er lektor på Institut for Farmaci.

Ph.d. Henrik Franzky er lektor på Institut for Lægemediddesign og Farmakologi.

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

RESISTENS OG MULTIRESENTENS

Bakterier kan være resistente over for forskellige antibiotika. Nogle bakterier er modstandsdygtige fra naturens hånd, mens andre har erhvervet resistensen som følge af overdreven eller forkert brug af antibiotika til behandling af mennesker og husdyr.

Hvis en bakterie er resistent over for mindst tre forskellige typer antibiotika, defineres bakterien som multiresistent. Et eksempel er Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), som er en multiresistent version af gule stafylokokker, og som ikke kan uskadeliggøres af de mest almindelige antibiotika. I nogle tilfælde kan MRSA-bakterier kun nedkæmpes med vancomycin, og i udlandet har man fundet stafylokokker, som også modstår dette våben – et af de sidste i lægernes nuværende medicinske arsenal.

En overraskende stor andel på 30-50 procent af den raske befolkning bærer *S. aureus* uden at have sygdomssymptomer. Disse raske smittebærere kan imidlertid videregive smitten ved fysisk kontakt med sygdomsvækkede personer. Stafylokokkerne kan passere ind gennem cellemembranen på de epitelceller, som danner overfladen af luftvejene, og på den måde komme uden for rækkevidde af både kroppens immunforsvar og de fleste former for antibiotika. Disse latente bakterier kan blomstre op igen på et senere tidspunkt og medføre sygdom.

ANTIMIKROBIELLE PEPTIDER – KROPPENS EGNE ANTIBIOTIKA

Når immunforsvaret registrerer invaderende bakterier, aktiveres en række signaler for at få kroppen til at nedkæmpe den udefra kommende trussel. Et af immunsystemets modtræk er at producere og udskille antimikrobielle peptider på infektionsstedet. Antimikrobielle peptider er korte, positivt ladede aminosyresekvenser, som danner huller i bakteriernes cellemembraner, hvorpå bakterierne dør.

Antimikrobielle peptider findes både i primitive organismer som svampe og amøber og i højt udviklede pattedyr inklusive mennesker. Gennemhulningen af den bakterielle cellemembran sker på en sådan måde, at det kun i meget ringe grad er muligt for bakterien at modvirke dette og derved udvikle resistens. En af de vigtigste indikationer på dette er netop, at næsten ingen bakterier er modstandsdygtige overfor disse peptider, selv om de har været til stede i vidt forskellige organismer gennem flere millioner års evolution. Denne iagtta-

gelse underbygges af, at laboratorieforsøg viser, at antimikrobielle peptider rent faktisk kan slå multiresistente stafylokokker ihjel. Når kroppens egne antimikrobielle peptider ikke konsekvent nedkæmper enhver infektion, skyldes det, at bakterierne ofte formerer sig så hurtigt, at immunforsvaret – især hos svækkede personer – ikke kan følge med. Balancen kan imidlertid ændres til patientens fordel, hvis syntetiske antimikrobielle peptider tilføres kroppen som et ekstra våben imod bakterierne.

CELLEPENETRERENDE PEPTIDER – NATURENS HOVEDNØGLE

Stafylokokkers evne til at krydse cellemembranen er med til at gøre infektionerne vedvarende og ekstra skadelige for den ramte. For helt at udradere en intracellulær infektion er det imidlertid ikke tilstrækkeligt at behandle patienten med et effektivt traditionelt antibiotikum. Det er lige så vigtigt, at man kan transportere lægemidlet ind i de celler, hvor det skal virke. Hvis man råder over et antibiotikum, som kan nedkæmpe multiresistente stafylokokker, men som ikke ved egen hjælp kan nå frem til de intracellulære bakterier, findes der heldigvis lovende værktøjer, som kan hjælpe lægemidlet på vej.

På samme måde som antimikrobielle peptider kan dræbe bakterier ved at danne huller i dem, findes andre naturlige peptider, som kan transportere store molekyler tværs gennem ellers uigennemtrængelige cellemembraner. Disse peptider kaldes for cellepenetrerende peptider. Et markant eksempel findes hos bananfluer, hvor et cellepenetrerende peptid bestående af kun 16 aminosyrer udgør en del af et meget større protein. Den korte peptidsekvens muliggør

den nødvendige transport af proteinet ind i visse celler i bananfluens hoved under dets tidlige udviklingsstadier. Hvis man ved hjælp af genteknologi fjerner proteinet eller hindrer det i at krydse cellemembranen, udvikler bananfluen ben på hovedet i stedet for følehorn.

Egenskaberne af netop dette peptid er blevet grundigt undersøgt, og forskere har udnyttet peptidet som et værktøj ved kloning, hvor arvemateriale skal føres ind i en celle, eller til at øge optaget af proteinlægemiddelstoffer hen over det epitelcellelag, der udgør de indre overflader af luftvejene og mave-tarmkanalen.

EN GYLDEN KOMBINATION

Både antimikrobielle og cellepenetrerende peptider er relativt korte – de består af 10 til 30 aminosyrer – og de har en positiv nettoladning, som sætter dem i stand til at binde sig til bakteriers negativt ladede cellemembraner. De to grupper af peptider antager oftest en ordnet, foldet struktur som fx en helix, når de baner sig vej gennem cellemembranerne. Disse fællestræk gør, at man også har set virkninger på tværs af de to peptidgrupper, idet visse cellepenetrerende peptider kan dræbe bakterier, mens nogle antimikrobielle peptider kan trænge gennem humane cellemembraner uden at skade dem. Ved at udnytte denne krydsfunktionalitet, kan man syntetisere peptider, som både kan krydse de humane cellemembraner og dræbe latente bakterier, der skjuler sig inde i cellerne.

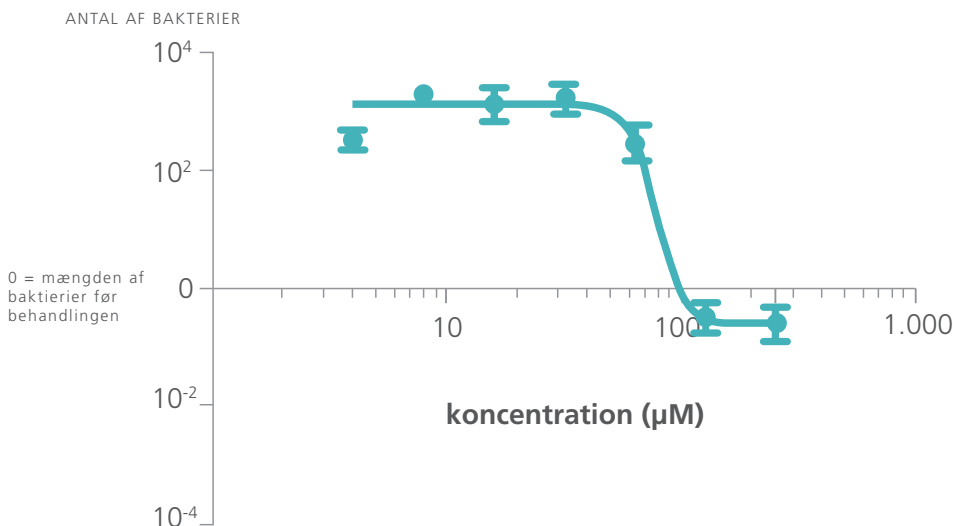
For at teste peptidernes evne til at dræbe intracellulære bakterier, har vi udført

sådanne eksperimenter i cellekulturer, hvor humane celler inficeres med stafylokokker, som trænger ind i cellerne. I forsøgene testede vi en syntetisk version af det cellepenetrerende peptid penetratin fra bananfluer for dets evne til at dræbe stafylokokker, der gemte sig i celler, som stammer fra de menneskelige luftveje. Ved anvendelse af koncentrationer på over 100 μM penetratin var der 75 procent færre levedygtige bakterier tilbage 24 timer efter, at vi havde påført peptidet, end før behandlingen. Bakteriernes vækst blev med andre ord hæmmet effektivt. I den videre forskning optimeres strukturen af peptiderne hen imod en bedre kombination af såvel evnen til cellepenetration som den antibakterielle effekt.

HURTIGT SMITTESTOP MED NÆSESPRAY

Et fremtidigt peptidbaseret lægemiddel med evne til at trænge ind i humane celler og dræbe latente bakterier inde i cellerne kan fx indgives med en næsespray. Et sådant antibiotikum vil gøre det muligt at stoppe MRSA-spredning på sygehuse ved at lade personalet, de pårørende, og ikke-synligt-inficerede patienter benytte næsesprayen. På den måde vil et sygdomsudbrud som følge af multiresistente stafylokokker hurtigt kunne begrænses til de ramte patienter ved at fjerne risikoen for, at symptomfrie smittebærere inficerer andre modtagelige patienter på afdelingen. De inficerede patienter isoleres, indtil infektionen er slået ned.

Behandlingen med næsesprayen vil næppe medføre risici, fordi peptider er naturligt forekommende biologiske molekyler, som hurtigt nedbrydes af enzymer i



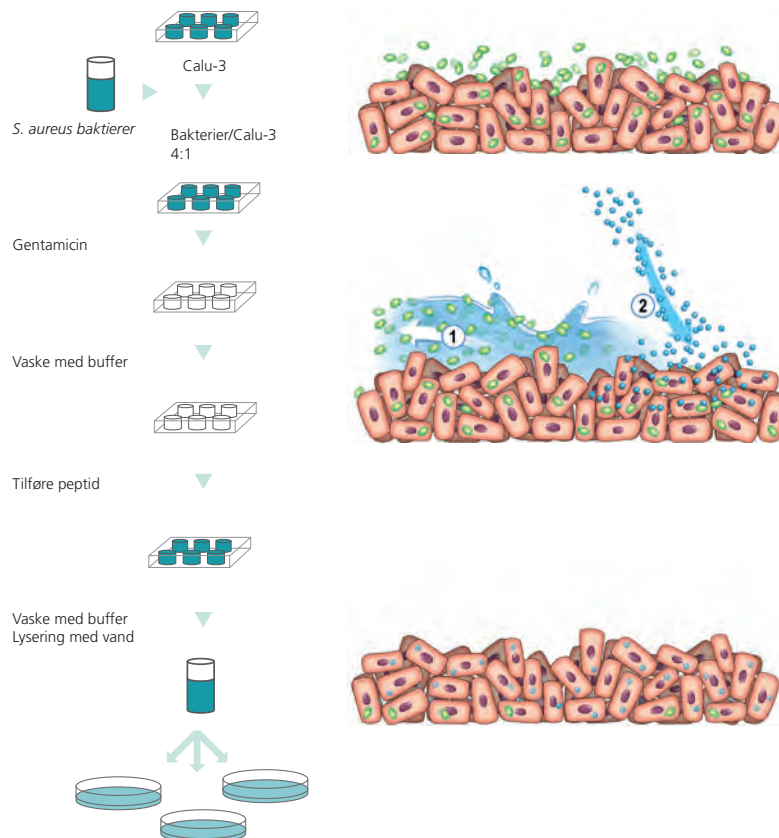
Grafen viser drab af latente stafylokokker i humane luftvejsceller ved hjælp af penetratin. Y-aksen repræsenterer antallet af tilbageværende bakterier, der kan danne en koloni på en agarplade efter 24 timers behandling med peptid. X-aksen viser koncentrationen af penetratin i μM . Der sker intet bakterielt drab ved koncentrationer lavere end 30 μM . Først ved omkring 65 μM ses et betydeligt drab af bakterierne. Ved koncentrationer over 100 μM er der færre levedygtige bakterier, end da peptidet blev påført. Væksten er således blevet effektivt hæmmet.

ILLUSTRATION: MALENE HALD

Det cellepenetrerende peptid penetratin kan dræbe stafylokokker, som er gået i dvale inde i dyrkede humane luftvejsceller (Calu-3). Tegningen viser forsøgsopstillingen. Først lader vi stafylokokkerne trænge ind i bakteriecellerne. Derefter fjernes alle ekstracellulære bakterier via vask med en buffer, som indeholder et antibiotikum, gentamicin, der ikke trænger ind i luftvejscellerne men dræber ekstracellulære bakterier. Så tilføres peptiderne. Efter 24 timer opløses lungecellerne, og celleindholdet spredes ud på agarplader, hvor man efter en passende inkubationstid kan tælle, hvor mange levedygtige bakterier, der var tilbage i de peptidbehandlede celler.

"I første trin ses cellelaget, der er ved at blive inficeret med Staphylococcus aureus vist som grønne prikker. Næste trin viser (1) skylning af cellerne og rensning med gentamicin efterfulgt af (2) påførsel af de aktive stoffer på cellelaget. I sidste trin er en del af det aktive stof trængt ind i cellerne og har dræbt de intracellulære bakterier."

ILLUSTRATION: HENNING DALHOFF
ILLUSTRATION: MALENE HALD



blodet. Derfor vil peptiderne aldrig nå ud i blodbanen, hvilket gør behandlingen lokal i luftvejene, så man slipper for unødigt belastning af ikke-inficeret væv.

ANTIMIKROBIELLE PEPTIDER I PARTIKELFORM

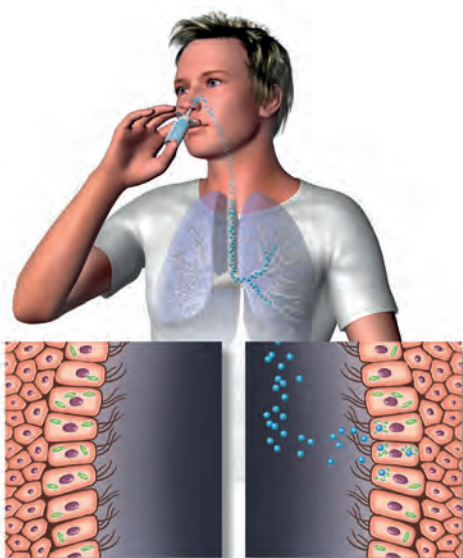
Hvis peptidbaserede lægemiddelstoffer skal ud i blodet og virke i hele kroppen, kan de sammensættes på forskellige måder med henblik på at beskytte dem imod enzymatisk

nedbrydning. En mulighed er at indbygge lægemiddelstoffet i nanopartikler. Partiklen fungerer som en beskyttende barriere omkring lægemiddelstoffet og muliggør derved anvendelse af peptider til systemisk behandling. Desuden kan partiklerne fremstilles i en så lille størrelse, at der åbnes mulighed for, at de kan optages hele og uændrede gennem cellemembranerne.

Ydermere er det muligt at modificere overfladen af partiklerne. Man kan eksempelvis fastgøre antistoffer på overfladen, som specifikt målretter partiklerne mod den type celler, hvor de latente bakterier gemmer sig. Samtidig kan den cellulære optagelse øges ved at fastgøre cellepenetrerende peptider til overfladen. En sådan målsøgende partikel kan udstyres med en indre last af antimikrobielle peptider, som frigives inde i cellen, hvor peptiderne kan dræbe bakterierne. Alt i alt giver kombinationen af antimikrobielle peptider og cellepenetrerende peptider mange forskellige muligheder for at behandle intracellulære infektioner, som er uden for rækkevidde af immunforsvaret og klassiske antibiotika som penicillin. •

Fremtidsvisionen: Cellepenetrerende antimikrobielle peptider indtaget som næsespray dræber latente bakterier, som gemmer sig indeni cellerne i luftvejene. Hvis personalet på en hospitalsafdeling, ikke-inficerede patienter og de pårørende til meget svækkede patienter benytter næsesprøgen, bliver det sandsynligvis muligt at udrydde multiresistente stafylokokker på afdelingen, fordi behandlingen fjerner risikoen for, at svækkede patienter inficeres af symptomfrie smittebærere. De inficerede patienter isoleres og behandles separat.

ILLUSTRATION: HENNING DALHOFF





Kroniske smerter forringer livskvaliteten markant.

Kombinationsbehandling kan lindre smerter effektivt med beskedne bivirkninger.

Kombinationslægemiddel reducerer bivirkningerne ved smertebehandling

KOMBINATIONSLÆGEMIDLER, SOM INDEHOLDER TO ELLER FLERE AKTIVE LÆGEMIDDELSTOFFER, HAR OFTE GOD EFFEKT OG MEDFØRER KUN BESKEDNE BIVIRKNINGER, MEN DE ER EKSTRA DYRE AT FÅ GODKENDT. NYE FORSØG MED KOMBINATIONSBEHANDLING AF PATIENTER MED KRONISKE NERVESMERTER LEVERER GODE ARGUMENTER FOR AT LETTE MARKEDSADGANGEN FOR KOMBINATIONSTERAPI.

FORFATTERE

Dr.med. Ole Jannik Bjerrum er professor på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Ph.d. Anna Basnet er apoteksfarmaceut.

Ph.d. Per H. Honoré er professor på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Stud.pharm. scient. Yvonne Gautam er specialestuderende på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Virkelig effektiv behandling af mange kroniske sygdomme kræver kombinationer af flere lægemidler, og før den industrielle lægemiddeludvikling tog fart, var al medicinsk behandling baseret på blandinger. Der eksisterede simpelt hen ikke metoder til at adskille komponenterne i de droger – oftest planteekstrakter – som patienterne blev behandlet med. Selv efter introduktionen af kemisk syntetiserede lægemidler omkring år 1900 blev kombinationer ved med at være populære. I 1960'erne viste undersøgelser

imidlertid, at indholdstofferne i kombinationspræparater nogen gange kan modvirke hinanden, og derfor stillede myndighederne omkring 1970 krav om monoterapi. Her udvikles et enkelt lægemiddelstof til at påvirke et specifikt målmolekyle i kroppen – dvs. en receptor eller et enzym, som indgår i de biokemiske processer, der forårsager i sygdommen – og dette stof doseres alene.

Myndighederne, som regulerer tilgangen af nye lægemidler til markedet, har fremmet tendensen ved at stille så store krav til godkendelse af kombinationspræparater,

ROTTEMODEL FOR NEUROPATISKE SMERTER

På gnavere deler iskiasnerven sig midt på låret af bagbenet i tre grene, der groft sagt forsyner låret og hver sin side af benet nedenfor med sensoriske nerver. Ved at overskære to af grenene og kun bevare den del, som innervierer ydersiden af benet og poten, bliver nervens innervationsområde hypersensitivt. Det vil sige, at smertetærsklen nedsættes i området.

Ved forsøgene findes rottens smertetærskel ved at berøre poten med hår med varierende tykkelser. Når håret prikker til poten, trækker rotten poten til sig, hvis berøringen generer den. Trykket i det hår, som udløser tilbagetrækning af poten, kan bestemmes overraskende præcist. Bøjer håret, uden at rotten løfter poten, er det tegn på, at rotten enten ikke mærker påvirkningen eller ikke besværes af den.

Kalibreringen af den kraftpåvirkning, de forskellige hår overfører, bestemmes separat og måles i Newton eller gram. Indgift af smertestillende stoffer vil flytte tærsklen for observeret tilbagetrækning opad.

TEST FØLSOMHEDEN

Rotters følsomhed overfor smerte kan testes ved at berøre en pote med hår af forskellige tykkelser. Når berøringen generer rotten, trækker den poten til sig.

at det bliver uforholdsmæssigt dyrt for den farmaceutiske industri at udvikle dem. Alligevel har brugen af faste kombinationer været sejlivet; så sent som i 1981 var der 37 kombinationer på det danske marked indenfor smertebehandling. Nye krav, som gik ud på, at samtlige stoffer i et kombinationslægemiddel skulle have smertelindrende virkning, samt at varigheden af deres effekt skulle være omtrent ens, har siden reduceret udbuddet til 11 præparater.

20 TABLETTER OM DAGEN

De mange enkelt doseringer medfører et problem, kaldet polyfarmaci. Det er nemlig ikke ualmindeligt, at ældre patienter tager op til 20 forskellige tabletter dagligt fordelt over morgen, middag og aften. Det er ikke altid let at holde styr på alle pillerglassene, når hukommelsen og motivationen ikke er, hvad den har været, og det fører ofte til fejlmedicinering.

Samtidig er det blevet vanskeligere, at finde nye monoterapier, der har tilstrækkelig virkning på de sygdomme, som vi ikke har effektiv medicin for i dag. Det ses af udviklingen i den farmaceutiske industri. På trods af, at medicinalfirmaerne bruger flere og flere forskningsmidler – for øjeblikket over 50 milliarder \$ årligt på verdensplan – er introduktionen af nye lægemidler stagnerende, og der lanceres kun omkring 20 nye innovative præparater om året. Andre såkaldte nye lægemiddelstoffer repræsenterer blot en marginalt forbedret behandling og er således ikke radikalt nye lægemidler.

Derfor er der brug for nye tiltag, og vore studier i forskningsgruppen for Systemfarmakologi har ledt os frem til at værdsætte nytten af kombinationsterapi. Vores mål er at finde nye og bedre behandlinger af kroniske smertetilstande. Det gælder især neuropatiske smerter, også kaldet kroniske nervesmerter. Hos mange patienter er nervesmerterne vanskelige at behandle effektivt med monoterapeutiske lægemidler uden alvorlige bivirkninger, og det forringer i høj grad patienternes livskvalitet.

Der findes gode sygdomsmodeller for neuropatiske smerter, som kan påføres mus og rotter. Vi anvender en rottemodel, hvor en operation forøger rottens følsomhed overfor berøring af poten med et hår. En tilsvarende overfølsomhed overfor berøring er karakteristisk for patienter med neuropatiske smerter. Rottemodellen gør det muligt at

bestemme den smertestillende effekt af både kendte lægemiddelstoffer og helt nye stoffer.

FASTE KOMBINATIONER AF LÆGEMIDDELSTOFFER

Efter etablering og validering af rottemodellen indledte gruppen en systematisk undersøgelse af behandling med kombinationer af eksisterende lægemidler, som ud fra deres virkning kunne tænkes at påvirke smertetærsklen. Teoretisk vil en sådan kombinationsbehandling kunne udvise antagonistisk, additiv, synergistisk eller koaktiv effekt. Hvis stofferne medfører dosisafhængige bivirkninger, som er forskellige for de to stoffer, vil en additiv virkning ved den halve dosis af stofferne givet i kombination resultere i den samme smertelindrende effekt som en fuld dosis et af stofferne, men med mindre bivirkninger. Teoretisk set en halvering.

En kombination af lægemidlerne gabapentin og donepezil viste overraskende gode resultater i rottemodellen. Gabapentin bruges som førstegangsvælg ved behandling af neuropatiske smerter. Donepezil virker på Alzheimers sygdom, hvor stoffet hæmmer det vigtige enzym acetylcholinesterase, hvilket fra en teoretisk betragtning også kan dæmpe smerter. Rotteforsøgene viste en stærk synergistisk effekt af denne kombination. Når stofferne blev indgivet hver for sig, kunne begge stoffer fuldstændigt hæmme den smertefulde hypersensitivitet ved doser på 3 mg/kg for donepezil og 100mg/kg for gabapentin. Ved disse doser trak rotterne således først poten til sig ved prikning med et 20 grams hår, hvilket svarer til responset hos normale, ikke-opererede dyr.

Kombinationsbehandlingen gav fuld smertelindring ved langt mindre doser – 0,5 mg/kg donepezil kombineret med 30 mg/kg gabapentin. Effekten af 0,5 mg/kg donepezil alene kunne slet ikke måles på dyrene, og 30 mg/kg gabapentin gav allerede potetilbagetrækning ved påvirkning med et 5 grams hår. Synergieffekten kan således beregnes til at være ca. tre gange.

FÆRRE BIVIRKNINGER HOS PATIENTER

Hos mennesker har gabapentin kraftige bivirkninger i form af stærk søvntræng og forekomst af ufrivillige bevægelser ved de normalt anvendte behandlingsdoser på 30-50 mg/kg. Patienterne udholder dog disse generende bivirkninger, fordi nervesmerterne oftest er et endnu værre onde.

Da bivirkningerne er proportionale med dosis, vil en reduktion af dosis op til tre gange kunne gøre bivirkningerne tålelige samtidig med, at den synergistiske smertedæmpning stadig vil være optimal.

Kombinationen af gabapentin og donepezil har aldrig før været anvendt på patienter, og vi kunne således ikke vide med sikkerhed, om dyreforsøgene var prædiktive for behandling af mennesker. Derfor ansøgte vi myndighederne om tilladelse til at udføre et klinisk forsøg på neuropatiske smertepatienter med den fundne lægemiddelskombination.

Tilladelsen blev givet, og forsøget blev gennemført åbent, hvilket vil sige, at patienterne vidste, hvornår de overgik til kombinationen, men ikke hvad de skulle forvente. I første omgang indrulleredes ti patienter med neuropatiske smerter efter nerveskader, hvoraf seks gennemførte hele forsøget. Først blev patienterne behandlet med individuel dosering af gabapentin op til 2400 mg dagligt i seks uger, hvorefter der blev lagt 5 mg donepezil oveni i yderligere seks uger. Patienterne blev smertetestet tre gange; før og efter gabapentinbehandlingen og til sidst efter kombinationsbehandlingen. Resultaterne viste en sikker smertedæmpende effekt af tilført donepezil målt på en række smerteparametre.

Forsøgsdesignet tillod ikke at påvise synergistisk effekt, men fem af de seks patienter rapporterede lavere smerteniveau efter tillægget med donepezil. En syvende patient, som blev behandlet uafhængigt af forsøget med 5 mg donepezil dagligt, nedtrappede sin dosis af gabapentin fra 30 mg/kg til 15 mg/kg. Denne patient bevarede sin fulde smertedækning, mens bivirkningerne blev reduceret markant. De ufrivillige bevægelser forsvandt, og søvnbehovet faldt fra 12 timer til 9 timer i døgn.

OPRÅB TIL MYNDIGHEDERNE

Hvorfor forskes der så lidt i kombinationsbehandlinger? Det kan undre, fordi både litteraturen og det omtalte eksempel på kombinationsbehandling viser, at det er muligt opnå en bedre virkning og færre bivirkninger end ved en traditionel behandling med et enkelt lægemiddel i højere doser.

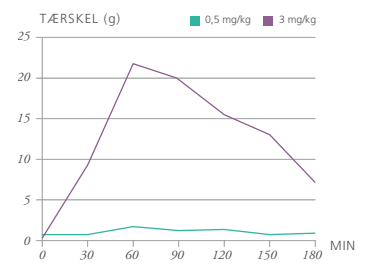
Imidlertid mener sundhedsmyndighederne stadig basalt set, at opdagede kombinationsmuligheder skal behandles med monoterapi, dvs. lægen skal give stofferne

enkeltvist. Ansvar for at kombinere lægemidlerne lægges således over på lægen, som må ordinere kombinationerne som to gange monoterapi.

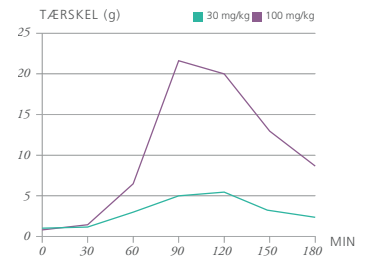
Årsagen til myndighedernes fastholdelse af monoterapidogmet er formentlig friheden til at tilrettelægge en individuel dosering og vanskeligheder i at overskue konsekvenserne af udbredt brug af kombinationer. Derfor kræver det uforholdsmæssigt store kliniske undersøgelser at få godkendt kombinationstabletter i faste doseringer til markedsføring, selvom de findes indenfor behandling af fx kræft, infektioner og forhøjet blodtryk. Denne politik hæmmer en videre udbredelse af faste kombinationsbehandlinger, som ellers kunne være til gavn for mange patienter.

Der er kun en vej frem, hvis der skal udvikles nye effektive kombinationsbehandlinger eller opnås en minimering af bivirkningerne via faste kombinationer af eksisterende lægemidler. Det er fremskaffelse af tilstrækkelig mange forskningsbaserede argumenter for brug af kombinationer i klinisk praksis. Kun på den måde vil det blive muligt at overbevise de regulerende myndigheder, dvs. Sundhedsstyrelsen i Danmark og European Medicines Agency i EU, om rationalet bag brugen af kombinationsterapi. Først hvis det lykkes, bliver det økonomisk overkommeligt for lægemiddelindustrien at udvikle kombinationslægemidler. I den sammenhæng kan farmaceuter som faglige eksperter indenfor netop de regulatoriske aspekter af lægemiddelfremstilling spille en vigtig rolle ved at forske indenfor den regulatoriske videnskab. •

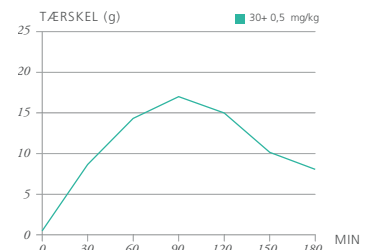
GABAPENTIN



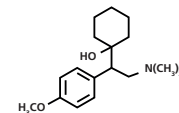
DONEPEZIL



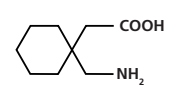
KOMBINATION



DONEPEZIL



GABAPENTIN



Lægemidlerne donepezil og gabapentin blev testet hver for sig og i kombination i vores rottemodel for neuropatiske smerter. Kurverne viser den smertedæmpende effekt over tid efter indsprøjtning af lægemidlerne.

(A) Donepezil; (B) Gabapentin og (C) begge stoffer samtidigt. Y-aksen viser tærsklen for potetilbagetrækning målt med von Frey hår, hvor antallet af gram angiver påvirkningskraften ved prikning med håret. Normale rotter reagerer med potetilbagetrækning ved ca. 15 gram. X-aksen viser tiden i minutter efter indgift af lægemidlerne i de opererede rotter. Halvanden time senere opnås fuld smertedæmpning med både donepezil og gabapentin ved doser på henholdsvis 3 mg/kg og 100 mg/kg.

Samme smertedækning kan også opnås med dosering af kun 0,5 mg/kg donepezil og 30 mg/kg gabapentin i kombination. De to lægemidler forstærker altså hinandens virkning via en synergistisk effekt.

ILLUSTRATION: MALENE HALD

Blå medicin mod smerter

FARVESTOFFET METYLENBLÅT ER I MERE END 140 ÅR BLEVET ANVENDT TIL DIAGNOSTIK OG BEHANDLING AF EN LANG RÆKKE SYGDOMME, MEN ENDNU ALDRIG TIL SMERTELINDRING. NYE ROTTEFORSØG PEGER PÅ, AT STOFFET KAN DÆMPE BÅDE AKUTTE OG KRONISKE SMERTER.

FORFATTERE

Athanasia Boulakou er studerende på Institut for Lægemediddesign og Farmakologi.

Dr. med. Ole Jannik Bjerrum er professor på Institut for Lægemediddesign og Farmakologi.

Ph.d. Per Hartvig Honoré er professor på Institut for Lægemediddesign og Farmakologi.

Min urin er helt blå! « Brudgommen ser forskrækket ned i toiletet og spekulerer over, hvad der er sket. Han skal giftes og har været på polterabend til den tidlige morgen. Vennerne gav ham til sidst en cola at drikke for at modvirke tømmermænd. Til colaen var tilsat metylenblåt. Vennerne ved, at metylenblåt anvendes som test for nyrefunktionen, og at kraftig blåfarvning af urinen bekræfter en god funktion. Gommen aner ingenting, men til brylluppet kan vennerne med et glimt i øjet fortælle ham, at hans nyrer fungerer perfekt.

Metylenblåt har mere end en 140 årig historie bag sig siden dets patentering i 1876. I slutningen af 1800-tallet kom farvestoffet til at spille en stor rolle, fordi det både kunne farve væv og bruges til at adskille Gram-positive og Gram-negative bakterier. Samtidig kunne metylenblåt slå bakterier ihjel, og stoffet blev verdens første syntetiske antiseptikum. Paul Ehrlich anvendte også metylenblåt til succesfuld behandling af malaria. Det blå farvestof har nu et stort antal farmakologiske anvendelsesområder.

I kroppen blokerer metylenblåt for dannelsen af enzymet NO-syntase, som producerer signalstoffet nitrogenmonoxid (NO). NO medvirker til syntese af et stort antal sekundære signalstoffer, som indgår i en lang række biologiske processer inklusive smertetransmission. Dyreforsøg har nemlig vist, at NO bidrager til en forøget følsomhed overfor både inflammatoriske og neuropatiske smerter. Da metylenblåt gennem sin blokade af enzymet hæmmer NO-produktionen, var det logisk at teste for metylenblåts potentielle virkning på akutte, neuropatiske og inflammatoriske smerter.

AFPRØVNING I DYREMODELLER

Nye lægemiddelstoffer skal afprøves i dyr, før de testes på mennesker. Smertestillende lægemidler afprøves ofte på rotter, som får en kortvarig ubehagelig påvirkning, fx ved en berøring af poten med et stift hår,



TEGNING: CARIN FLENSBURG

hvorved rotten trækker poten til sig. Hos rotter kan man fremkalde en mere langvarig øgning af smertefølsomheden ved at påføre rotten en nerveskade eller inducere inflammation i en pote. Lægemidlets effekt kan derpå måles gennem dets nedsættelse af smertefølsomheden.

Afprøvningen af nye smertestillende lægemiddelstoffer følger nøje udarbejdede forskrifter fra Statens Dyreforsøgstilsyn. De vigtigste krav er, at rotterne ikke har ondt længe af gangen og at de har gode staldforhold. Induktion af akut smerte i rotter fremkaldes med mekaniske og termiske stimuli, men altid på en sådan måde, at rotten kan undslippe smerten, så snart den mærkes. Den hypersensitive tilstand neuropatisk smerte blev påført gennem nerverodsafskæring, og her fungerer rotten som en model for kroniske nervesmerter. Inflammation fremkaldtes kemisk gennem indsprøjtning i bagpoten. Ved forsøgene med metylenblåt anvendte vi forskellige metoder til at måle mekanisk hypersensitivitet og smertefølsomhed for varme. Desuden blev rotternes motoriske funktion ved bevægelse undersøgt.

REDOXKEMI MED METYLENBLÅT

Metylenblåt er en tricyklisk fenotiazin. Lægemidlet har en dybblå farve i vandig opløsning, hvor det optræder som kation og oxidant, fordi stoffets og dets reducerede leukoform danner elektron donor-acceptor-par. Metylenblåt virker som oxidant ved at fjerne elektroner fra reaktanter i redoxkemiske reaktioner. Leukoformen er farveløs.

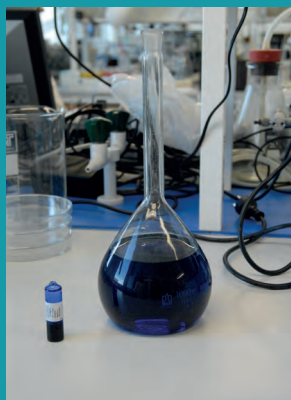
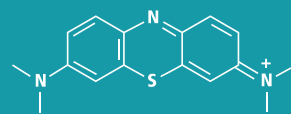


FOTO: TOMMY PANDURO

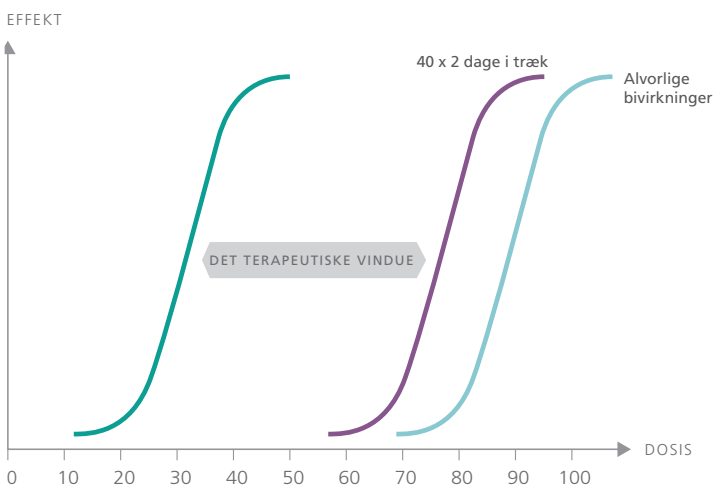
BEHANDLING AF KRONISKE SMERTER

Forsøgene viste, at smertelindring kan opnås ved doser af metylenblåt på 20-30 mg/kg. De behandlede dyr reagerede statistisk signifikant bedre end ubehandlede dyr. Ved akut smerte gjaldt dette både for mekanisk og termisk følsomhed. Ved behandling af neuropatiske og inflammatoriske smerter reducerede metylenblåt ligeledes smerterne markant.

Ved doser på 20-30 mg/kg har metylenblåt en god dosisafhængig smertestillende effekt i dyremodellerne. Højere doser giver bivirkninger i form af træthed og mavesmerter og samtidig blev rotternes motoriske aktivitet negativt påvirket. Dette kan skyldes hæmning af enzymet acetylcholinesterase, som nedbryder acetylcholin, som er et vigtigt signalstof til styring af musklerne. Afstanden mellem de gode terapeutiske effekter og de toksiske bivirkninger synes lav, hvorfor doseringen skal være meget nøjagtig.

Den farmakologiske effekt af metylenblåt gennem blokering af enzymet NO-syntase repræsenterer et nyt værdifuldt princip

DOSISRESPONS FOR SMERTESTILLENDE EFFEKT OG BIVIRKNINGER AF METYLENBLÅT



indenfor smertebehandling, som fungerer godt i dyremodeller for akutte, neuropatiske og inflammatoriske smerter. Forhåbentlig kan metylenblåt også lindre både akutte og kroniske smerter hos mennesker. Rotteforsøgene viser, at selv et 140 år gammelt lægemiddel kan få helt nye anvendelsesområder. •

Den grønne kurve viser sammenhængen mellem dosis og smertelindring. Den lilla kurve viser bivirkninger som følge af behandling i 40 dage med to doser dagligt. Den blå kurve markerer sammenhængen dosis og alvorlige bivirkninger. Det terapeutiske vindue, hvor man både opnår god effekt og minimale bivirkninger svarer til forskellen mellem den grønne og den lilla kurve. Vinduet er smalt, hvorfor metylenblåt skal doseres meget præcist.

ILLUSTRATION: MALENE HALD

OMFATTENDE FARMAKOLOGISK BRUG

Metylenblåt har talrige farmakologiske anvendelser til diagnostik og behandling.

Diagnostik

Som farvestof anvendes metylenblåt til test af nyrefunktionen samt til at markere områder i kroppen før kirurgi, fx gennem visualisering af lymfesystemet. Farvestoffet bruges også til at finde lækager i fordøjelseskanalen.

Modgift imod methæmoglobinæmi

Udsættelse for oxiderende stoffer som nitrit fra nitritproducerende bakterier i tarmen kan give en form for iltmangel kaldet methæmoglobinæmi. Her omdannes ferro (Fe^{2+}) hæm-jern i hæmoglobin til ferri (Fe^{3+}) hæm-jern. Fe^{3+} binder oxygen med lavere affinitet end det normale Fe^{2+} , hvorfor de røde blodcellers transport af oxygen til vævene reduceres. Symptomerne omfatter bleghed, blåfarvet hud, åndenød, træthed, forvirring, hovedpine, svimmelhed og hurtig hjertebanken. Metylenblåt virker ved at reducere Fe^{3+} til Fe^{2+} .

Afhjælper medicininduceret hjerneskade

En dosisafhængig neurotoksicitet ses ved kemoterapi med lægemidlet ifosfamid, som bruges til at behandle visse former for kræft. Nervecellerne i hjernen skades, fordi en metabolit af lægemidlet blokerer beskyttelsen af mitokondriernes respirationskæde. Mitokondrierne er cellernes energiproducenter. Metylenblåt modvirker denne bivirkning af kræftmedicinen ved at genskabe det mitokondrielle åndedræt gennem sin funktion som elektronacceptor.

Behandling af septisk chok

Bakterielle infektioner kan medføre septisk chok, som i værste fald er dødeligt. Septisk chok er karakteriseret ved blodforgiftning kombineret med en kraftig udvidelse af blodkarrene. Sepsis medfører en stærkt øget koncentration af nitrogenmonoxid (NO) i blodet, hvilket forårsager et kritisk lavt blodtryk via udvidelsen af blodkarrene og afslapning af hjertemusklens. Studier hos patienter har vist, at metylenblåt på en dosisafhængig måde kan modvirke effekterne af septisk chok.

Behandling af urinvejsinfektion

Metylenblåt bruges til at behandle urinvejsinfektioner. Her eliminerer stoffet lokale symptomer som smerte forårsaget af inflammation.

Bedre kognitiv funktion hos Alzheimer-patienter

De to vigtigste patologiske markører for Alzheimers sygdom er klumper af proteinet amyloid, som dannes mellem hjernens nervoceller, og fibriller af proteinet tau indeni cellerne. Metylenblåt kan blokere dannelsen af disse proteinaflejringer samtidig med, at stoffet forbedrer patienternes kognitive funktion. Ved Alzheimers sygdom ses en betydelig reduktion i mængden af neurotransmitteren acetylcholin, hvilket bidrager til forringelse af hukommelsen og indlæringssevnen. Hos patienterne hæmmer metylenblåt enzymet acetylcholinesterase, som nedbryder signalstoffet, og det forøger mængden af acetylcholin i nervocellernes synapser.

Behandling af anafylaktisk chok

Anafylaktisk chok er en voldsom allergisk reaktion, som påvirker hele kroppen og medfører livsfare. Tilstanden kendetegnes af tilstedeværelsen af høje koncentrationer af mediatorer, som stimulerer NO-produktionen, hvilket medfører dramatisk fald i blodtrykket. Metylenblåt forøger den systemiske karmodstand og modvirker dermed effekten af anafylaktisk chok.

Modvirker depression

Ved depression er der mangel på signalstoffet serotonin i hjernen. Metylenblåt hæmmer enzymet monoamin oxidase, hvilket formindsker metabolismen af serotonin, hvorved serotoninmanglen modvirkes. Eksperimentelt har en sådan behandling vist lovende effekter.

Beskyttelse af hjernen ved iskæmi

Ved hjertestop afbrydes blodforsyningen til hjernen. Det forårsager en stigning af signalstoffet NO i hjernebarken, hvilket kan føre til nervedød. Dertil kan NO medføre hjerneskader, når blodcirkulationen igen går i gang. Metylenblåt optages godt i hjernen og kan nedbringe koncentrationen af NO i hjernebarken. Metylenblåt reducerer også de frie oxygenradikaler, der produceres som følge af iskæmien og forbedrer blodgennemstrømningen. Den nervebeskyttende effekt af metylenblåt skal imidlertid afvejes mod stoffets neurotoksicitet ved højere doser.

Farmaceutstuderende sætter lægemidler på skoleskemaet

Hvorfor **dør man**, hvis man spiser for meget medicin?



*Hvad er meningen?
To piger lærer at
læse og forstå infor-
mationerne på en
medicinpakning*

FOTO: MARTIN BJERREGAARD JENSEN

FORFATTERE

Ph.d. Lotte Stig Nørgaard er lektor på Institut for Farmaci.

Ph.d. Susanne Kaae er adjunkt på Institut for Farmaci.

Stud. pharm. Line Holst er specialestuderende på Institut for Farmaci

Cand.pharm. Ebba Holme Hansen er professor på Institut for Farmaci

Farmakonom Mette Holmquist fra Institut for Farmaci

I FOLKESKOLEN UNDERVISES DER IKKE SYSTEMATISK I LÆGEMIDDELANVENDELSE TIL TRODS FOR, AT BRUG AF LÆGEMIDLER ER DEN MEST UDBREDTE ADFÆRD, NÅR VI BLIVER SYGE ELLER VIL HOLDE OS RASKE, OG TIL TRODS FOR, AT DANSKE BØRN OG UNGE I STIGENDE GRAD BRUGER MEDICIN – OFTE UDEN AT HÅNDBERE LÆGEMIDLERNE KORREKT. ET LANDSDÆKKENDE PROJEKT, HVOR FARMACEUTSTUDERENDE UNDERVISER ELEVER FRA 4-7 KLASSE, ER BLEVET RIGTIG GODT MODTAGET AF BÅDE ELEVER OG LÆRERE.

Danske børn og unge benytter i stigende grad lægemidler, og de er ret selvstændige i deres omgang med medicinen. Samtidig viser forskning, at børn og unge ikke har megen viden omkring om korrekt håndtering af medicin, og det kan resultere i en række uheldige konsekvenser for dem. Alligevel modtager eleverne i den danske folkeskole ingen undervisning om lægemidler.

Farmaceutstuderende lærer en masse om lægemidler på deres studie, og i Finland har folkeskolelærere gennem flere år undervist i lægemiddelanvendelse ud fra et elektronisk tilgængeligt undervisningsmateriale. Det var således i 2011 nærliggende at kombinere de farmaceutstuderendes kompetencer og de gode finske erfaringer i et storstilet formidlingsprojekt kaldet Skole-Medicinprojektet. Her fik interesserede farmaceutstuderende fra School of Pharmaceutical Sciences ved Københavns Universitet under deres studieophold på et apotek mulighed for at besøge folkeskoler for at undervise børn fra 4.-7. klasse i korrekt lægemiddelanvendelse.

De studerende kontaktede selv en nærliggende folkeskole for at arrangere et to timers undervisningsforløb, hvor undervisningsmaterialet blev tilpasset til den enkelte klasse typisk i samarbejde med læreren i natur og teknik. De mest almindelige undervisningstemaer var: Lægemidlers virkninger og bivirkninger, bortskaffelse af medicin, forskellige lægemiddelformuleringer, og hvad man kan lære af indlægssedlen. 65 farmaceutstuderende underviste i 2011 på mere end 30 skoler, og i år har 83 studerende undervist på mere end 50 skoler, som er fordelt i hele landet. Til næste forår vil 130 farmaceutstuderende med stor sandsynlighed få mulighed for at gøre fremtidens voksne klogere på, hvad lægemidler kan, og hvad de ikke kan.

TILFREDSE ELEVER

93 procent af de farmaceutstuderende vurderede i 2011, at folkeskoleelevernes udbytte af undervisningen enten var »godt« eller »meget godt« (i 69 % af tilfældene har klassens lærer været inddraget i vurderingen). Eleverne markerede tydeligt, at de farmaceutstuderende var et »frisk pust« i undervisningen, og at det var spændende, at man kunne læse til noget så interessant som farmaceut på et universitet. Flere elever

ville efter undervisningen selv læse til farmaceut – bedyrede de. Eleverne fortalte, at de havde lært, at man ikke må tage medicin, som ikke er ordineret til en selv, at man kan læse en masse på indlægssedler, og at der er gode grunde til, at noget medicin formuleres som kapsler og tabletter, mens anden medicin skal inhaleres eller smøres på.

Undervisningen blev i mange klasser anvendt som et springbræt for en generel dialog om lægemidler. At engagementet lyser ud af de farmaceutstuderende, skærper børnenes interesse, og de føler sig hørt og taget alvorligt, når de studerende kan svare på de fleste af deres mange spørgsmål. Citat fra en naturtekniklærer: »At eleverne møder fagpersoner er rigtig godt – læreren er jo lidt over det hele – men fagpersoner har udbygget og specifik viden – det synes eleverne godt om – det giver autenticitet til undervisningen, og det er vigtigt, når vi skal motivere dem naturfagligt.«

TILFREDSE FOLKESKOLELÆRERE

En håndfuld lærere er blevet interviewet om deres erfaringer med de farmaceutstuderendes undervisning. Disse lærere finder det vigtigt, at børn lærer at omgås medicin korrekt, fordi de ofte har erfaring med lægemidler, men ikke ved, »hvad der egentlig sker inden i mig, når jeg tager denne her medicin«.

En af de store forcer ved projektet er, at undervisningen tilrettelægges i et samarbejde mellem den farmaceutstuderende og folkeskolelæreren. De studerende laver et oplæg ud fra de undervisningsmaterialer, de har til rådighed, og holder dernæst et

BØRN OG UNGES BRUG AF LÆGEMIDLER

Mønsteret for ordination og brug af medicin blandt børn varierer meget med alderen. De helt små børn får udskrevet relativt mest receptmedicin. De får først og fremmest antibiotika, men også præparater til behandling af øjne og ører samt hudmidler. Knap 5 % af børnene får astmamedicin, og der er flere 0-5 årige end 6-15 årige, som får denne slags lægemidler.

Blandt de større børn er forbruget af to slags receptpligtig medicin steget dramatisk gennem det sidste årti, nemlig lægemidler til behandling af ADHD og antidepressiv medicin. I år 2000 var det 0,5 % af 10-14 årige drenge, der fik medicin mod ADHD, og i dag er det 4 %. I andre aldersgrupper og blandt piger er tallene lavere, men forbruget er steget i alle grupper. Forbruget af antidepressiv medicin er vokset særlig meget blandt de store piger. I dag får omkring 4 % af de 15-19 årige piger og 1,5 % af drengene ordineret denne type medicin.

Forbruget af håndkøbsmedicin mod smerter er også steget. Andelen af 15-årige drenge og piger, der har taget medicin mod hovedpine er fordoblet over 25 år. I dag tager seks ud af ti 15-årige piger medicin mod hovedpine i løbet af en måned. Hertil kommer medicin mod andre slags smerter såsom mavepine. Børn får først og fremmest håndkøbsmedicin fra deres forældre, men blandt større børn sker det også, at man får smertestillende lægemidler af kammeraterne.

ANDELE AF 15-ÅRIGE SOM HAR BRUGT LÆGEMIDLER MOD HOVEDPINE I DEN SENESTE MÅNED



ILLUSTRATION: MALENE HALD

DET MÅ DU NOK SPØRGE OM!

Elevernes spørgelyst var stor, og af og til må det have krævet sin farmaceut at svare på spørgsmålene:

»Hvilket materiale er en injektionssprøjte lavet af?«

»Hvordan kan det være, at når jeg sluger en pille, så virker den også nede i min storetå?«

»Hvad sker der, hvis man spiser for mange vitaminpiller?«

»Er der noget medicin, man kan tage i store mængder, uden at det er skadeligt?«

»Hvad sker der, hvis man tager for meget smertestillende medicin?«

»Hvorfor falder blodtrykket, når man får vaccination mod livmoderhalskræft første gang?«

»Findes der medicin mod for højt kolesterol?«

»Hvor er det aktive stof i en kapsel?«

»Må man tage en tablet med mælk eller juice i stedet for vand?«

»Er der spiritus i medicin? Det lugter sådan...«

»Når man spiser piller, må man så godt tygge dem først?«

»Ved I noget om den der nye kødædende bakterie?«

»Hvorfor dør man, hvis man tager for meget medicin?«

UNDERVISNINGSMATERIALE TIL SKOLEMEDICINPROJEKTET

- PowerPoint præsentation og støttematerialer for ca. 20 emner, herunder udvalgte lægemidlers effekt, interaktioner, risici, bivirkninger, forkert og korrekt brug samt bortskaffelse.
- Medicinbingo (fra 2012)
- Rollespilmateriale
- Idékatalog fra projektets første år (fra år 2012)
- Indlægsseddelopgaver
- Udkast til brev til skoler og forældre
- Artikler og bogafsnit
- Evalueringsdokumenter

møde med læreren, hvor undervisningen bliver endeligt tilrettelagt. Denne mulighed for indflydelse er lærerne glade for, fordi samarbejdet medvirker til, at man får lavet en undervisning, som lige præcis passer til den enkelte klasse, og som kan indpasses i lærernes undervisningsplaner.

De farmaceutstuderende har været gode undervisere, selvom de ikke er rutinerede formidlere til børn. De er unge og kan fungere som rollemodeller, og de har været gode til at underbygge undervisningen med ting, som er konkrete og nærværende for eleverne. De har fx medbragt et skelet, fremvist stikpiller, demonstreret astmafløjter og gennemgået indlægssedler. Citat fra en lærer: »Det jeg måler på er, at ungerne er interesserede, og de har haft en positiv oplevelse af at have lært noget. Det giver de meget tydeligt udtryk for.«

Et andet aspekt er, at lærerne ikke føler sig godt nok orienteret i fagstoffet til selv at kunne forestå undervisningen, men flere af dem har fået inspiration til ny undervisning. De studerende har samtidig givet lærerne adskillige øjenåbnere, fx at gammel medicin skal afleveres til destruktion på apoteket, at noget medicin gør rask, men at langt det meste medicin symptombehandler, samt at farmaceuter ikke bare bevidstløst ligger tabletter over disken, men ofte giver gode råd til patienterne. Ingen af lærerne havde før projektet overvejet at undervise børn på mellemtrinnet om korrekt brug af lægemidler. Efterfølgende har mange valgt selv at fortsætte med at inddrage lægemidler i undervisningen eller lavet aftaler om, at den farmaceutstuderende igen kommer ud og underviser i en anden klasse.

TILFREDSE FARMACEUTSTUDERENDE

Hele 94 procent af de farmaceutstuderende vurderede i 2011, at de var enten »meget tilfredse« eller »tilfredse« med projektet, og samtlige studerende, der besvarede spørgeskemaet, vurderede, at projektet er relevant for fremtidige farmaceutstuderende på apoteksophold. Flere fandt det decideret sjovt at nå ud til en anden målgruppe end kunderne på apotekerne, som ofte er ældre og medicinerede patienter. Ligeledes har de studerende været med til at sætte apoteket på det lokale landkort som en vigtig sundhedsfremmende aktør.

En anden styrke ved projektet er, at mange farmaceutstuderende er blevet opmærksomme på deres egen kommunikation med børn, når de ekspederer medicin til dem på apoteket. Der tales nu ikke længere kun til far og mor, men mere direkte til det enkelte barn ved skranken.

BREDER SIG SOM RINGE I VANDET

I nærmeste fremtid foreligger der resultater, som vil vise, om undervisningen rent faktisk har ændret ved elevernes lægemiddelrelaterede viden og opfattelser. Vi ved, at projektet er i gang med at sprede sig til færdiguddannede apoteksfarmaceuter på landets apoteker. Mange lærere vil gerne have et længere undervisningsforløb, og flere så også gerne, at eleverne i 4-6 klasse hvert år får besøg af lægemiddelekspert, så der blev bygget ovenpå de første lektioner. Kort sagt: De vil have mere! •



Der var stor interesse, da farmaceutstuderende underviste om lægemidler.

FOTO: MARTIN BIERREGAARD JENSEN

Teenageres brug af smertestillende medicin afhænger af etnisk baggrund

BØRN OG UNGES FORBRUG AF SMERTESTILLENDENDE LÆGEMIDLER STIGER. MANGE BRUGER MEDICINEN FORKERT, OG DET KAN SKADE HELBREDET OG HAVE NEGATIVE PSYKOSOCIALE KONSEKVENSER. FORBRUGET ER MEGET STØRRE BLANDT TEENAGERE MED IRAKISK, LIBANESISK OG TYRKISK BAGGRUND END BLANDT DANSKE JÆVNALDRENDE. DÉT BØR MAN TAGE HØJDE FOR VED SUNDHEDSUNDERVISNING TIL UNGE.

Befolkningsundersøgelser i Danmark viser, at unges medicinforbrug vokser i en grad, som ikke alene kan forklares ud fra hyppigheden af symptomer. Teenageres brug af lægemidler har stor betydning for folkesundheden, især fordi mange unge anvender medicinen forkert. Det medfører risiko for at udvikle afhængighed, og et langvarigt overforbrug kan skade helbredet alvorligt. Misbrug af smertestillende medicin kan også føre til, at den unge udvikler uhensigtsmæssige måder at håndtere daglige stressfaktorer på – både i skolen og i hjemmet – og i værste fald kan lægemidlerne svække den kognitive udvikling.

En meget stor gruppe teenagere bruger smertestillende medicin, men alligevel har det indtil nu været dårligt belyst, om der er etniske forskelle i forbruget. Da antallet af indvandrere og deres efterkommere i Danmark vokser, er det vigtigt for folkesundheden at afklare, om der er etniske forskelle i børn og unges forbrug af smertestillende lægemidler. Sådanne undersøgelser kan hjælpe med til at identificere de minoriteter, som er i risikogruppen for at bruge medicinen til andet end dens egentlige formål.

Etnisk baggrund kan påvirke forbruget af smertestillende medicin, fordi forskellige kulturer anvender lægemidler på forskellige måder. Visse grupper af indvandrere går hyppigere til lægen og søger behandling af andre årsager end etniske danskere. Desuden kan unge fra etniske minoriteter være udsat for særlige psykosociale belastninger, som kan være relateret til migrationen og den integrationsproces, de oplever i værtslandet. Begge dele kan påvirke teenagerens anvendelse af medicin.

Vi har undersøgt forskellene i medicinforbruget mellem etniske danskere og de tre største minoritetsgrupper her i landet: Tyrkere, irakere og libanesere. Undersøgelsen omfatter medicin til behandling af hovedpine og mavepine, hvilket er de mest anvendte lægemidler blandt unge i aldersgruppen mellem 11 og 15 år.

Hvis medicin, som indeholder paracetamol, anvendes i længere tid eller i større mængder end de anbefalede doser, går det ud over leveren. Ved almindelig dosering af paracetamol metaboliseres et reaktivt nedbrydningsprodukt (NAPQI) af lægemiddelstoffet ved hjælp af antioxidanten glutathion. Ved overdosering øges NAPQI-koncentrationen, og mængden af glutathion udtømmes hurtigt, hvorved leveren beskadiges. Der er dog ikke fuldstændig klarhed over mekanismerne. Ved alvorlig leverskade indtræder døden, men først efter et stykke tid med kvalme, opkast og smerter.

Blandt unge piger er paracetamol første valg ved selvmordsforsøg, men de unge kender ikke doseringen, og de ved heller ikke, at dette ikke er en »let«, men tværtimod en meget smertefuld måde at tage sit eget liv. Hvis en person, der har taget en overdosis, bliver bragt hurtigt på hospitalet, er der dog relativt gode muligheder for behandling med modgift.

SVAR FRA TITUSIND SKOLEELEVER

I undersøgelsen har vi brugt data fra Verdenssundhedsorganisationens internationale undersøgelse Health Behaviour in School-children til at analysere de fire gruppers forbrug af smertestillende lægemidler. I alt 10.158 elever i danske skoler deltog i

FORFATTERE

Cand.polit. Lourdes Cantarero-Arévalo er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci.

Cand.pharm. Ebba Holme Hansen er professor på Institut for Farmaci.

FORKERT BRUG AF SMERTESTILLEDE MEDICIN: HVAD KAN DER SKE?

Mange børn og unge har en opfattelse af, at »sådan en lille pille kan da ikke skade«. Når det drejer sig om smertestillende medicin, understøttes opfattelsen af, at man kan købe almindeligt brugte præparater i supermarkeder og på tankstationer.

Blandt teenagere er det først og fremmest præparater med paracetamol (Panodil og Pamol), acetylsalicylsyre (Magnyl, Kodimagnyl) og ibuprofen (Ibren), der bruges til at dulme hovedpine og mavepine. Når disse præparater anvendes lejlighedsvis, er de effektive og giver ingen eller meget få bivirkninger. Men anvendes de hyppigt eller over længere tid, er der stor risiko for bivirkninger. Ved anvendelse mere end et par gange om ugen er der stor risiko for at udvikle overforbrugshovedpine, som skyldes en form for tilvænning af de receptorer, som lægemidlet virker på.

Ved længerevarende forbrug af acetylsalicylsyre ødelægges overfladen i mavearmkanalen af den syre, som er den virksomme bestanddel i medicinen. Denne proces forvolder smerte. Endvidere er der fare for, at der opstår hul i overfladen af blodkarrene og dermed indvendige blødninger. Hertil kommer ubehag på grund af sure opstød og lignende.

undersøgelsen. Eleverne gik i femte, syvende og niende klasse, hvor den gennemsnitlige alder er henholdsvis 11,7, 13,7 og 15,7 år. Eleverne besvarede et anonymt spørgeskema om sundhed og sundhedsadfærd samt om sociale og psykosociale faktorer. For at vurdere teenagernes brug af medicin blev eleverne stillet følgende spørgsmål: »Indenfor den sidste måned: Har du taget piller eller medicin for 1) Hovedpine, og 2) Mavepine?«. Vi brugte derpå oplysninger om de unges og forældrenes fødeland til at inddele deltagerne i danskere, tyrkere, irakere og libanesere. Da hovedpine og mavepine er de mest almindelige grunde til at tage smertestillende medicin, medtog vi forekomsten af disse symptomer i vores studie. Vi beregnede nu den relative tilbøjelighed til at bruge medicin hos de forskellige etniske grupper sammenlignet med referencegruppen, som er etniske danskere.

MINORITETERNE BRUGER MERE MEDICIN

Blandt drenge var der flere med tyrkisk baggrund, som indenfor den seneste måned havde brugt medicin for hovedpine og mavepine, end det var tilfældet blandt drenge med dansk baggrund, og det samme gjaldt for etniske irakere og etniske libanesere med hensyn til medicin for mavepine. Disse forskelle kan ikke forklares ud fra hyppigheden af symptomer alene, så det peger på, at der er andre årsager end hovedpine eller mavepine, som påvirker drenge fra etniske minoritetsgrupper til at tage smertestillende medicin. Drenge med en tyrkisk, libanesisk eller irakisk baggrund har altså større tendens til

at bruge medicin for hovedpine og mavepine end etniske danske drenge.

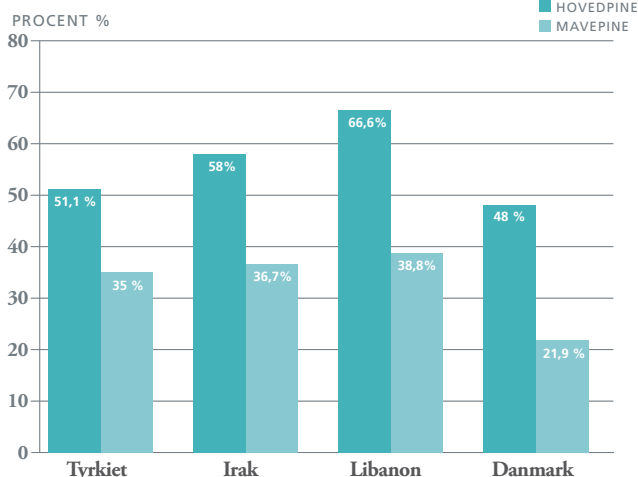
Blandt pigerne var der flere med tyrkisk, irakisk og libanesisk baggrund, som havde anvendt medicin for mavepine indenfor den seneste måned, sammenlignet med etniske danske piger. Desuden har libanesiske piger en øget tendens til at bruge medicin for hovedpine sammenlignet med danske piger.

BEHOV FOR UNDERVISNING OM LÆGEMIDLER

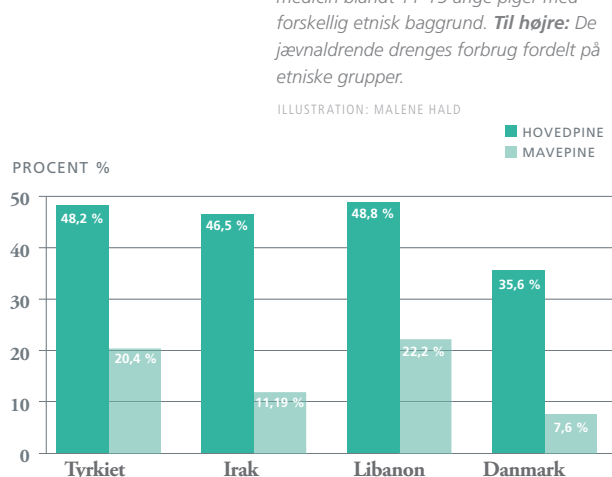
Ikke alene er medicinforbruget højere. Mange tyrkiske, irakiske og libanesiske drenge og piger bruger desuden medicin af grunde, som ikke alene kan forklares ud fra forekomsten af symptomer. Medicinforbruget ser altså ud til at tjene andre formål end bare symptombehandling.

Hvad de præcise grunde er, kan man indtil videre kun gisne om. Medicinbrug blandt etniske minoriteter er nemlig – på trods af vigtigheden – stadig et underprioriteret emne. Derfor planlægger vi nu at gå bag om tallene i undersøgelsen og interviewe børn med forskellig etnisk baggrund for at afklare, hvorfor deres forbrug af smertestillende medicin er større end forbruget blandt etniske danske jævnaldrende. Den nuværende undersøgelse viser dog tydeligt, at der er et stort behov for sundhedsundervisning om lægemidler i skolen, samt at undervisningen bør tilrettelægges på en sådan måde, at den tilgodeser de særlige behov, som de etniske minoritetsgrupper i Danmark har. •

PIGER



DRENGE



Til venstre: Forbruget af smertestillende medicin blandt 11-15 årige piger med forskellig etnisk baggrund. Til højre: De jævnaldrende drenge forbrug fordelt på etniske grupper.

ILLUSTRATION: MALENE HALD

Kontinuerlig lægemiddelfremstilling – en ny **rockstjerne** i den farmaceutiske industri?

FØDEVAREINDUSTRIEN OG DEN KEMISKE INDUSTRI HAR INDFØRT EFFEKTIVE KONTINUERLIGE PRODUKTIONSLINJER, SOM REDUCERER PRODUKTIONSOMKOSTNINGERNE VIA ET FORMINDSKET FORBRUG AF RÅMATERIALER OG ENERGI. FORSKNING OG UDVIKLING SKAL BANE VEJ FOR EN TILSVARENDE REVOLUTION I DEN FARMACEUTISKE INDUSTRI.

Traditionel udvikling og produktion i lægemiddelindustrien er baseret på batch-fremstilling, hvor de enkelte enhedsoperationer som granulering, tørring og tabletering er fysisk adskilte fra hinanden, og hvor kvaliteten af hvert mellemprodukt testes i separate analyselaboratorier. Denne produktionsform er økonomisk ufordelagtig, fordi det tager lang tid og kræver store produktionsfaciliteter skiftevis at producere mellemprodukterne, transportere dem rundt på fabrikken og analysere deres kvalitet, inden det endelige lægemiddel kan færdiggøres. Desuden er det problematisk, at store partier af lægemidler, de såkaldte batches, risikerer at gå til spilde, hvis bare en enkelt enhedsoperation slår fejl. Derfor har en række industrier som fødevarerindustrien og den kemiske industri indført langt mere effektive fremstil-

lingsprocesser, hvor moderne produktionsteknologier er forbundet i kontinuerlige produktionslinjer, som løbende overvåges, kontrolleres og justeres af automatiserede procesanalytiske teknologisystemer.

Kontinuerlig lægemiddelproduktion med tilsvarende systemer til kvalitetsmonitorering og proceskontrol er i årevis blevet betragtet som en uopnåelig drøm for den farmaceutiske industri. Det skyldes ikke mindst, at den farmaceutiske industri historisk set har været underlagt streng kontrol og nøje overvågning fra lægemiddelmyndighederne af hensyn til patientsikkerheden. Men desværre har den strenge kontrol vanskeliggjort innovation og udvikling i visse dele af den farmaceutiske industri, og i dag er lægemiddelfremstillingen typisk baseret på forældede og ineffektive metoder.

I de seneste år har billedet imidlertid

FORFATTERE

Ph.d. Kaisa Naelapää var adjunkt på Institut for Farmaci, arbejder nu på Novo Nordisk A/S.

M.Sc. Niels Peter Aae Christensen er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci.

Ph.d. Jukka Rantanen er Professor på Institut for Farmaci.



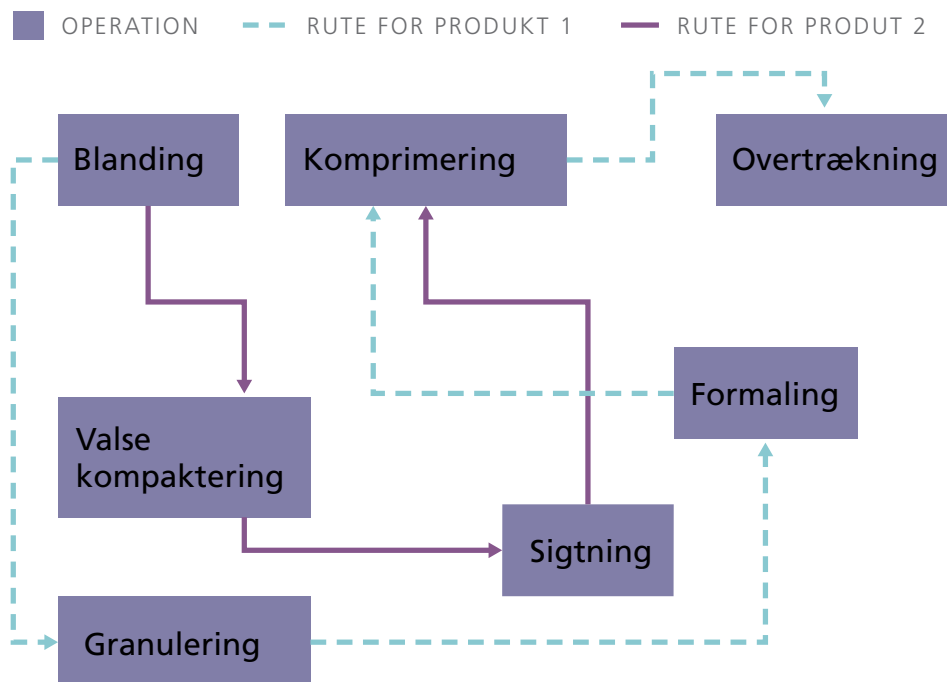
Anlæg til kontinuerlig lægemiddelfremstilling.

FOTO: GHEENT UNIVERSITY

Batch vs. kontinuerlig produktion

Princippet i batch-produktion. De enkelte enhedsoperationer som fx granulering, tørring og tabletfremstilling er fysisk adskilte fra hinanden, og kvaliteten af hver enkelt operation testes hver for sig.

ILLUSTRATION: MALENE HALD



ændret sig som følge af initiativer fra de regulerende myndigheder samt nytænkning og udvikling i medicinalindustrien og på universiteter verden over. Eksempelvis har amerikanske og europæiske sundhedsmyndigheder, såsom U.S. Food and Drug Administration (FDA) og European Medicines Agency (EMA), udgivet en række guidelines for at fremme implementeringen af nye produktionsteknologier i den farmaceutiske industri.

STORE POTENTIELLE GEVINSTER

Der er flere store potentielle gevinster ved indførelse af kontinuerlig produktion i lægemiddelindustrien. Fx forventer man omkostningsbesparelser som følge af kortere produktionstid, kortere opbevaringstid, reduceret materialeforbrug og mindre energispild. Samtidig er det sandsynligt, at den generelle produktkvalitet vil stige ved anvendelse af de nye teknologier, fordi opsætningen af kontinuerlige produktionslinjer med automatiserede systemer til monitorering og kontrol vil reducere variationen i produkterne. En anden vigtig fordel ved kontinuerlig produktion er muligheden for at fremstille både meget store og meget små produktportioner på det samme udstyr – alt efter markedets behov. Udstyrsproducenter som GEA Pharma Systems har allerede udviklet og markedsført kontinuerlige produktionslinjer til fremstilling af lægemidler.

For at opnå optimalt udbytte af kontinuer-

lige produktionslinjer er det nødvendigt med en grundlæggende mekanistisk forståelse af samspillet mellem materialevalg, råvarevariation, forarbejdning og kvaliteten af det færdige lægemiddelprodukt, fordi de automatiserede procesanalytiske teknologisystemer (PAT-systemer) skal baseres på en sådan viden. Denne mekanistiske indsigt skal tilvejebringes allerede under lægemidlets udviklingsfase.

AUTOMATISK KONTROL OG JUSTERING

Derefter kan den opnåede viden om processen udnyttes til at indstille og programmere de automatiske systemer, som via matematiske modeller og multivariable algoritmer skal kunne overvåge det bearbejdede materiale og kontrollere produktionslinjen med henblik på at opnå en høj og ensartet kvalitet af det færdige lægemiddel.

Procesanalytiske teknologisystemer skal kunne vurdere kvaliteten af råmaterialerne – fx deres vandindhold eller partikelstørrelse – direkte under bearbejdningen, hvorefter systemet benytter resultatet til automatiseret justering af de relevante parametre på produktionsudstyret – fx ved at regulere tilsætningen af granuleringsvæske eller ved at ændre tørringstemperaturen. På den måde kan kontrolsystemet tage højde for variationer i råvarerne, så alvorlige kvalitetsafvigelser og deraf følgende spild af kostbare lægemiddelbatches undgås via rettidig justering af procesparametrene.

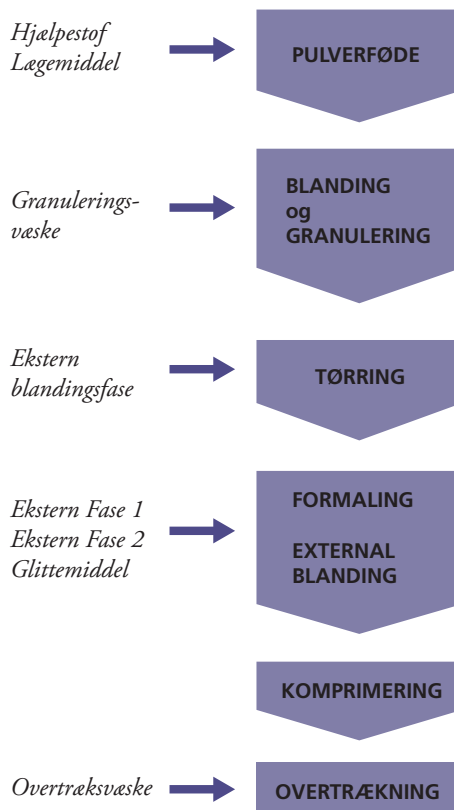
FORSKNING OG FORSØGSPRODUKTION

Forskergruppen Pharmaceutical Technology på Institut for Farmaci indgår i et internationalt samarbejdsprojekt med flere førende industrielle og akademiske forskningscentre for at fremme udviklingen af kontinuerlige produktionssystemer. Vore vigtigste partnere er Process Analytical Technologies Laboratory på universitetet i Gent i Belgien, Farmacigruppen på Åbo Akademi i Finland og Research Center Pharmaceutical Engineering i Graz i Østrig. I projektet undersøger vi, hvad råvarernes kvalitet og kvaliteten af de aktive lægemiddelstoffer betyder for kvaliteten af de producerede lægemidler. Hovedparten af den kontinuerlige fremstilling af granulat Korn udføres på det proces-teknologiske laboratorium i Gent, mens den efterfølgende karakterisering foretages af universitetet i Gent, på Åbo Akademi samt på Københavns Universitet.

Vi har bl.a. sat fokus på lægemidlet theophyllin, som bruges i tabletter til behandling af astma og andre åndedræts-sygdomme. Lægemidlet blev granuleret med laktose som fyldstof samt et bindemiddel og efterfølgende komprimeret til tabletter. Efter fremstillingen blev granulatets partikelstørrelse, lægemiddeldosis, densitet, flydeegenskaber, fugtighed og krystallinske egenskaber bestemt ved brug af forskellige karakteriseringsmetoder.

Desuden undersøgte vi brudstyrken og henfaldstiden af de producerede tabletter. Brudstyrken er et mål for tabletternes styrke under de næste trin som overtrækning, pakning og transport. Henfaldstiden giver en indikation af, hvor hurtigt tabletterne henfalder til partikler under opløsning, og indikerer altså, hvor hurtigt lægemiddelstoffet vil være tilgængeligt for absorption og farmakologisk effekt i patienten. Brudstyrke og henfaldstid er kvalitetsegenskaber, som kan sættes i sammenhæng med kvaliteten af de benyttede råmaterialer og måden, hvorved produkterne blev fremstillet.

I næste fase af projektet skal effekten af



I dag fremstilles det meste medicin ved batch-produktion, hvor det færdige lægemiddel skabes trin for trin via mellemprodukter. Der kan opnås store praktiske og økonomiske fordele ved at skifte til kontinuerlig produktion, hvor råmaterialerne bearbejdes uden afbrydelser i sammenhængende produktionslinjer, der til sidst leverer det færdige lægemiddel. Grafikken viser, hvordan anlægget fungerer.

ILLUSTRATION: MALENE HALD

vigtige procesparametre som temperatur, pulverfødehastighed, tilførselshastighed af granuleringsvæske samt omdrejningshastighed og konfiguration af skruen i granulatorens undersøgeres i forhold til råmaterialernes kvalitet. Målet er at opnå viden, som i fremtiden vil muliggøre produktion af lægemidler i sofistikerede kontinuerlige produktionslinjer, hvor automatiserede procesanalytiske teknologsystemer kan tage højde for variationer i råmaterialers kvalitet og automatisk justere procesparametrene, så der altid opnås en høj og ensartet kvalitet af de producerede lægemidler. •

Princippet i kontinuerlig produktion. Råmaterialerne tilføres i den ene ende af produktionslinjen, og det færdige lægemiddel kommer ud i den anden ende. Kvaliteten af produktet og produktionsprocessen testes løbende ved hjælp af automatiserede systemer.

ILLUSTRATION: MALENE HALD



Fra industrielt madspild til sundhedsfremmende fødevarer og målrettet medicin

ÆBLESKRÆL OG LØGTOPPE ER AFFALD FRA DEN MODERNE FØDEVAREINDUSTRI, MEN KAN FREMMER BLIVE EN BÆREDYGTIG KILDE TIL MÅLRETTEDE MEDICINALPRODUKTER TIL DIABETIKERE. NY TEKNOLOGI VISER, AT SPILDPRODUKTER FRA FØDEVAREPRODUKTIONEN INDEHOLDER MANGE GAVNLIGE INDHOLDSSTOFFER, SOM KAN BLIVE EFFEKTIVE VÅBEN MOD LIVSSTILSSYGDOMME.

FORFATTERE

Cand.pharm. Jeppe Secher

Schmidt er ph.d.-studerende på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Ph.d. Anna K. Jäger

er lektor på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Ph.d. Dan Stærk

er professor på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi

Bæredygtig produktion af fremtidens funktionelle fødevarer og morgendagens målrettede medicin kan med fordel tage udgangspunkt i fødevarerindustriens spildprodukter. Derved bliver disse affaldsprodukter en del af løsningen på de helbredsproblemer, som er fulgt i kølvandet på de seneste årtiers eksplosive vækst i livsstilssygdomme. Årsagen til den dramatiske vækst er blandt andet at mange voksne har fået stillesiddende jobs med store krav til effektivitet og produktivitet, mens børn og unge sidder stille foran computere og fjernsyn i timevis. Samtidig har vi konstant adgang til store mængder, ofte usunde, fødevarer. Derfor stiger antallet af mennesker med livsstilssygdomme som fedme, hjertekarsygdomme og type 2 diabetes; sidstnævnte også kendt som »gammelmandssukkersyge«. Et fællestræk ved livsstilssygdommene er, at de let kan forebygges, men de er svære – og måske endda umulige – at helbrede.

Medicinsk behandling af livsstilssygdomme kan sjældent stå alene, idet øget fysisk aktivitet og ændrede kostvaner også er vigtige for at holde sygdommene under kontrol. Fremover bør effektiv sygdomsforebyggelse, behandling og helbredelse derfor inkludere både funktionelle fødevarer, naturlægemidler og ordinære lægemidler. Fælles for alle tre kategorier er den gavnlige indflydelse på helbredet, som naturligt forekommende bioaktive molekyler spiller. Derfor er det afgørende, at vi til stadighed

udvikler nye teknologier, som kan give et indgående kendskab til disse biologisk aktive molekylers kemiske og farmakologiske egenskaber.

LIVSSTIL GØR TYPE 2 DIABETES TIL EN FOLKESYGDOM

Overvægt og manglende motion er blandt de væsentligste faktorer for udvikling af type 2 diabetes. På globalt plan er antallet af overvægtige ifølge WHO mere end fordoblet siden 1980, og i dag er der 1,4 milliarder overvægtige mennesker med et Body Mass Index (BMI) på over 25. Af dem er 500 millioner fede, også kaldet svært overvægtige, hvilket betyder, at de har et BMI på over 30. I Danmark er 47 procent af den voksne befolkning overvægtige, og 13 procent er fede, men også børnene fylder godt i statistikken. I København er således mere end hvert femte barn overvægtigt ved skolestart.

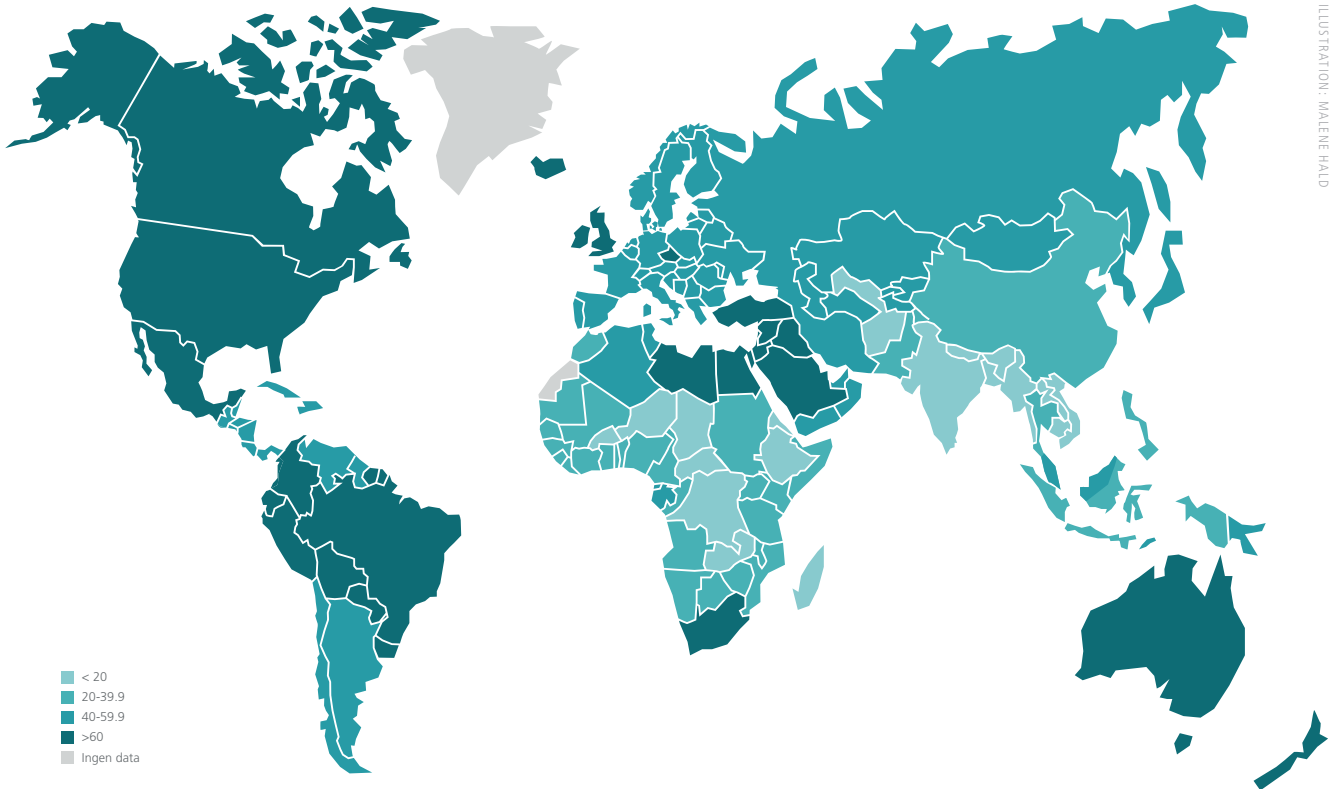
Fedmeepidemien vil medføre, at en hastigt stigende andel af befolkningen fremover vil udvikle type 2 diabetes, og allerede nu er sukkersyge i høj grad en folkesygdom: 250.000-300.000 danskere menes at have diabetes, og halvdelen af dem er endnu ikke diagnosticeret. Patienter med type 2 diabetes rammes af en række alvorlige senkomplikationer med kraftigt forringet livskvalitet og øget dødelighed til følge. Eksempler på senkomplikationer er hjertekarsygdomme, nedsat nyrefunktion, svækket syn og eventuelt blindhed, og det skønnes, at omkring 7 procent af Danmarks sundhedsbudget bruges til

HVAD ER HVAD?

Funktionelle fødevarer defineres som fødevarer, der har en sundhedsfremmende eller sygdomsforebyggende effekt ud over deres ernæringsmæssige værdi.

Naturlægemidler er komplekse blandinger af bioaktive molekyler, som typisk udvindes fra planter.

Lægemidler indeholder normalt et enkelt farmakologisk aktivt stof til behandling af en specifik sygdom.



behandling af diabetes og de medfølgende senkomplikationer.

FUNKTIONELLE FØDEVARER OG LÆGEMIDLER TIL DIABETIKERE

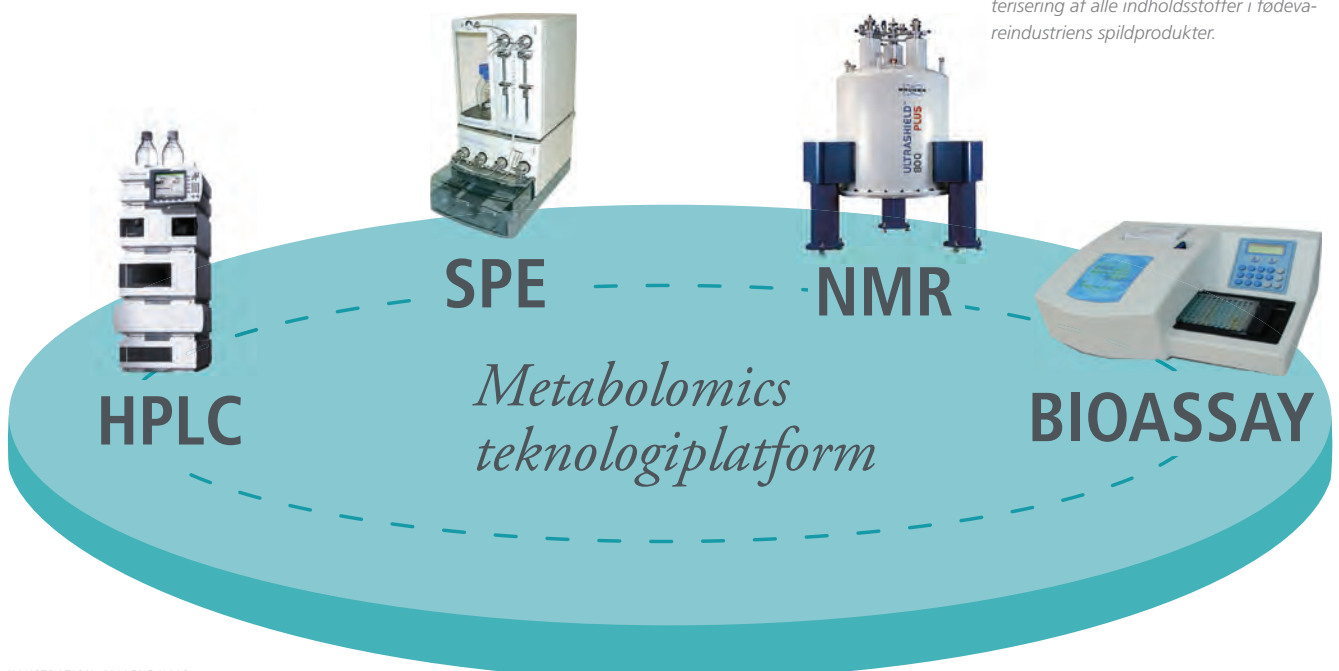
I dag findes der ingen helbredende medicinsk behandling for type 2 diabetes, men med den rette kombination af ændrede kostvaner, motion og medicin kan komplikationerne udskydes og deres sværhedsgrad formindskes. Der er specielt to områder,

hvor anvendelsen af bioaktive stoffer fra fødevarereproduktionens spildprodukter har et stort potentiale.

Det første er udvikling af funktionelle fødevarer og naturlægemidler med et højt indhold af α -glukosidase inhibitorer. Disse stoffer hæmmer omdannelsen af komplekse kulhydrater til monosaccharider i tarmen, hvilket reducerer blodsukkerets topniveau efter indtagelse af et måltid. Netop blodsukterniveauet bør være under streng kontrol

Øverst: Den globale fedmeepidemi er en væsentlig faktor bag stigningen i antallet af type 2 diabetes tilfælde. Kortet viser andelen af overvægtige voksne (BMI > 25) på verdensplan. Kortet er modificeret efter et interaktivt kort fra World Health Organization: http://gamapserver.who.int/gho/interactive_charts/ncd/risk_factors/overweight_obesity/atlas.html

Nederst: Skematisk repræsentation af vores unikke metabolomics teknologiplatform – HPLC-SPE-NMR/HR-bioassay. Kombinationen af de fire teknikker tillader samtidig kemisk og farmakologisk karakterisering af alle indholdsstoffer i fødevarereindustriens spildprodukter.



METABOLOMICS

For at kunne udføre avancerede metabolomics eksperimenter har vi på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi udviklet en ny unik metabolomics teknologiplatform, som muliggør samtidig kemisk og farmakologisk karakterisering af alle indholdsstoffer i en prøve af fx æbleskræl eller løgtoppe.

Det sker ved at sammenkoble fire avancerede teknikker. Væskekromatografi (HPLC) bruges til at adskille komplekse blandinger i enkeltstoffer, og fastfase ekstraktion (SPE) bruges til at fange og opkoncentrere de isolerede enkeltstoffer. Kernemagnetisk resonans spektroskopi (NMR) karakteriserer de enkelte indholdsstoffer kemisk, og højtop-løsende bioassay (HR-bioassay) anvendes derpå til farmakologisk karakterisering af hvert enkelt indholdsstof.

Vi råder over en lang række bioassays, som alle er baseret på mikrofraktionering i 96-brønds plader. Vi har fx udviklet et α -glukosidase enzym assay, som bruges til at karakterisere stoffer, som kan hæmme dette enzym og derved reducere blodsukkerets topniveau i type 2 diabetes. Eksperimenterne udføres ved at tilsætte en buffer med α -glukosidase til alle brønde, hvorpå enzymreaktionen startes ved at tilsætte et farveløst substrat: *p*-nitrophenol- α -D-glukopyranosid. I de brønde, hvor der ikke er inhibitorer af enzymet, vil substratet blive spaltet til glukose og det farvede *p*-nitrophenol, hvorimod der ikke vil ske nogen reaktion, og dermed heller ikke nogen farvedannelse i brønde, som indeholder α -glukosidase inhibitorer. Reaktionen måles i hver enkelt brønd.

og ikke nå op på for høje topniveauer for at minimere senkomplikationerne, og det kan opnås ved at indtage funktionelle fødevarer eller naturlægemidler med α -glukosidase inhibitorer i forbindelse med måltiderne. Det andet område, hvor bioaktive stoffer fra fødevarerindustriens spildprodukter kan udnyttes, er som kilde til nye lægemidler, der hæmmer enzymet aldose reductase. Aldose reductase katalyserer omdannelsen af glukose til sorbitol, og for diabetikere, hvis blodsukkerniveau ikke er under nøje kontrol, medfører det ophobning af sorbitol i øjets linse. Konsekvensen er, at det osmotiske tryk i øjet stiger, hvilket kan medføre nedsat syn eller i værste fald blindhed.

BIOAKTIVE STOFFER I ÆBLESKRÆL OG LØGTOPPE

For at finde biologisk aktive stoffer i fødevarerindustriens spildprodukter, som kan minimere risikoen for følgesygdomme ved type 2 diabetes, anvender vi en ny forskningsdisciplin kaldet metabolomics. Metabolomics er defineret som 'en dybtgående analyse, hvorved alle metabolitter i et biologisk system identificeres og kvantificeres'. Vore metabolomics-undersøgelser har gjort effektiv analyse af bioaktive stoffer i overjordiske dele af forskellige løgarter samt æbleskræl – alt sammen spildprodukter i fødevarerproduktionen.

De første resultater viser, at æbleskræl fra æblesorten 'Pink lady' indeholder en bred vifte af stoffer med α -glukosidase aktivitet, herunder stofferne reynoutrin, avicularin og (-)-epicatechin. Det er lykkedes, at udvikle en selektiv ekstraktionsprocedure, hvor hele gruppen af stoffer kan udvindes til bæredygtig

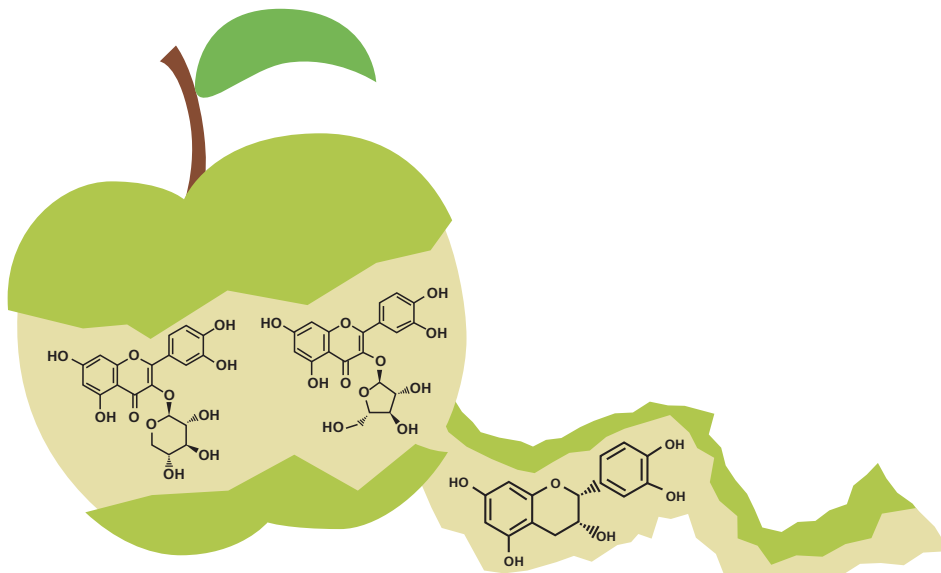
fremstilling af funktionelle fødevarer og naturlægemidler, ligesom de mest potente stoffer kan isoleres i ren form til fremstilling af ordinære lægemidler.

Ligeledes har vores metabolomics-undersøgelser været brugt til at undersøge både toppe og løgknoldene af en lang række løgsorter, herunder almindelig løg, forårsløg, hvidløg, elefant hvidløg, ramsløg, porrer og purløg. Her viser det sig, at mange af løgsorterne har α -glukosidase aktivitet, og at denne aktivitet også findes i løgtoppene, som er spildprodukter i fødevarerindustrien.

For løg er de aktive stoffer især *N-p*-coumaryloctopamine, *N-p*-coumaryltyramine og quercetin. Både løg og æbler forarbejdes i meget store mængder i fødevarerindustrien, og derfor er mængden af spildprodukter så stor, at der er rigeligt med råvarer til en stor produktion af både funktionelle fødevarer, naturlægemidler og ordinære lægemidler. •

Æbleskræl kan bruges til bæredygtig fremstilling af både funktionelle fødevarer og naturlægemidler. Desuden kan nogle af de bioaktive stoffer, som her er vist som strukturformler, isoleres i ren form til anvendelse i ordinære lægemidler.

ILLUSTRATION: MALENE HALD



Kostens sammensætning kan påvirke optagelsen af lægemiddelstoffer

NOGLE LÆGEMIDDELSTOFFER OPTAGES FRA TARMEN VIA DE SAMME TRANSPORTPROTEINER, SOM SENDER AMINOSYRER FRA PROTEINERNE I FØDEN IND I BLODET, OG DET MEDFØRER, AT DER KAN OPSTÅ KONKURRENCE OM TRANSPORTØRERNE. EN PROTEINRIG KOST KAN MULIGVIS FORMINDSKE OPTAGET AF DISSE LÆGEMIDDELSTOFFER.

De fleste lægemiddelstoffer, som indtages i tabletter, skal ind i blodet for at virke. Det sker ved, at tabletten opløses i maven og tarmene, hvorfra lægemiddelstoffet bevæger sig gennem tarmvæggen og ind i blodbanen. Blodet pumper lægemiddelstoffet rundt i kroppen, hvilket sætter stoffet i stand til at udøve sin virkning i de ønskede organer. Effekten er dels afhængig af mængden af lægemiddel-

stof i blodet, dels af den tid stoffet opholder sig i blodbanen. Derfor kan det medføre ændringer i lægemiddelstoffets virkning, hvis der er forhold i tarmen, som påvirker optagelsen gennem tarmvæggen.

Nogle lægemiddelstoffer transporteres ind i blodet via transportproteiner, som sidder i tarmcellernes membraner i tarmvæggen. Transportørernes primære funktion er at sende vandopløselige næringsstoffer fra

FORFATTERE

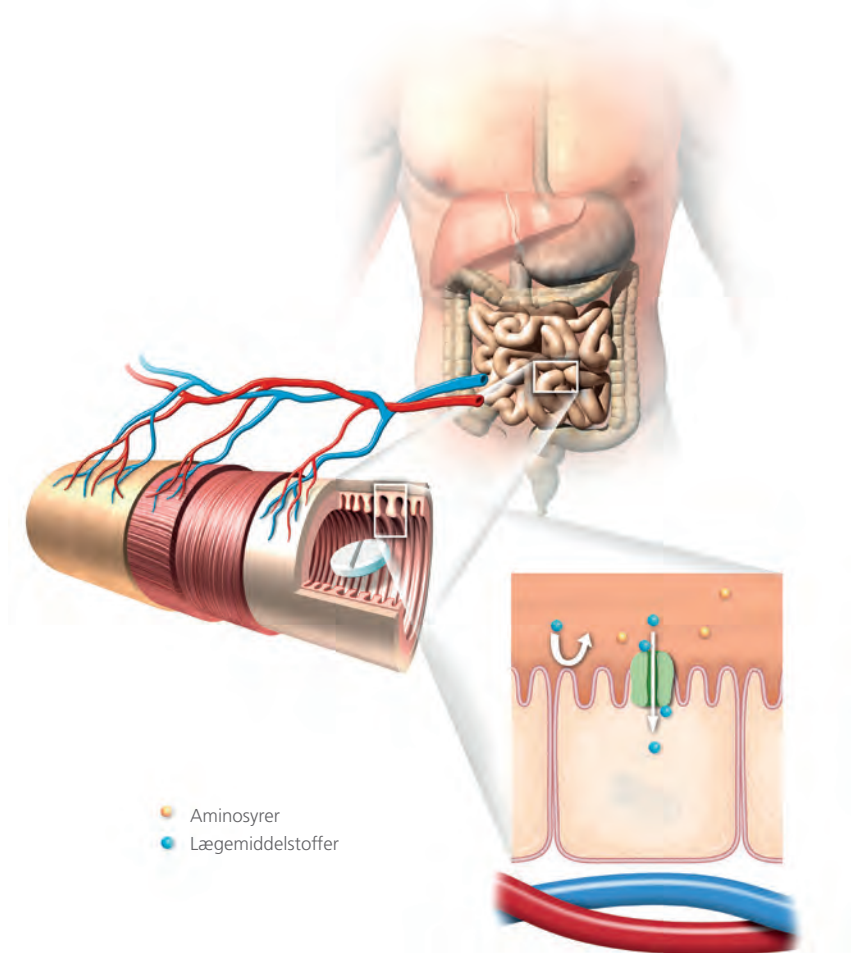
Ph.d. Carsten Uhd Nielsen er lektor på Institut for Farmaci

Ph.d. Sidsel Frølund er Post. Doc. på Institut for Farmaci

Cand.pharm. Martha Kampp Nøhr er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci

Lic.scient. Birger Brodin er lektor på Institut for Farmaci

Ph.d. René Holm er Divisional Director, Biologics and Pharmaceutical Sciences, H. Lundbeck A/S og adjungeret lektor på Institut for Farmaci



Tarmcellen er placeret mellem tarmvæsken og blodbanen. Små vandopløselige lægemiddelstoffer som vigabatrin og gaboxadol (blå kugler) kan optages fra tarmvæsken via aminosyretransportøren PAT1. Transportøren er placeret i tarmcellens cellemembran på den side, der vender ud mod tarmvæsken, og dens primære funktion er at transportere aminosyrer fra føden (gule kugler) gennem membranen og ind i tarmcellen. Derfra fortsætter aminosyrerne og lægemiddelstofferne ind i blodet. Aminosyrerne og lægemiddelstofferne konkurrerer om adgang til transportøren (den grønne figur). Den generelle transporthastighed gennem transportøren påvirkes af pH i tarmvæsken, som bestemmes af antallet af protoner (H^+). Lav pH i tarmvæsken øger hastigheden.

ILLUSTRATION: HENNINH DALHOFF

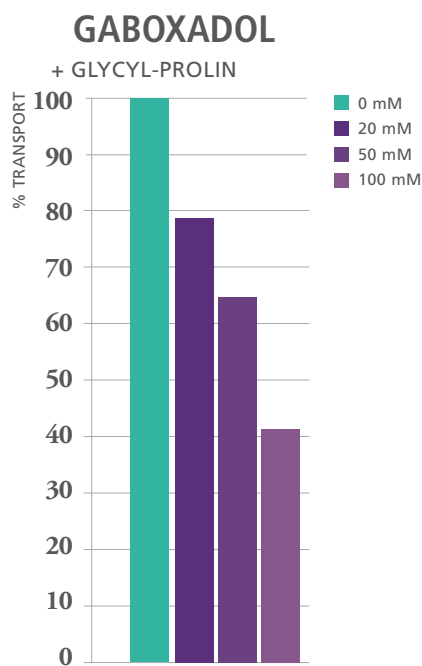
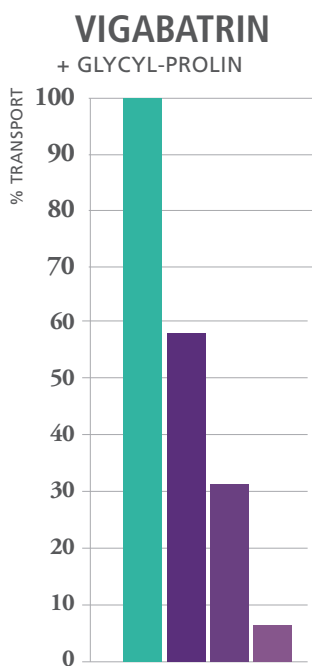


FOTO: WIKIPEDIA/MICHALE LINNENBACH

Æg fra den afrikanske sporefro *Xenopus laevis* er velegnede til undersøgelser af transportører som PAT1. Når man injicerer genetisk materiale, som koder for transportøren, i frøægget, udtrykkes transportøren i æggets cellemembran (grøn oval). Herefter kan man måle transporten af lægemiddelstoffer gennem transportøren og bestemme i hvor høj grad tilstedeværelsen af aminosyrer eller dipeptider (gule kugler) påvirker transporten. Det øverste diagram til venstre, viser effekten af forskellige koncentrationer af dipeptidet glycyl-prolin på transporten af lægemiddelstof (blå kugler) vigabatrin, mens det øverste diagram til højre viser effekten på transporten af gaboxadol.

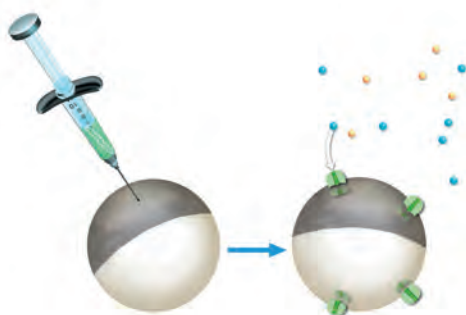


ILLUSTRATION: HENNING DALHOFF

føden gennem de fedtholdige cellemembraner og ind i blodbanen. De mest almindelige vandopløselige næringsstoffer er vitaminer og sukkerstoffer samt aminosyrer og små peptider, som er nedbrydningsprodukter fra proteinerne i føden. Lægemiddelstoffer, som optages via transportører, benytter altså de naturlige optagelsesveje for næringsstoffer fra føden. På denne måde bliver det muligt at få transporteret vandopløselige lægemiddelstoffer gennem de fedtholdige cellemembraner og ind i blodbanen, men følgen er, at næringsstoffer fra føden kan bremse optagelsen af lægemiddelstof fra tarmen, fordi der opstår en konkurrence om pladsen på transportproteinerne. Vi har undersøgt, hvordan tarmens indhold af næringsstoffer som aminosyrer og dipeptider, der består af sammenkoblede aminosyrer, hæmmer kroppens evne til at optage lægemiddelstoffer via transportørerne i tarmvæggen. Undersøgelsen belyser, hvordan næringsstoffer

fra føden kan interagere med optagelse af lægemiddelstoffer.

DEN PROTONKOBLEDE AMINOSYRETRANSPORTØR

Vi fokuserede på en aminosyretransportør, som sidder i den del af cellemembranen, som vender ud mod tarmvæsken. Transportøren kaldes protonkoblet aminosyretransportør nr. 1 (PAT1), og dens biologiske funktion er at transportere aminosyrer som prolin og alanin ind i tarmcellen. At transportøren er protonkoblet betyder, at dens effektivitet afhænger af pH, dvs. koncentrationen af protoner i tarmvæsken. Lav pH svarende til en høj protonkoncentration på indersiden af tarmen øger således transportørens effektivitet og dermed hastigheden for transporten af aminosyrer ind i cellen.

PAT1 findes i tyndtarmen, som er den del af tarmen, hvorfra der sker det største optag af næringsstoffer. Det er også den del af tarmen, hvor lægemidler, vi indtager i tabletform, primært optages. Vi er altså fra naturens side indrettet på en måde, som skaber mulighed for interaktioner mellem næringsstoffer og lægemiddelstoffer i tyndtarmen.

TRANSPORT AF LÆGEMIDDELSTOFFER

To vandopløselige lægemiddelstoffer, som den protonkoblede aminosyretransportør sender gennem cellemembranen og ind i tarmcellerne, er sovemidlet gaboxadol samt vigabatrin, der anvendes til behandling af epileptiske kramper i nyfødte og spædbørn. Lægemiddelstoffernes høje vandopløselighed medfører, at de ikke selv kan trænge gennem den fedtholdige cellemembran, men undersøgelser har vist, at de bliver hjulpet gennem barrieren af aminosyretransportøren.

Når lægemiddelstoffer transporteres via PAT1 transportøren, er det begrænset, hvor hurtigt stoffet kan komme ind i tarmcellen, samt hvor store mængder, der kan krydse cellemembranen. Begrænsningerne er betinget af, hvor mange transportører, der er i tarmcellen, og hvor mange molekyler transportøren kan transportere i sekundet. Desuden kan transporten af lægemiddelstoffer ind i tarmcellen blive reduceret, hvis der er andre stoffer i tarmvæsken, som også skal bruge transportøren. Hvis koncentrationen af sådanne molekyler er høj, vil de konkurrere med vigabatrin og gaboxadol om plads på transportøren, hvilket kan betyde en reduktion i antallet af vigabatrin-

ILLUSTRATION: MALENE HALD

molekyler eller gaboxadolmolekyler, der kan optages. Derved formindskes mængden af lægemiddelstof, som kommer ind i blodet, og dette kan potentielt betyde, at der ikke opnås den ønskede kliniske effekt af lægemidlet i kroppen.

AMINOSYRER OG DIPEPTIDER PÅVIRKER LÆGEMIDDELOPTAGELSEN

Aminosyrer og dipeptider kommer fra føden, hvor de er nedbrydningsprodukter af de proteiner, vi får fra fx æg, kød og fisk. For at undersøge om vores kost kan påvirke vores evne til at optage de to lægemiddelstoffer, har vi målt på PAT1-transportørens evne til at optage vigabatrin og gaboxadol, når der samtidig er enten aminosyrer eller dipeptider til stede i tarmvæsken.

Aminosyrer, som optages gennem transportøren, nedsætter optagelsen af lægemiddelstofferne. Umiddelbart skulle man ikke forvente, at dipeptider, som ikke fragtes gennem transportøren, også kan formindskede optagelsen af medicin. Alligevel undersøgte vi betydningen af tilstedeværelsen af en række af dipeptider. Grunden til vores interesse var, at vi tidligere har påvist, at lægemiddelstoffet 5-aminolevulinsyre, som anvendes til at behandle eller visualisere kræftceller, optages via aminosyretransportøren PAT1. Lægemiddelstoffet er en aminosyre, men ikke en af de normale aminosyrer fra føden, som indgår i opbygningen af kroppens proteiner. Stoffet ligner i nogle biologiske henseender et dipeptid, og derfor var det relevant at undersøge, om rigtige dipeptider i tarmvæsken også påvirker optagelsen af vigabatrin og gaboxadol.

For at være sikre på, at vi målte på den rigtige transportør – og kun den – brugte vi ikke celler fra tarmen i de indledende forsøg, fordi tarmceller har mange forskellige transportører for næringsstoffer, og nogle af dem ville kunne påvirke vores resultater. Derfor anvendte vi frøæg, hvor man ved hjælp af bioteknologiske metoder kan indsætte en ønsket transportør i æggets cellemembran. Da frøæg fra naturens hånd ikke har særlig mange transportører i cellemembranen, kan man undersøge den indsatte transportør uden af få falske resultater.

Forsøgene viste, at dipeptider som glycyl-tyrosin, glycyl-glycin, glycyl-sarcosin og glycyl-prolin påvirker aminosyretransportøren PAT1. Omfanget af transporten af både vigabatrin og gaboxadol via transpor-

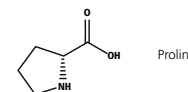
tøren falder, hvis man øger koncentrationen af dipeptid i opløsningen med frøæggene. Derimod så vi ikke nogen forskel i transporten, da vi testede tripeptidet glycyl-sarcosyl-sarcosin, som består af tre aminosyrer. Resultaterne viser derfor tydeligt, at små peptiders kemiske struktur er kritisk for interaktionen med aminosyretransportøren, og derfor er det nødvendigt at undersøge de mulige interaktioner mellem transportøren og hvert enkelt peptid.

Efter forsøgene med frøæg undersøgte vi transporten af gaboxadol og vigabatrin gennem dyrkede celler fra human tarm, som indeholder mange forskellige transportører ud over PAT1. Her fandt vi det samme mønster som i frøæggene, nemlig at nogle af dipeptiderne nedsætter den mængde af lægemiddelstof, som kommer igennem tarmcellen. Næste trin bliver dyreforsøg, som skal afklare, om dipeptider også kan nedsætte mængden af lægemiddelstof, der kommer ind i blodbanen i levende dyr.

FØDEVALG OG VIRKNINGEN AF MEDICIN

Set fra et behandlingsmæssigt perspektiv er den nye viden om konkurrencen mellem fødekomponenter og lægemidler væsentlig. Konkurrencen kan nemlig medføre, at kostens sammensætning forskellige steder i verden kan påvirke optagelsen af lægemiddelstoffer på forskellig vis. Konsekvensen kan være, at man bør indtage lægemidlerne på en måde, som tager hensyn til den lokale sammensætning af kosten.

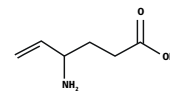
Eksempelvis spiser befolkningen i USA og Europa en større procentdel kød og dermed protein end folk i Asien, hvor føden indeholder mere kulhydrat. Når man anvender et lægemiddel, der transporteres af de samme transportproteiner som aminosyrer fra føden, kan det således være en fordel, at patienter i USA og Europa bliver informeret om, at medicinen bør tages en time inden måltidet, mens der måske ikke er brug for lignende restriktioner for asiatiske patienter. Fremtidige kliniske forsøg vil vise, om lægemiddelstoffers konkurrence med aminosyrer og dipeptider om adgangen til aminosyretransportøren PAT1 kan medføre ændringer i vores måde at indtage nogle lægemidler på. •



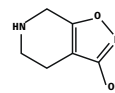
Prolin



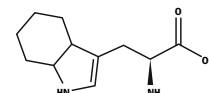
Alanin



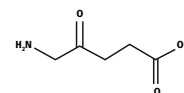
Vigabatrin



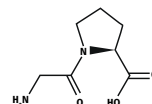
Gaboxadol



Tryptophan



5-aminolevulinsyre



Glycyl-prolin

Kemiske strukturer: Aminosyrerne prolin og alanin er nedbrydningsprodukter fra proteiner i føden. Vigabatrin, gaboxadol og 5-aminolevulinsyre er lægemiddelstoffer. Glycyl-prolin er et dipeptid sammensat af de to aminosyrer glycyl og prolin.

ILLUSTRATION: MALENE HALD



Ordnung muss (nicht) sein!

NÅR ET LÆGEMIDDELSTOF INDtages som TABLETTER, SKAL MEDICINEN OPLØSES I TARMVÆSKEN FOR AT BLIVE OPTAGET I KROPPEN. DE FLESTE SMÅMOLEKYLÆRE LÆGEMIDDELSTOFFER UNDER UDVIKLING ER KRYSTALLINSKE, HVILKET OFTE MEDFØRER LAV VANDOPLØSELIGHED OG RINGE BIOTILGÆNGELIGHED. DERFOR ER DER STOR INTERESSE FOR AMORFE FORMULERINGER, SOM LETTERE OPLØSES I TARMVÆSKEN.

FORFATTERE

Cand.pharm. Korbinian Löbmann er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci

Cand.pharm. Katrine Tarp Jensen er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci.

Dr. Holger Grohganz er lektor på Institut for Farmaci.

Dr. Thomas Rades er professor på Institut for Farmaci.

Omkring 70 procent af alle småmolekylære lægemiddelstoffer under udvikling har en lav opløselighed i tarmvæsken. Yderligere 20 procent har desuden en ringe evne til at trænge gennem tarmvæggen. Hvis sådanne dårligt opløselige lægemiddelstoffer indtages som tabletter, har de svært ved at komme ind i blodet, der skal transportere medicinen hen til virkningsstedet i kroppen. Tabletter er generelt den mest acceptable doseringsform hos patienterne, eftersom medicinen er let at indtage. Men lav vandopløselighed medfører i mange tilfælde, at medicinalindustrien må opgive lovende lægemiddelstoffer, fordi det mislykkes at finde en passende doseringsform. Derfor er det vigtigt at overvinde problemerne med begrænset opløselighed for

at sikre, at disse nye lægemiddelstoffer kan komme patienterne til gavn.

Småmolekylære lægemiddelstoffer er ofte krystallinske. En af de mest lovende metoder til at forbedre vandopløseligheden er at omdanne stoffet til en amorf form, som hurtigere går i opløsning i tarmvæsken. I praksis medfører amorfe lægemiddelformuleringer imidlertid store udfordringer, fordi de tit er så ustabile, at medicinen kun tåler opbevaring i et par dage. Det er slet ikke tilstrækkelig tid, hvis medicinen skal nå frem til patienten, inden den er udløbet.

KRYSTALLINSK OG AMORF

Den krystallinske tilstand er et ordnet system, hvor molekylerne er arrangeret i et veldefineret tredimensionelt krystalgitter. I kemiske

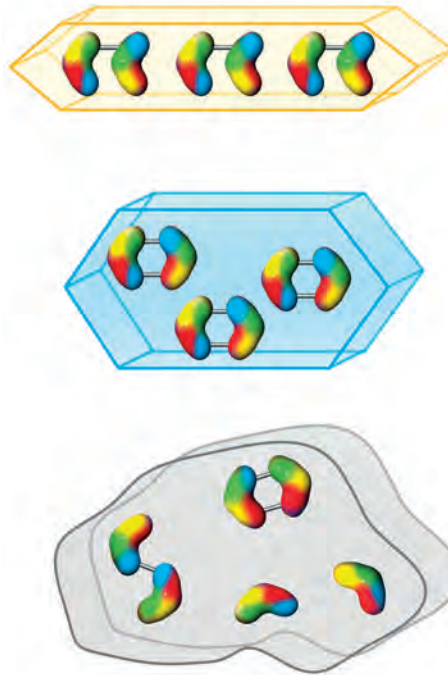
forbindelser som eksempelvis lægemiddelstoffer kan molekylerne ofte arrangere sig i krystalgitteret på to eller flere forskellige måder, hvilket kaldes polymorfisme. De forskellige polymorfe former har forskellige kemiske og fysiske egenskaber såsom smeltepunkt, opløselighed og kemisk reaktivitet. Dette påvirker farmaceutisk relevante parametre som fysisk og kemisk stabilitet samt stoffets biofarmaceutiske adfærd i kroppen. Den mest stabile polymorfe form har den laveste frie energi, og andre former har derfor tendens til at omdannes til denne type krystal, som desværre også har den laveste vandopløselighed. Ofte vil dog ingen af krystalformerne være særlig lette at opløse.

For at opnå en betragtelig forbedring af opløseligheden og udløsningsprofilen kan man i stedet fremstille lægemiddelstoffet i amorf form. Amorf betyder uordnet, og den amorse tilstand er et højenergistadie, hvor molekylerne ikke danner et tredimensionelt krystalgitter, men arrangerer sig tilfældigt. Derved får molekylerne en højere intern mobilitet, hvilket giver lægemiddelstoffet en meget bedre opløselighed end de krystal-liske former.

Desværre bevirker den høje interne energi i amorse lægemiddelstoffer, at de er termodynamisk ustabile, og desuden bevarer amorse forbindelser ofte en lille grad af molekylær orden mellem nogle få nærtliggende molekyler, som danner minikrystaller. Disse to forhold resulterer i en udpræget tendens til, at stofferne over tid omdannes tilbage til en krystallinsk form med lav energi, hvilket formindsker stabiliteten under lægemiddelstoffets opbevaring.

FREMSTILLING AF AMORFE STOFFER

Generelt kan et lægemiddelstof fremstilles i en uordnet amorf tilstand på to måder. Den ene mulighed er at inducere uorden ved direkte omdannelse fra den krystallinske tilstand, hvilket man som regel opnår ved anvendelse af en vibrerende kuglemølle. Alternativt kan fremstillingen foretages ud fra en termodynamisk stabil, men ikke-krystallinsk tilstand som en smeltemasse eller en opløsning. Her nedkøler man hurtigt det rene smeltede lægemiddelstof eller udfælder hurtigt stoffet fra en væske. Selvom den amorse tilstand ikke er opdelt i forskellige veldefinerede polymorfe former som den krystallinske tilstand, vil forskellige processer påvirke lægemiddelstoffets ter-



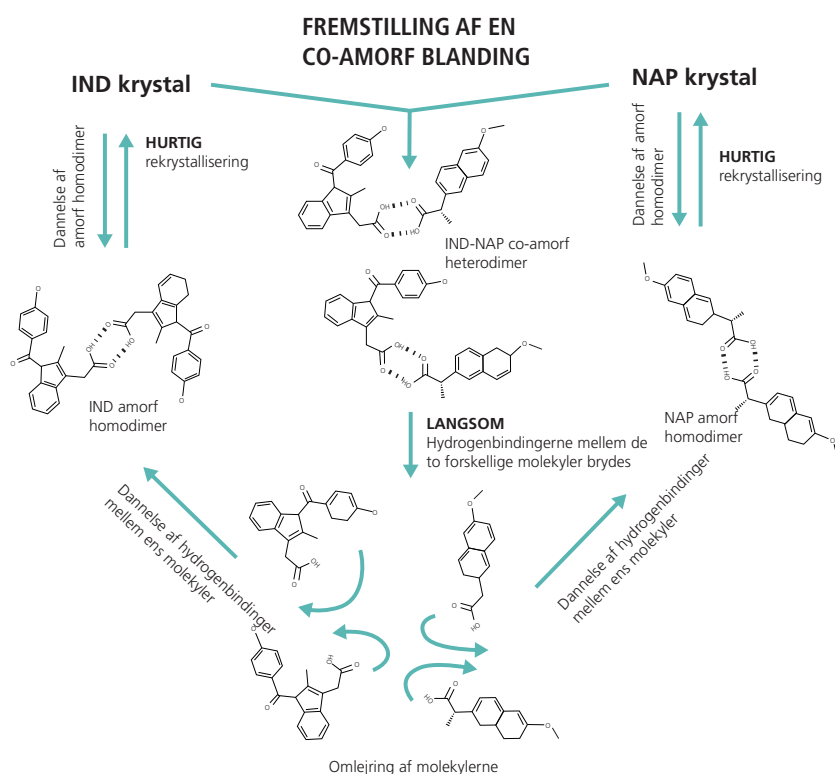
Øverst og i midten ses to krystalline polymorfe former og nederst en uordnet amorf form af det samme lægemiddelstof.

ILLUSTRATION: HENNING DALHOFF

modynamiske egenskaber. For at undersøge dette har vi bearbejdet det smertestillende lægemiddelstof indomethacin ved hjælp af tre forskellige metoder, henholdsvis hurtig nedkøling af en smeltemasse, spraytørring og bearbejdning i en kuglemølle.

Efter fremstillingen kunne vi påvise forskelle i lægemiddelstoffets molekylære struktur samt i de intermolekylære interaktioner mellem nærtliggende molekyler, hvilket førte til forskelle i stoffets opløsningshastighed og fysiske stabilitet. Desuden opstod der strukturelle forskelle ved anvendelse af forskellige procesparametre. Fx påvirkede nedkølingshastigheden indomethacins fysiske stabilitet, når lægemiddelstoffet blev nedkølet fra en smeltemasse. Således medførte hurtigere nedkøling, at graden af uorden i smeltemassen i større omfang blev bevaret i det amorse lægemiddelstof, hvilket øgede den fysiske stabilitet. Under maling i en vibrerende kuglemølle observerede vi, at længere bearbejdningstider resulterede i forøget uorden og dermed mere stabile amorse indomethacinprøver. Ligeledes førte længere tids bearbejdning i møllen til en forbedring af lægemiddelstoffets opløsningshastighed.

Overordnet kan man sige, at valget af proces samt procesparametre påvirker et lægemiddelstofs molekylære karakteristika og dermed opløsningshastigheden. Desuden påvirkes den fysiske stabilitet i forhold til re-krystallisering. Omdannelsen fra en amorf tilstand, som er totalt uordnet, til det



Til venstre og til højre vises hurtig rekrystallisering af amorne prøver af to smertestillende lægemiddelstoffer indomethacin (IND) og naproxen (NAP). Når man fremstiller en amorf blanding af de to lægemiddelstoffer (midtfor) stabiliseres den amorne tilstand, fordi hydrogenbindingerne mellem indomethacin-molekylet og naproxen-molekylet først skal brydes, inden rekrystallisering af de individuelle stoffer kan finde sted. Fremstilling af amorne blandinger kan således øge stabiliteten, hvilket kan gøre det muligt at få fuldt udbytte af fordelene ved amorfisering af lægemiddelstoffer.

ILLUSTRATION: MALENE HALD

velordnede krystallinske stadie kan betragtes som en to-trins-proces. Først dannes der en krystallinsk kerne i det amorne materiale, og derpå vokser krystallen. Dette er forklaringen på, at en højere grad af uorden bidrager til et mere stabilt amorft system.

STABILISERING AF AMORFE STOFFER

For at bevare et lægemiddelstof i den amorne form og for at forebygge dannelsen af en krystallkerne og den efterfølgende rekrystallisering bliver farmaceutiske forskere nødt til at finde ud af, hvordan lægemiddelstoffer kan stabiliseres i den amorne tilstand. I dag er den mest udbredte strategi at inkorporere lægemiddelstoffet i en amorf polymer. Man fremstiller her en blanding af lægemiddelstoffet og en hydrofil polymer, hvor partikelstørrelsen af lægemiddelstoffet er reduceret til molekylært niveau. Fremgangsmåden har dog visse ulemper, som primært skyldes polymerens reaktioner ved kontakt med vand, som blødgør den amorne blanding og forøger den interne molekylære mobilitet, hvilket kan ødelægge blandingens fysiske stabilitet. En anden ulempe kan være begrænset blandbarhed mellem lægemiddelstoffet og polymeren, hvilket medfører, at der kræves store mængder polymer for at inkorporere en tilfredsstillende mængde lægemiddelstof. I sidste ende vil dette betyde, at man er nødt til at fremstille alt for store tabletter.

BLANDINGER ØGER STABILITETEN

Disse vanskeligheder har skabt en stigende interesse for amorne lægemiddelformuleringer, som består af to farmakologisk passende lægemiddelstoffer. I denne metode forenes to lægemiddelstoffer, som stabiliserer hinanden, med henblik på at fremstille en amorf blanding med forbedret opløsningsprofil.

I et forsøg med fælles amorfisering af de smertestillende lægemiddelstoffer indomethacin og naproxen har vi observeret en øget indre modstand mod rekrystallisering, når lægemiddelstofferne blev nedkølet fra en smeltet masse i forholdet 1:1. Den forbedrede stabilitet skyldes dannelsen af molekylære komplekser af de to molekyler. Herved fjernes de små øer af molekylær orden, som er til stede i den amorne form af de individuelle lægemiddelstoffer, og der dannes hydrogenbindinger mellem de to molekyler, som stabiliserer den nye amorne tilstand.

Før at dette system kan nedbrydes og omdannes til de respektive individuelle krystallinske stoffer, kræver det, at hydrogenbindingerne brydes, for at molekylerne kan frigøres fra hinanden. Først da vil de individuelle lægemiddelstoffer igen blive i stand til at danne krystallkerner, hvilket er udgangspunktet for ny krystallinsk vækst. Udover forøgelsen af den fysiske stabilitet udviste den blandede amorne formulering en forbedret opløselighed i forhold til såvel de krystallinske som de amorne former af de individuelle stoffer. Anvendelsen af to små molekyler til dannelsen af en amorf blanding har været en succes, og resultaterne har skabt stor interesse indenfor forskningen – i særdeleshed for at imødekomme behovet for et godt alternativ til anvendelsen af polymerer. Denne strategi kan fremover blive afgørende i medicinalindustrien. Studierne har indtil nu koncentreret sig om at kombinere to småmolekylære lægemiddelstoffer, hvilket stiller krav om, at kombinationen af netop disse to lægemiddelstoffer er relevante at give til patienterne. Normalt foretrækker den farmaceutiske industri og sundhedsmyndighederne imidlertid, at tabletter kun indeholder et aktivt lægemiddelstof. Derfor fokuserer vi nu på at finde passende småmolekylære hjælpestoffer, der kan virke som partnernolekyler ved at skabe stærke bindinger til et enkelt lægemiddelstof i amorne blandinger. •

OVERMÆTNING FOR BEGYNDERE

En flaske champagne indeholder kulsyre i en overmættet tilstand, fordi kulsyren er pumpet ind i væsken under tryk, hvilket tilfører systemet ekstra energi. Derfor bobler kulsyren lystigt, når flasken åbnes. Hvis man tilfører endnu mere energi ved at ryste flasken, får kulsyren væsken til at sprøjte ud med stor kraft. Hvis et lægemiddel i en kapsel overmættes på tilsvarende vis, frigives der overskudsenergi, når kapslen går i stykker og opløses i tarmen. Det medfører, at et svært opløseligt lægemiddelstof lettere bliver opløst i tarmvæsken.

ILLUSTRATION: ISTOCK PHOTO



Ny metode skal øge biotilgængeligheden af lægemiddelstoffer:

Overmætning i kapsler eller i tarmen

OPLØSNING I TARMVÆSKEN ER EN NØDVENDIGHED FOR, AT LÆGEMIDDELSTOFFER INDTAGET GENNEM MUNDEN KAN KOMME IND I BLODET OG UDØVE DERES VIRKNING I KROP- PEN. MEN DE FLESTE NYE LÆGEMIDDELSTOFFER ER SVÆRE AT OPLØSE. EN NY METODE KAN FORBEDRE VANDOPLØSELIGHEDEN VED AT OVERMÆTTE EN OLIE MED LÆGEMIDDEL- STOF, HVILKET ØGER DEN DEL AF DOSIS, SOM BLIVER OPLØST I TARMVÆSKEN.

De fleste lægemiddelstoffer indtages i tabletter eller kapsler, hvilket er mest bekvemt for patienterne. Når tabletten er slugt, går den fra hinanden. Derpå skal lægemiddelstoffet opløses i tarmvæsken, før det kan trænge gennem tarmvæggen og komme ind i blodet, som transporterer stoffet hen til virkningsstedet i kroppen. Den del af dosis, som kommer ind i blodet, bestemmer lægemid-

delstoffets biotilgængelighed.

Tarmvæsken består primært af vand, og derfor er det afgørende, at lægemiddelstoffet er tilstrækkeligt vandopløseligt. Desværre er 70 procent af alle nye lægemiddelstoffer, som fremstilles i moderne screeningsprogrammer, svært opløselige i vand og har således en ringe biotilgængelighed. Derfor er det en stor udfordring at øge den andel af dosis, som opløses i tarmvæsken, og som kan blive

FORFATTERE

Ph.d. Nicky Thomas er postdoc på Institut for Farmaci.

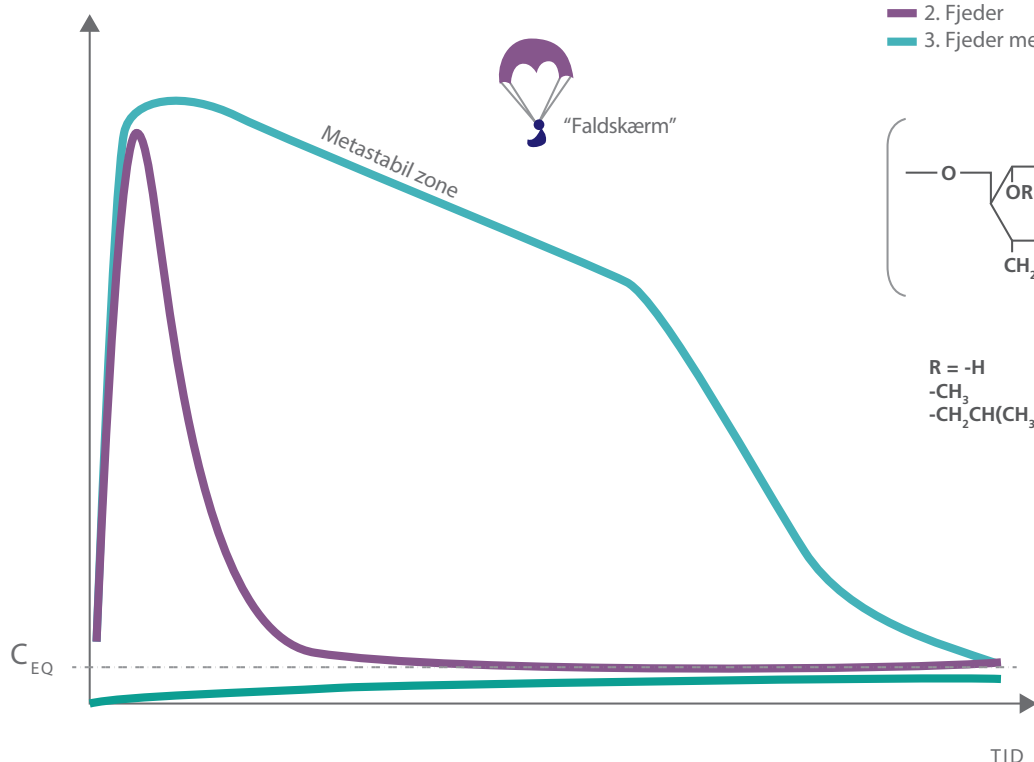
Ph.d. Rene Holm er funktionschef på H. Lundbeck A/S og adjungeret lektor på Institut for Farmaci.

Dr. Thomas Rades er professor på Institut for Farmaci.

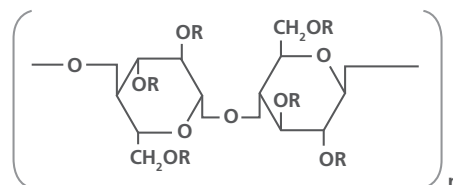
Ph.d. Anette Müllertz er lektor på Institut for Farmaci.



LÆGEMIDDELKONCENTRATION



- 1. Krystalisk pulver
- 2. Fjeder
- 3. Fjeder med faldskærm



R = -H
 -CH₃
 -CH₂CH(CH₃)OH

Man kan sammenligne et overmættet lægemiddel med en spændt fjeder, som ved udløsning overmætter tarmvæsken med lægemiddelstoffet. Det kan fx opnås ved anvendelse af en olie, som er overmættet med lægemiddelstof. Udfældningen i tarmvæsken må imidlertid ikke ske for hurtigt, og derfor kan man tilsætte farmaceutiske hjælpestoffer, der nedbremses hastigheden af lægemiddelstoffets udfældning, som en faldskærm bremser frit fald. På den måde bliver det muligt at opretholde den overmættede tilstand i tarmvæsken gennem længere tid. Den grønne kurve viser mængden af opløst lægemiddelstof i tarmvæsken fra en almindelig tablet. Den lilla kurve viser frigivelsen af lægemiddelstof fra en overmættet olie uden brug af hjælpestoffer. Den blå kurve viser frigivelsen af lægemiddelstof fra en overmættet olie med hjælpestoffer.

ILLUSTRATION: MALENE HALD

transporteret ind i blodet. Et nyt princip til at forbedre biotilgængeligheden har vakt stor interesse på internationalt plan. Metoden går ud på at formulere tabletter eller oliefyldte kapsler, som udløser en overmættet koncentration af lægemiddelstoffet i tarmvæsken. Herved vil en større del af lægemiddelstoffet blive absorberet og transporteret gennem tarmvæggen.

OVERMÆTNING AF OPLØSNINGER

Der er masser af dagligdags eksempler på overmætning af vandige opløsninger. En klassiker er kulsyre i en sodavand, som er opløst i en højere koncentration i sodavanden end det niveau, som opløseligheden af kulsyre normalt tillader i vand. For at fremstille en overmættet opløsning er det nødvendigt at tilføre ekstra energi til systemet, hvilket opnås ved at pumpe kulsyre ind i vandet under tryk. Den ekstra energi frigives igen i form af opstigende bobler af kulsyre, når man normaliserer trykket ved at åbne sodavanden. Et andet eksempel på brug af overmætning er håndvarmere, som vi typisk bruger på skiferie. Det er små plastikposer med en overmættet opløsning af saltet

natriumacetat. Udkrystallisering af den overmættede opløsning startes ved at knække en lille metalskive i posen. Ved krystalliseringen bringes saltet i en lavere energitilstand end i den overmættede opløsning, og den overskydende energi frigives som varme.

Konceptet med overmætning kan også udnyttes i farmaceutisk forskning, hvor man arbejder med at udvikle oliefyldte kapsler, hvor lægemiddelstoffet er indlejret i en overmættet form, hvorfra den midlertidigt oplagrede energi frigives i tarmvæsken, hvilket forbedrer lægemiddelstoffets opløselighed.

FRIGIVELSE AF OVERSKYDENDE ENERGI

En mulighed for at opnå overmætning i tarmen er at fremstille lægemiddelstoffet i en amorf tilstand, som er i et højere energiniveau end den almindelige krystallinske form, og derfor hurtigere går i opløsning og kan danne en overmættet opløsning. En anden lovende metode går ud på at opløse lægemiddelstoffet i flydende fedtstoffer som fx olivenolie. Når en sådan lipidopløsning fordøjes i mavetarmkanalen, opløses lægemiddelstoffet så hurtigt i tarmvæsken,

at den normale mætningsgrænse for opløst lægemiddelstof overskrides. Overmætningen i tarmvæsken øger den andel af dosis, som opløses, krydser tarmvæggen og kommer ind i blodet.

For at kunne udnytte fordelene ved overmætning af olier er det imidlertid nødvendigt, at lægemidlet formuleres på en måde, så det overmættede stadium i tarmvæsken fastholdes længe nok til, at tarmcellerne kan nå at transportere det frisatte lægemiddelstof ind i blodet. Det kan opnås ved, at lægemidlet får tilsat hjælpestoffer, som stabiliserer den overmættede opløsning. Vi undersøger for tiden, om en sådan udløsningsprofil kan opnås ved at tilsætte en polymer, fx baseret på cellulose, som bremser hastigheden af lægemiddelstoffets udfældning.

DOSERING VED OVERMÆTNING

Hvis det lykkes at udvikle lægemidler, som kan frigive lægemiddelstoffer på en måde, som sikrer, at tarmvæsken overmættes i et passende langt tidsrum, er der endnu en stor udfordring, som skal overvindes. Den mængde lægemiddelstof, som kan indgives i en enkelt dosis fra en overmættet olie i en kapsel eller fra en tablet, er nemlig begrænset. Det medfører, at patienterne skal tage mange doser i løbet af døgnet, og det vil være langt mere hensigtsmæssigt, hvis en enkelt kapsel kan rumme en døgn dosis. Derfor arbejder vi med at udvikle en ny doseringsform baseret på kapsler, som er fyldt med en olie, som indeholder en blanding af lipider og overfladeaktive stoffer. Blandingen opvarmes til 60 °C, og varmen gør det muligt at overmætte blandingen med lægemiddelstof. Derpå nedkøles blandingen langsomt til stuetemperatur, hvorved

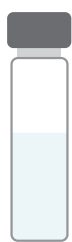
overmætningen bevares.

SUCCESS I DYREMODEL

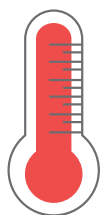
Når olien opløses i vand eller vandige væsker som tarmvæsken, dannes der spontant en emulsion af bittesmå dråber med diametre på få nanometer. Metoden kaldes derfor self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS). I et modelforsøg, hvor fordøjelsen i tarmen efterlignes, har vi undersøgt metodens egnethed til at udløse overmættede lægemiddelstoffer fra en olie. I nogle tilfælde lykkedes det at få frigivet lægemiddelstoffet på måder, der fremkaldte overmættede opløsninger i den eksperimentelle tarmvæske. Vore detaljerede analyser viste samtidig, at nogle lægemiddelstoffer fælder ud på amorf form under fordøjelsen af SNEDDS. En amorf form vil have en bedre umiddelbar vandopløselighed end stoffernes almindelige krystallinske former og derfor øge lægemiddelstoffernes biotilgængelighed.

Vi har også testet overmættede SNEDDS i hunde og sammenlignet med tilsvarende formuleringer uden overmætning. Forsøgene viser, at overmætning af olierne med lægemiddelstof næsten fordobler biotilgængeligheden af lægemiddelstoffet i dyremodellen. Et andet lovende resultat er, at vores overmættede SNEDDS er forbløffende stabile og tåler opbevaring i op til ti måneder. Det har stor praktisk betydning, fordi lægemidler, som fremstilles med denne metode, så kan lagres og distribueres på normal vis. •

SNEDDS



LÆGEMIDDEL
MED FJEDER



LÆGEMIDDEL
I OPLØSNING

overmættede SNEDDS

Grafikken viser princippet i fremstilling af overmættede olier, der danner nanoemulsioner ved kontakt med tarmvæsken. Olien overmættes med lægemiddelstof ved samtidig tilførsel af varme. Derpå nedkøles olien langsomt, hvorved overmætningen bevares ved stuetemperatur.

ILLUSTRATION: MALENE HALD

Modelforsøg baner vejen:

Effektiv optagelse af lægemidler gennem kindslimhinden

NÅR LÆGEMIDDELSTOFFER OPTAGES GENNEM KINDSLIMHINDEN, SENDES STOFFERNE DIREKTE IND I BLODET UDEN RISIKO FOR AT BLIVE NEDBRUDT I MAVE-TARMKANALEN ELLER I LEVEREN. MULIGHEDERNE UDNYTTES ENDNU KUN I BEGRÆNSET OMFANG. DET SKYLDDES ISÆR MANGEL PÅ LABORATORIEMODELLER, SOM KAN FORUDSIGE, HVORDAN NYE LÆGEMIDDELSTOFFER OPTAGES GENNEM DEN MENNESKELIGE KINDSLIMHINDE

FORFATTERE

Cand.pharm. Emil Meng-Lund er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci.

Ph.d. Rene Holm er funktionschef på H. Lundbeck A/S og adjungeret lektor på Institut for Farmaci.

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

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

Lægemiddelstoffer som nitroglycerin mod hjertekrampe og nikotin til rygeafvænning optages effektivt gennem kindslimhinden, men alligevel indgives kun få af nutidens lægemidler på denne måde. Det skyldes ikke mindst, at den farmaceutiske industri mangler gode laboratoriemetoder, som kan forudsige optagelsen af nye lægemiddelstoffer i forsøgsdyr og efterfølgende korreleres til mennesker. Derfor har vi undersøgt, om en cellekulturmodel kan forudsige absorptionen over kindslimhinden i minigrise. Grisens kindslimhinde har samme kemiske opbygning og dermed samme barriereegenskaber som den humane kindslimhinde.

Optagelse af lægemiddelstoffer via mundhulen kan have betydelige fordele sammenlignet med traditionel indgift i form af tabletter, hvor lægemiddelstoffet optages i blodet fra mave-tarm kanalen. Medicinen virker hurtigt, fordi blodgennemstrømningen i kindslimhinden er høj,

og da lægemiddelstoffet sendes direkte ind i blodet, undgås mavesyren, som kan nedbryde syrefølsomme lægemidler. Lægemiddelstoffet skal heller ikke først passere leveren med risiko for nedbrydning, inden det kommer ud i blodet. Endelig kan metoden øge brugervenligheden for patienter med synkebesvær, fx ældre eller børn, som uden problemer kan indtage den rigtige dosis medicin. Alligevel er der historisk set ikke udviklet ret mange præparater til systemisk optagelse via mundhulen. Det skyldes det relative lille absorptionsareal i kindslimhinden sammenlignet med mave-tarm-kanalen, samt at der endnu kun eksisterer et spinkelt erfaringsgrundlag for at vurdere nye stoffers egnethed til absorption gennem kindslimhinden. Derfor er der behov for pålidelige laboratoriemetoder, som kan forudsige optagelsen i blodet.

Ved udvikling af nye lægemidler testes stofferne først i laboratiemodeller som cellekulturer eller vævskulturer, dernæst

Grisene er fuldt bedøvet under forsøget. En gel med lægemiddelstoffet placeres på kindslimhinden.

FOTO: EMIL MENG-LUND



Forsøg i cellemodellen korreleres med forsøg i minigrise, hvis kindslimhinder minder om menneskers.

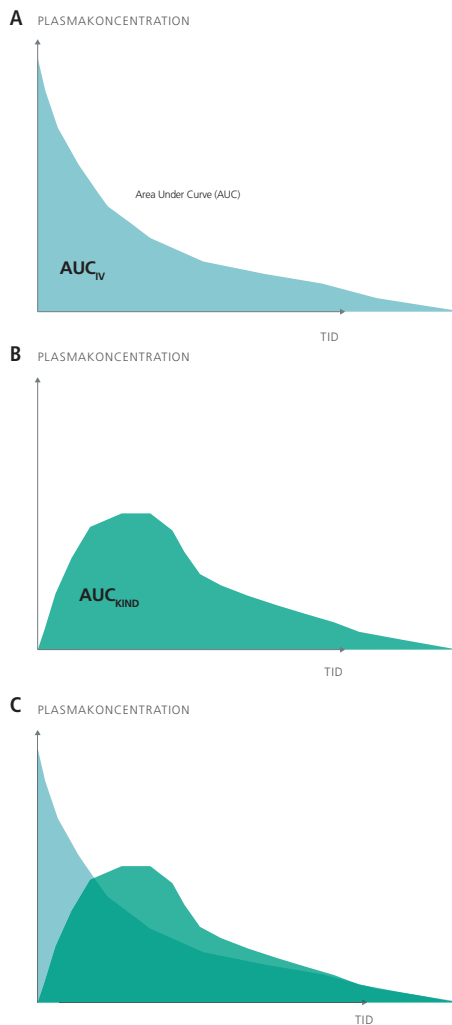
følger typisk dyreforsøg, som i højere grad efterligner lægemiddelstoffers optagelse og virkning i mennesker. Den forskningsbaserede lægemiddelindustri efterlyser konstant nye metoder til at teste optaget af nye lægemiddelstoffer i de indledende faser af forløbet. I dag koster det typisk 1-2 milliarder kr. at udvikle et nyt lægemiddel, og den farmaceutiske industri må ofte opgive et lovende lægemiddel, som aldrig når ud på markedet, fordi de tidlige undersøgelser ikke gav et fyldestgørende indblik i, hvordan lægemiddelstofferne opfører sig i patienterne. Derfor bruger industrien nu mange ressourcer på at udvikle laboratoriemodeller, som kan forudsige, hvordan lægemiddelstoffer bliver absorberet, fordelt, nedbrudt og til sidst udskilt fra kroppen. En af metoderne til at bestemme optagelsen af lægemiddelstoffer i blodet via mundhulen er cellekulturer, hvor epitelceller dyrkes på et filter, så cellelaget kommer til at ligne kindslimhinden.

FÆRREST MULIGE DYREFORSØG

Vi arbejder med en cellekulturmodel (TR146), som efterligner det humane epitel i kinden. De resultater, vi får fra cellekulturmodellen, sammenligner vi efterfølgende med resultater fra forsøg i minigrise for at se, om vi har en korrelation. Der er flere fordele forbundet med at have en prædiktiv cellekulturmodel, som korrelerer med dyreforsøg. Ud fra et dyreetisk synspunkt vil det altid være bedst, hvis en laboratoriemodel helt kan overflødiggøre dyreforsøgene, men dette er ikke altid muligt. Samtidig kræver lovgivningen, at visse forsøg skal udføres i dyr, inden de potentielle lægemidler testes i mennesker for første gang. Derfor vil laboratoriemodeller sandsynligvis aldrig helt erstatte dyreforsøg, men de vil kunne begrænse antallet.

Desuden er undersøgelser med cellekulturmodeller både billigere og hurtigere at udføre end forsøg i dyr, og derfor kan flere potentielle stoffer testes tidligt i udviklingen af et nyt lægemiddel. Det er en stor fordel, fordi mange farmaceutiske virksomheder arbejder ud fra et koncept, hvor man ved hjælp af computerteknologi screener millioner af mulige lægemiddelstoffer for derpå at udvælge de mest lovende kandidater til afprøvning i laboratoriet. Konceptet resulterer i et stort antal stoffer til videre undersøgelser, og derfor er det umuligt at afprøve

BEREGNING AF BIOTILGÆNGELIGHED



$$F_a = \left(\frac{AUC_{kind}}{AUC_{IV}} \right) \cdot \left(\frac{Dose_{IV}}{Dose_{kind}} \right)$$

dem alle sammen i forsøgsdyr, hvilket igen understøtter behovet for prædiktive laboratoriemodeller.

CELLEKULTURMODEL AF KINDSLIMHINDEN

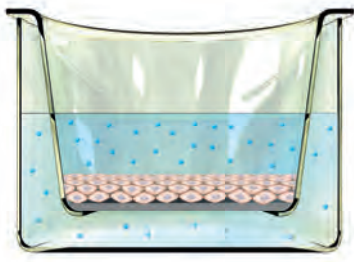
I vores cellekulturmodel af kindslimhinden undersøgte vi lægemiddelstoffet metoprolols evne til at trænge gennem cellelaget. Derefter udførte vi dyreforsøg for at se, om resultaterne korrelerede med optagelsen gennem kindslimhinden i minigrise. Metoprolol anvendes bl.a. til behandling af forhøjet blodtryk, og lægemiddelstoffet har været mange år på markedet i tabletform.

Stoffet er en amin og vil derfor være ioniseret ved pH under 9,5. Denne egenskab gør metoprolol velegnet som modelstof til at teste pH-afhængig permeabilitet i både cellekulturen og i grisene. Ved forsøgene undersøgte vi, om permeabiliteten i laboratoriemodellen korrelerer med biotil-

Biotilgængelighed er et mål for, hvor stor del af en dosis, der ender i blodet ved forskellige administrationsmetoder, fx tabletter til oral indtagelse eller geler og sprays til indgift af lægemiddelstoffer via kindslimhinden, næseslimhinden eller slimhinden i endetarmen.

Biotilgængeligheden (F_a) er defineret ved forholdet mellem den mængde stof af en given dosis, som optages i blodet set i forhold til den mængde stof, som blev indgivet direkte i blodbanen ved injektion. Biotilgængeligheden for lægemiddelstof efter optagelse gennem kindslimhinden beregnes ved hjælp af følgende ligning, hvor AUC er Areal Under Curve (plasmakurven).

ILLUSTRATION: MALENE HALD



Lægemiddelstoffet tilføres i donorkammeret, som repræsenterer mundhulen. Celletaget i bunden af donorkammeret efterligner kindslimhinden. Acceptorkammeret svarer til blodkredsløbet. Målingerne viser lægemiddelstoffets evne til at passere celletaget, hvilket gør det muligt at forudsige stoffernes evne til at passere kindslimhinden i dyr og mennesker.

ILLUSTRATION: HENNING DALHOFF

gængeligheden i dyreforsøget. Biotilgængeligheden er den del af dosis, som kommer ind i blodet via kindslimhinden.

Ifølge teorien vil den uladede form af metoprolol ($\text{pH} > 9,5$) bevæge sig hurtigere gennem epitelcellerne end den ladede form på grund af en større affinitet for de lipofile cellemembraner. Dette testes ved at opstille et forsøg med varierende pH-værdier i det område, hvor metoprolol ændrer ioniseringsgrad. Hypotesen er, at gennemtrængningshastigheden ville ændre sig på samme måde i cellemodellen og i dyreforsøget, som følge af ændringer i pH værdien.

Cellemodellen består af en flerlaget epitelcellebarriere på samme måde som kindslimhinden hos grise og mennesker. Forsøget blev udført ved at tilsætte en opløsning indeholdende metoprolol og en buffer således at en specifik pH værdi blev fastholdt i pH intervallet fra 7,4-9,5. Disse opløsninger blev tilsat i et donorkammer svarende til mundhulen. Prøver blev udtaget som funktion af tiden for at bestemme hastigheden, hvormed metoprolol passerer gennem celletaget fra donorkammeret til acceptorkammeret, som repræsenterer blodkredsløbet.

PERMEABILITET OG BIOTILGÆNGELIGHED

Dyreforsøget blev udført i minigrise ved dosering med geler, som indeholdt metoprolol samt en buffer til at fastholde en specifik pH værdi og dermed en specifik ladning for lægemiddelstoffet. Gelerne blev placeret på indersiden af kinden på minigrisen, som var i fuld bedøvelse under forsøget.

Over tid blev der udtaget blodprøver fra grisen. Herefter blev koncentrationen af lægemiddelstoffet i blodplasmaet bestemt som funktion af tiden, hvilket gør det

muligt at estimere biotilgængeligheden af lægemiddelstoffet. Derpå udførte vi til sammenligning et forsøg, hvor metoprolol blev injiceret direkte i blodbanen, hvorved hele dosis kommer ud i blodet svarende til en biotilgængelighed på 100 procent.

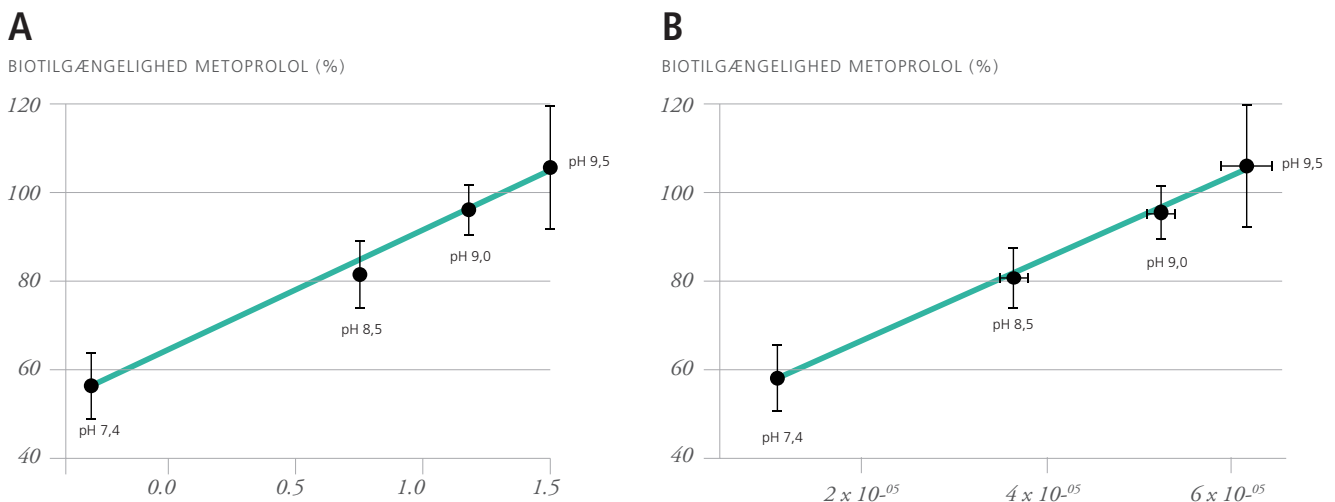
Resultaterne fra både cellekulturmodellen og dyreforsøget viste en klar pH-afhængig permeabilitet i overensstemmelse med teorien. I alt 4 pH værdier blev testet: 7,4, 8,5, 9,0 og 9,5. Biotilgængeligheden som funktion af permeabiliteten ved de respektive pH-værdier viser en korrelation, hvor stigende pH medfører øget biotilgængelighed.

Ved optagelse fra tabletter med metoprolol via mave-tarmkanalen ses en biotilgængelighed på omkring 3 procent i grisen. Ved indgift gennem kindslimhinden ligger biotilgængeligheden i området fra 60 til 100 procent. Den store forskel i biotilgængelighed mellem optaget fra mundhulen og optaget fra mave-tarmkanalen skyldes sandsynligvis, at stoffet metaboliseres kraftigt i leveren, hvilket undgås, når stoffet optages fra mundhulen. Samtidig viser den store forskel, at lægemidlet rent faktisk optages over kindslimhinden og ikke blot er blevet slugt og efterfølgende optaget via mave-tarmkanalen.

Cellemodellen, som efterligner de humane epitelceller i kinden, var således i stand til at forudsige optagelsen af metoprolol i dyremodellen. Nye studier vil vise, om dette også gælder for andre lægemiddelstoffer. Disse resultater er et godt udgangspunkt for videre udvikling af en laboratoriemodel til tidlig screening af lægemiddelstofkandidater for deres mulige optagelse fra mundhulen. •

Teorien forudsiger, at øgede pH-værdier fremmer optaget og biotilgængeligheden af lægemiddelstoffet metoprolol over kindslimhinden. Det blev bekræftet af forsøgene i cellekulturmodellen. Til venstre ses den teoretiske korrelation og til højre ses de eksperimentelle resultater.

ILLUSTRATION: MALENE HALD



Massespektrometri viser vejen til forbedrede proteinlægemidler

EN TREDJEDEL AF ALLE LÆGEMIDLER I KLINISKE FORSØG ER PROTEINER. FOR AT OPNÅ DEN ØNSKEDE EFFEKT OG UNDGÅ ALVORLIGE BIVIRKNINGER ER DET AFGØRENDE, AT PROTEINET BEVARER SIN RUMLIGE FACON UNDER PRODUKTION OG OPBEVARING. EN UNIK METODE BASERET PÅ MASSESPEKTROMETRI KAN SIKRE DETTE OG ENDDA BRUGES TIL AT OPTIMERE PROTEINETS TERAPEUTISKE VIRKNING.

Proteiner er kroppens molekylære maskiner, som udøver utallige essentielle funktioner i organismen. Et protein er opbygget af aminosyrer, der sættes sammen som perler på en snor inde i cellen, hvorefter kæden foldes op i en unik rumlig struktur. Denne struktur er afgørende for, at proteinet kan udføre sit arbejde. Størstedelen af nutidens lægemidler enten påvirker eller er baseret på et eller flere af kroppens mere end 50.000 forskellige proteiner.

I senere år har genteknologi gjort det muligt at fremstille proteiner kunstigt og udnytte deres unikke egenskaber til terapeutiske formål. Medicinsk brug af proteiner er inde i en rivende udvikling; ikke mindst i Danmark, hvor flere bioteknologiske og farmaceutiske virksomheder baserer deres forretning på rekombinant fremstil-

lede proteiner – det klassiske eksempel er insulin fra Novo Nordisk A/S. På verdensplan udgør proteiner en tredjedel af alle nye lægemidler, som afprøves i kliniske forsøg, og andelen stiger. Disse lovende biolægemidler er et centralt forskningsområde på Institut for Farmaci.

KÆMPE BIOMOLEKYLER

Proteinlægemidler udspringer af naturens eget design, og det er stor en fordel, fordi medicinen i lighed med kroppens egne proteiner er i stand til at udøve meget selektive virkninger, hvorved bivirkningerne bliver minimale. Men samtidig er det en kæmpe-mæssig udfordring at udvikle og fremstille proteinlægemidler. Proteiner er meget store molekyler med en langt mere kompleks tredimensionel struktur end de små syntetiske molekyler, som anvendes i klassiske

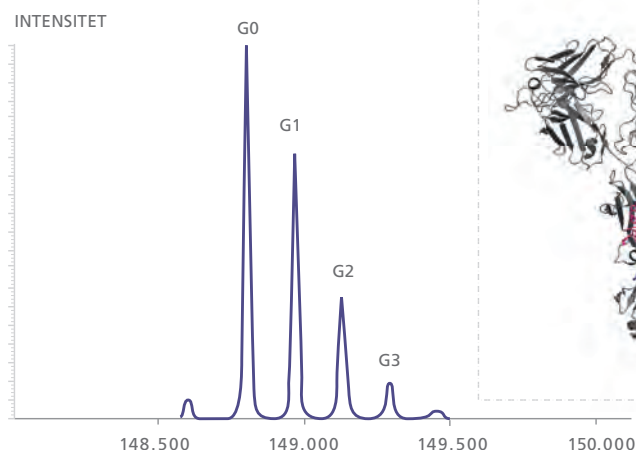
FORFATTERE

Hongjian Song er specialestuderende på Institut for Farmaci.

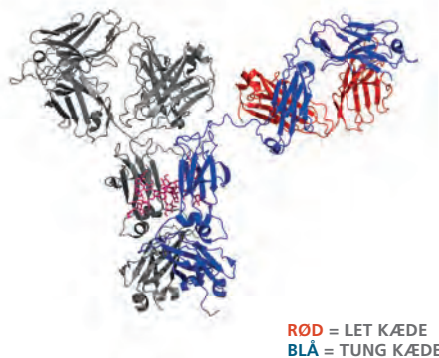
Ph.d. Kasper Dyrberg Rand er lektor på Institut for Farmaci.

MÅLING PÅ FLYVENDE IONISEREDE PROTEINER

MASSE SPEKTRUM AF ET TERAPEUTISK ANTISTOF
(farmaceutisk navn: Rituximab)



STRUKTUR AF RITUXIMAB ANTISTOFFET
(1322 AMINOSYRER I ALT)



RØD = LET KÆDE
BLÅ = TUNG KÆDE

Her ses et massespektrum af proteinlægemidlet Rituximab til behandling af en type lymfekræft. Rituximab er baseret på et af kroppens egne antistoffer og er opbygget af to næsten ens underenheder, som hver består af en lang (blå) og en kort (rød) aminosyrekæde. Antistoffet er sammensat af 1322 aminosyrer og har en molekylvægt på 149.250 Da. Et sådant proteinlægemiddel er en gigant i forhold til små molekylære lægemidler, der ofte vejer under 2000 Da. Signalet »G0« i massespektret svarer til massen af antistoffet uden glykosylering, mens G1, G2, G3 svarer til molekyler af Rituximab med påhæftning af en, to og tre galaktosemolekyler. Ud fra analysen kan vi se, om molekylet har den forventede masse – dvs. korrekte sammensætning – og blotlægge, om antistoffet eksisterer i forskellige former med forskellige biologisk vigtige modifikationer.

ILLUSTRATION: KASPER DYRBERG RAND

lægemidler. Og når det gælder proteiner, er struktur lig med funktion. Derfor er det altafgørende, at et terapeutisk protein har præcis den rigtige rumlige facon. Verden over forskes der i at udvikle nye analytiske metoder, som hurtigt og præcist kan karakterisere proteinlægemidlers struktur, og i den sammenhæng er massespektrometri blevet et uundværligt værktøj.

Massespektrometri bestemmer molekylers masse uhyre præcist, men målingen kræver, at molekylet bringes på gasform og ioniseres. For små molekyler kan dette opnås ved at opvarme og fordampe molekylerne, men opvarmning får proteiner til at gå i stykker. Problemet blev løst i 1988, da John B. Fenn samt Michael Karas og Franz Hillenkamp introducerede to nye måder til ionisering af proteiner: Elektrospray ionisering og Matrix-assisteret-laser-desorption-ionisering. Da Fenn senere modtog Nobelprisen i kemi for sit arbejde med elektrospray ionisering, sammenlignede han teknikken med at give molekylære elefanter vinger og få dem til at flyve. Udviklingen af de to ioniseringsmetoder har revolutioneret den moderne bioteknologiske og biofarmaceutiske forskning.

NATURLIGE MODIFIKATIONER AF PROTEINER

I menneskets celler bliver proteiner typisk modificeret efter selve proteinsyntesen. Det sker ved påhæftning af forskellige kemiske grupper, som binder sig til specifikke amino-

syrer i proteinet – fx ved glykosylering, acetylering, methylering og fosforylering. Disse biologiske modifikationer er oftest vigtige for proteinets funktion, dets intracellulære beliggenhed og kommunikationen med andre proteiner i cellen.

Et proteinlægemiddel skal oftest modificeres på samme måde for at udøve sin terapeutiske funktion. Fx gennemgår koagulationfaktoren faktor VIIa, som bruges til behandling af bløderpatienter, flere modifikationer efter proteinsyntesen i gensplejede hamsterceller. Det samme er tilfældet for proteiner, der fungerer som antistoffer. Rekombinante antistoffer udgør en hastigt voksende andel af de nye biolægemidler, som er under udvikling. Et eksempel, som vi arbejder med i laboratoriet, er Rituximab til behandling af en form for lymfekræft. Dette store protein modificeres naturligt med komplekse glykanstrukturer, og graden af glykosylering er afgørende for funktionen som lægemiddel i kroppen.

RISIKO FOR UNATURLIGE MODIFIKATIONER

Ved produktion og opbevaring af proteinlægemidler er der risiko for, at proteinerne danner nedbrydningsprodukter, som kan ændre de eksisterende modifikationer eller forårsage nye unaturlige modifikationer som følge af fx oxidation eller hydrolyse. Sådanne ændringer i proteinets sammensætning og struktur kan have alvorlige konsekvenser for biolægemidlets virkning og bivirkninger. Derfor er det essentielt at råde

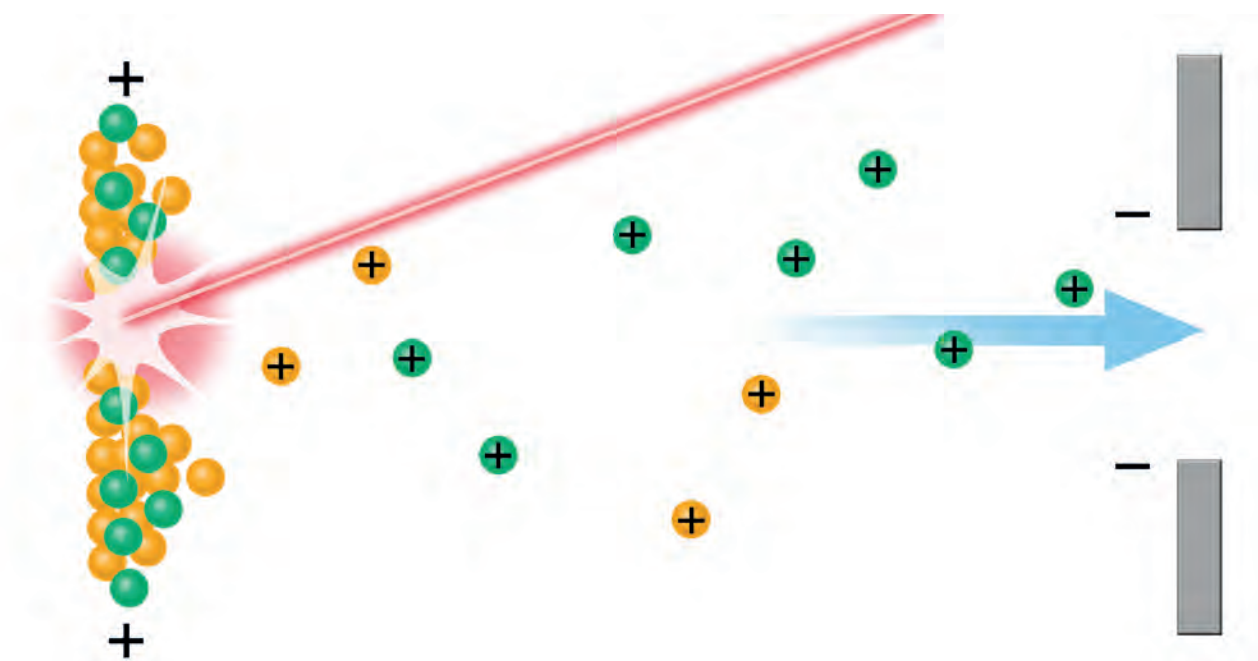
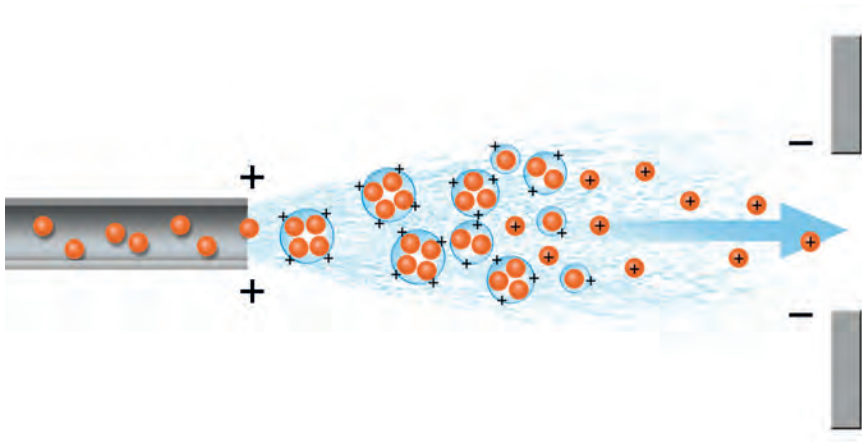


ILLUSTRATION: KASPER DYRBERG RAND



To metoder bruges at ionisere proteiner, hvorefter massespektrometret kan bestemme deres masse.

Denne side: Elektrospray Ionisering (ESI): En vandig opløsning med proteiner ledes ud gennem en meget tynd kapillær. Som følge af en stor spænding mellem spidsen af kapillæren og en modelektrode forlader væsken kapillæren i en spray af mikroskopiske dråber med høj ladning. Fordampning af vand fra mikrodråberne medfører frigivelse af en gas af ioniserede proteiner.

Modsatte side: Matrix-assisteret-laser-desorption-ionisering (MALDI): Her krystalliseres proteinet under tilstedeværelse af lavmolekylære stoffer, der er specielt egnede til at absorbere energi fra laserlys. Når den krystalliserede prøve beskydes med en laser, omdannes lysets energi til vibrationsenergi, hvilket resulterer i eksplosioner på overfladen af krystallen. Herved ioniseres proteinmolekylerne og bringes på gasform.

over analytiske redskaber, som kan identificere og lokalisere uønskede modifikationer. Massespektrometri er velegnet til formålet. Såvel naturlige som unaturlige modifikationer ændrer nemlig proteinets masse, hvilket kan måles med stor nøjagtighed.

Udover at måle massen af det intakte protein kan man også bestemme aminosyrernes rækkefølge og påvise, hvilke aminosyrer eventuelle modifikationer sidder på. Det opnås ved hjælp af en analysemetode, som kaldes peptidkortlægning. Her bliver proteinet klippet over i små stykker – peptider – ved hjælp af et enzym. Derefter adskilles peptiderne fra hinanden ved højtryksvæskrokromatografi (HPLC), hvorefter hvert enkelt peptid analyseres med massespektrometri. Først måles massen af hele peptidet, og derefter kløves det i gasfasen til endnu mindre stykker, så der opstår fragmenter, der svarer til tab af en enkelt eller nogle få aminosyrer. Ved at måle massen af de dannede fragmenter kan man nu bestemme rækkefølgen af aminosyrerne i peptidet og afklare, hvilke aminosyrer modifikationerne sidder på. Både massebestemmelsen af det intakte protein og peptidkortlægningsanalyser er vigtige redskaber til at kvalitetssikre lægemidlet under samtlige faser i udviklingen af et terapeutisk protein.

STRUKTUR ER LIG MED FUNKTION

Den fortløbende kortlægning af et proteinlægemiddels aminosyresekvens og modifikationer er imidlertid ikke nok for at sikre, at lægemidlet fungerer, som det skal i kroppen. Funktionen af et protein er i sidste ende dikteret af aminosyrekædens foldning til en specifik tredimensionel struktur. Et proteins rumlige struktur er imidlertid ofte skrøbelig og kan let påvirkes af ændringer i de fysiske og kemiske omgivelser. Det kan resultere i, at lægemidlet mister sin virkning

i kroppen. I værste fald kan ændringer i proteinets facon medføre alvorlig fare for patienten, fordi immunforsvaret går til angreb på det misdannede protein. Derfor er der brug for en analytisk metode, som løbende kan karakterisere proteinets rumlige struktur under udviklingen af lægemidlet. Samtidig kan en dybere forståelse for det tætte samspil mellem proteinets foldning og dets funktion udnyttes til at forbedre et lægemiddels terapeutiske virkning.

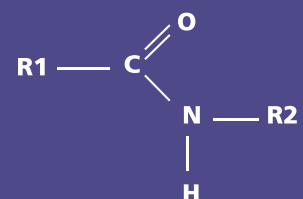
NY TEKNOLOGI VISER RURLIGE ÆNDRINGER

I vores laboratorium har vi udviklet en unik ekspertise med en ny teknologi, som med høj følsomhed kan detektere og kortlægge selv små ændringer i proteiners rumlige struktur. Her bruger vi massespektrometri til at måle hastigheden, hvormed hydrogenatomer i et protein udveksles med tungt vand (D_2O). Deuterium har en ekstra neutron i atomkernen og er derfor tungere end et almindeligt hydrogenatom. Derfor kan udvekslingen påvises med massespektrometri.

Der sidder et hydrogenatom på hver amidgruppe langs proteinets ryggrad, og amidhydrogenet udveksles kontinuert med deuterium, hvis proteinet befinder sig i tungt vand. Hastigheden af denne reaktion fortæller en masse om den rumlige struktur, som amidhydrogenet befinder sig i. Amidhydrogener i fleksible og åbne områder af proteinet udveksles hurtigt, hvorimod amidhydrogener, som er begravet i tætpakkede regioner af proteinet eller indgår i interne hydrogenbindinger, udveksles langsomt. Udvekslingshastigheden giver derfor direkte information om det lokale strukturelle og dynamiske miljø, hvori hvert enkelt amidhydrogen er lokaliseret. Målingen af udvekslingen udføres ved at udtage prøver

HVAD ER EN AMIDGRUPPE?

En amidgruppe er en funktionel gruppe i organiske forbindelser, som består af en carbonylgruppe, der er forbundet til et nitrogen atom. I proteiner danner amidgruppen »ryggraden« af proteinets struktur, fordi den via såkaldte peptidbindinger kæder de enkelte aminosyrer sammen som perler på en snor.



ved givne tidsintervaller. På den måde kan vi påvise lokale ændringer i hydrogenudvekslingen som følge af strukturelle modifikationer i proteinet. På samme måde kan vi vise strukturelle ændringer som følge af vekselvirkninger med andre proteiner eller med lægemidler.

Teknologien kaldes for Hydrogen-Deuterium-udveksling-massespektrometri (HDX-MS) og vi har anvendt metoden på en række terapeutisk interessante proteiner.

FOKUS PÅ BLØDERMEDICIN

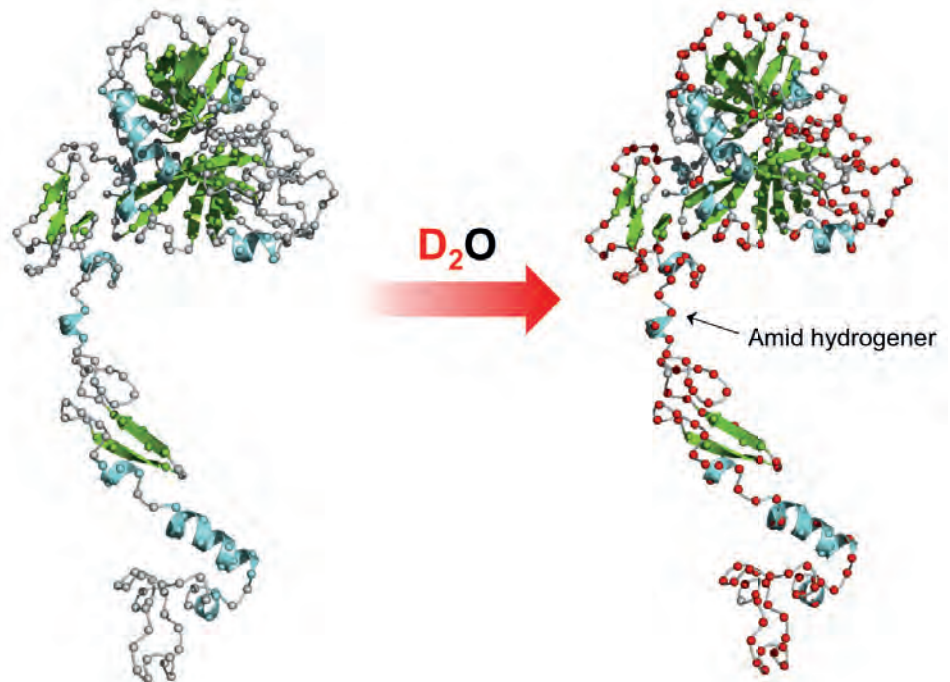
Et eksempel er lægemidlet rekombinant faktor VIIa, som bruges til at behandle en gruppe blødere, som danner antistoffer imod den almindelige blødermedicin, faktor VIII og FIX, som derfor ikke kan bruges. Ved blødninger aktiveres en receptor kaldet vævsfaktor faktor VIIa, hvilket starter koagulationskaskaden hos bløderen. Måden,

hvorpå vævsfaktor aktiverer proteinet, er derfor helt afgørende for, om blodet kan størkne. Vi har anvendt HDX-MS for at forstå de molekylære detaljer omkring aktiveringen af proteinlægemidlet.

Målingerne viste, at der sker en dramatisk strukturel ændring i Faktor VIIa ved aktiveringen, og vi har kortlagt i detaljer, hvilke områder af proteinets rumlige struktur, som påvirkes og hvordan. Den nye viden kan bane vej for at inducere strukturelle ændringer i faktor VIIa ved kemisk modifikation med henblik på at udvikle et mere aktivt proteinlægemiddel med en forbedret terapeutisk virkning. •

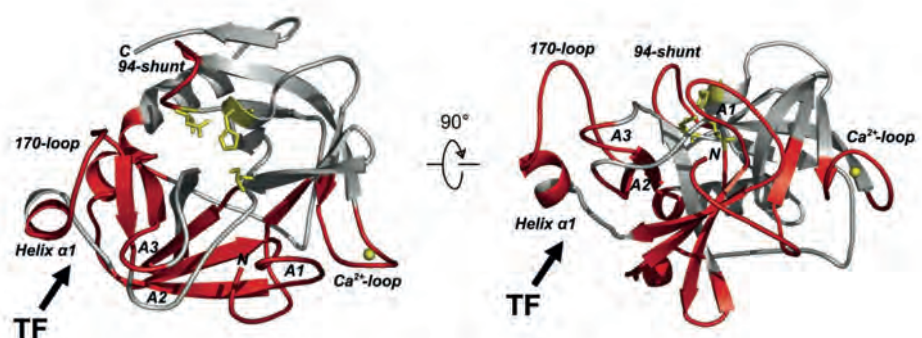
Illustrationen viser, hvordan amidgrupperne i ryggen af et protein udveksler hydrogen (grå kugler) med deuterium (røde kugler), når proteinet opløses i tungt vand (D_2O). Denne udveksling afslører en rigdom af information om proteinets rumlige struktur. Amidgrupper, som sidder på aminosyrer i åbne områder af proteinet, optager hurtigt deuterium fra det tunge vand. Amidgrupper, som sidder på aminosyrer i tætpakkede områder af proteinet, udskifter kun langsomt hydrogen med deuterium eller slet ikke.

ILLUSTRATION: KASPER DYRBERG RAND



Sårheling begynder ved, at faktor VIIa i blodet binder sig til receptoren vævsfaktor, der eksponeres ved vævsskade. Vævsfaktor omdanner faktor VII til sin aktive form faktor VIIa, som starter koagulationskaskaden. Rekombinant faktor VIIa bruges til behandling af blødere. Målinger på proteinlægemidlet alene og efter interaktionen med vævsfaktor viser, at proteinets rumlige struktur ændrer sig dramatisk, når det aktiveres som følge af bindingen til vævsfaktor. Områder af FVIIa der udviser ændret hydrogen/deuterium udveksling som følge af vekselvirkningen med vævsfaktor er vist i rød (se den skematiske afbildning af FVIIa til højre).

ILLUSTRATION: KASPER DYRBERG RAND



Snegleprotein øger forståelsen af vigtige receptorer i hjernen

*Lymnaea stag-
nalis – alias
stor moesesnegl.*



VI ER MANGE, DER KENDER BØRNESANGEN »MARIEHØNEN EVIGGLAD«, SOM MØDTE SØREN SNEGL OG BLEV REDDET FRA REGN OG TORDENVEJR. VI BLEV OGSÅ HJULPET AF EN SNEGL I VORES UDFORSKNING AF EN VIGTIG GRUPPE AF RECEPTORER I HJERNEN OG NERVESYSTEMET – IKKE AF SØREN, MEN AF STOR MOSESNEGL, SOM DANNER ET PROTEIN, DER LIGNER RECEPTORERNE. VI BLEV GEVALDIGT OVERRASKEDE OVER RESULTATERNE.

Den lynhurtige kommunikation mellem nervecellerne i hjernen og musklerne beror på tilstedeværelsen af receptorer, som er proteiner i cellemembranerne, der kan binde signalstoffer og derved udløse et signal i cellerne. En vigtig klasse af receptorer er ionkanaler, som tillader transport af ioner ind i nervecellen, når receptoren aktiveres af et stimulerende signalstof. Til denne familie hører de nikotine acetylcholinreceptorer, der aktiveres af signalstoffet acetylcholin og – som navnet fortæller – af nikotin. Disse receptorer er blandt de mest velstuderede ionkanaler, og de er meget udbredte både i det perifere nervesystem, hvor de er ansvarlige for kontrollen af musklerne, og i centralnervesystemet, hvor de medvirker i funktioner som opmærksomhed, hukommelse og smertefølelse.

Udover at være mål for lægemidler til rygeafvænnelse udgør de nikotine acetylcholinreceptorer lovende mål for behandling af en bred vifte af neurodegenerative og psyki-

atriske sygdomme som Alzheimers sygdom, Parkinsons sygdom, skizofreni og depression. Derfor arbejder forskere verden over med at opklare receptoreernes tredimensionelle struktur, hvilket er en forudsætning for at forstå, hvordan de fungerer og kan påvirkes med medicin. Ved design af nye lægemiddelstoffer er det nemlig nødvendigt med en meget detaljeret viden om, hvordan stofferne binder til receptoren, fordi lægemiddelstoffet skal passe ind i receptorproteinet som en hånd i en handske og påvirke receptoren på præcis den ønskede måde. Desværre er det vanskeligt at opklare den detaljerede tredimensionelle struktur af receptorer, der er placeret i cellemembraner. Ganske vist kan proteinstrukturer bestemmes på atomart plan med intens røntgenstråling, men det forudsætter, at man kan fremstille en krystal af proteinet, som indeholder flere millioner proteinmolekyler. I praksis er det svært eller umuligt at lave brugbare krystaller af membranproteiner, fordi deres rumlige facon ændrer sig, når de

FORFATTERE

Azadeh Shahsavari er ph.d.-studerende på Institut for Lægemediddesign og Farmakologi.

Elsebet Ø. Nielsen er manager i biologi på NeuroSearch A/S.

Jesper L. Kristensen er lektor på Institut for Lægemediddesign og Farmakologi.

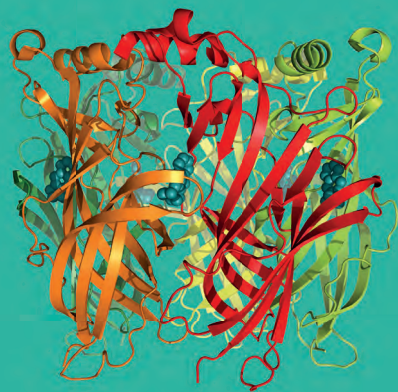
Michael Gajhede er professor på Institut for Lægemediddesign og Farmakologi.

Thomas Balle er senior lecturer på Faculty of Pharmacy ved University of Sydney i Australien.

Jette S. Kastrup er professor på Institut for Lægemediddesign og Farmakologi.

Til venstre: Strukturen af snegleproteinet med alkaloidet DH β E bundet ses her fra oven. Alkaloidet er vist som røde kugler.

Til højre: Strukturen af snegleproteinet med lægemiddelstoffet varenicline bundet ses her fra siden. Varenicline bruges som hjælp til rygstop og er vist i en grøn kuglemodel.



TAG PÅ EKSPEDITION I PROTEINERNES VERDEN

For at kunne publicere en tredimensionel struktur af et protein skal det deponeres i databasen »Protein Data Bank«, som er offentligt tilgængelig på internettet (www.pdb.org).

Hvis du har lyst til at se nærmere på strukturen af snegleproteinet AChBP, når det binder alkaloidet DH β E, skal du blot angive pdb-koden »4ALX« i søgefeltet på hjemmesiden. Her vil du også kunne se, hvordan nikotin binder til snegleproteinet (pdb-kode: 1UW6), samt hvordan ryggestop-lægemidlet varenicline binder til proteinet (pdb-kode: 4AFT).

fjernes fra den fedtholdige cellemembran. Endnu er det ikke lykkedes at fremstille krystaller af nikotine acetylcholinreceptorer. Men netop her fik vi hjælp fra mosesneglen *Lymnaea stagnalis*.

SNEGLEPROTEINET ER ET GODT MODELSYSTEM

For omkring ti år siden opdagede andre forskere, at mosesneglen *Lymnaea stagnalis* danner et protein kaldet acetylcholinbindende protein (AChBP). Selv om snegleproteinet er vandopløseligt og ikke fungerer som ionkanal i cellemembranen, har det en

rumlig form og størrelse, som ligger meget tæt på den extracellulære del af de nikotine acetylcholinreceptorer. Det er netop denne del af receptoren, som binder signalstoffet acetylcholin. Desuden har en række andre stoffer vist sig at binde med samme relative affinitet til snegleproteinet som til nikotine acetylcholinreceptorer. Derfor har vi kunnet anvende proteinet fra mosesneglen som et modelprotein for receptorerne, så vi nu har et værktøj til strukturelle studier af bindingen af interessante stoffer til nikotine acetylcholinreceptorer.

En gruppe af disse stoffer kaldes erythrina alkaloider, og de udgør en familie af naturstoffer, som primært isoleres fra træer og buske tilhørende slægten Erythrina. Et eksempel er stoffet dihydro- β -erythroidine (DH β E), som er en potent antagonist af nikotine acetylcholinreceptorer. Antagonister er stoffer, som blokerer en receptors funktion, ved at forhindre aktivering af receptoren og dermed åbning af ionkanalen. Stoffer, som aktiverer receptoren ved åbning af ionkanalen, kaldes for agonister. Ved aktivering tillades transport af ioner gennem kanalen og ind i cellen.

DH β E har i årenes løb været anvendt som et farmakologisk værktøj til at opnå en bedre forståelse af receptorernes involvering i fysiologiske processer. For at opnå yderligere indsigt i alkaloidets bindingsmåde og blokerende mekanisme, besluttede vi at bestemme røntgenstrukturen af stoffet bundet til snegleproteinet. Strukturen viste sig at afsløre egenskaber, som er unikke for denne antagonist.

EN OVERRASKENDE OPDAGELSE

Snegleproteinet indeholder i lighed med nikotine acetylcholinreceptorer et såkaldt

NIKOTINE ACETYLCHOLINRECEPTORER

Der findes mange varianter af nikotine acetylcholinreceptorer, men de er alle opbygget af fem underenheder arrangeret omkring en central ionkanal.

Enkelte typer af nikotine acetylcholinreceptorer består af fem identiske underenheder, men de fleste af receptorerne er dannet ved kombinationer af forskellige underenheder. Der findes i alt 17 forskellige underenheder i humane nikotine acetylcholinreceptorer, og kombinationsmulighederne medfører, at der er mange forskellige undertyper af receptorerne.

Alle undertyperne aktiveres af acetylcholin, men de reagerer forskelligt på kemisk og strukturelt beslægtede stoffer. Dette giver mulighed for stor diversitet i signalprocesserne i forskellige hjerneregioner.

Nikotine acetylcholin receptorer er ionkanaler, som penetrerer cellemembranen. Her ses en tredimensionel struktur af en af receptorerne, som er bestemt ved hjælp af elektronmikroskopi. De fem underenheder, som receptoren er opbygget af, er vist i hver deres farve. Den røde skive markerer ydersiden af cellemembranen, mens den blå skive markerer indersiden af membranen.

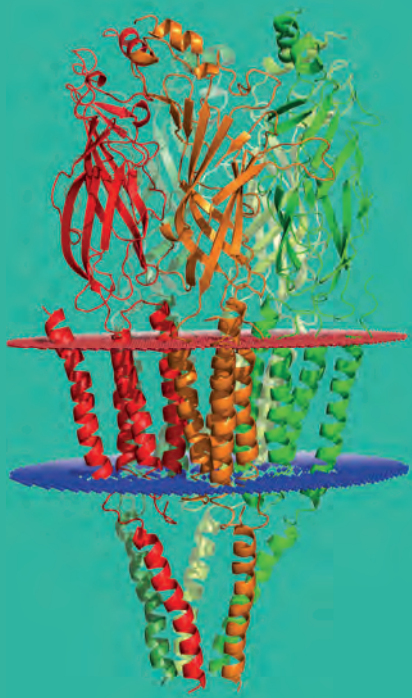


ILLUSTRATION: JETTE KASTRUP

C-loop, der er vigtig for binding af acetylcholin og beslægtede stoffer. Loopet i snegleproteinet forskyder sig i varierende grad ved binding af aktiverende og blokerende stoffer. Det er således blevet foreslået, at et lukket C-loop er den foretrukne form i forbindelse med aktivering af receptoren via binding af en agonist, hvorimod et åbent C-loop afspejler en ikke-aktiv eller blokeret form af receptoren ved binding af en antagonist.

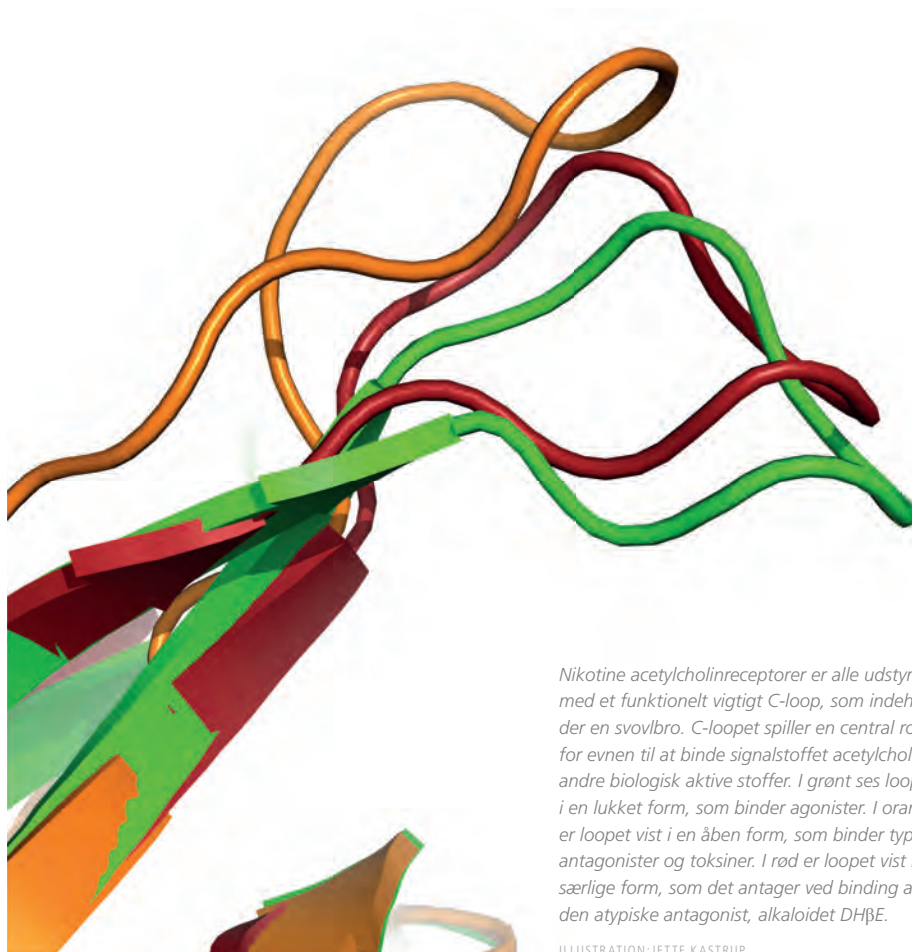
Strukturen af alkaloidet DH β E bundet til snegleproteinet lærte os følgende: DH β E introducerer et lukket C-loop, som det ses for agonister, og det bindes til receptoren ved hjælp af hydrogenbindinger på samme måde som agonister. Men samtidig sker der noget helt uventet. C-loopet undergår nemlig en konformationsændring vinkelret på de tidligere viste bevægelser, hvilket medfører, at alkaloidet ændrer formen af receptoren på en anden måde end agonister. Derved blokerer alkaloidet receptorens funktion.

Det lader således til, at DH β E forhindrer aktivering af receptoren via en mekanisme, der er forskellig fra den normale virkningsmekanisme for antagonist. Sådan kan

man blive overrasket – men der er jo det, der gør forskning så spændende!

KOMMER LETTERE IND I HJERNEN

Fremadrettet kan kendskabet til alkaloidets bindingsmåde bruges til rationelt design af nye lægemiddelstoffer med forbedret virkning på sygdomme i hjernen, hvor der er et farmaceutisk behov for at blokere de nikotine acetylcholinreceptorer på nervecellerne. Det skyldes, at DH β E i kraft af sin mindre molekylvægt og mere optimale fysisk-kemiske egenskaber har langt bedre mulighed for at trænge gennem blod-hjernebarrieren end traditionelle antagonist, som typisk er mange gange større end alkaloidet. •



Nikotine acetylcholinreceptorer er alle udstyret med et funktionelt vigtigt C-loop, som indeholder en svovlbro. C-loopet spiller en central rolle for evnen til at binde signalstoffet acetylcholin og andre biologisk aktive stoffer. I grønt ses loopet i en lukket form, som binder agonister. I orange er loopet vist i en åben form, som binder typiske antagonist og toksiner. I rød er loopet vist i den særlige form, som det antager ved binding af den atypiske antagonist, alkaloidet DH β E.

ILLUSTRATION: JETTE KASTRUP

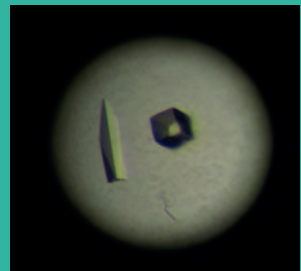
VEJEN TIL EN TRE-DIMENSIONEL ATOMAR STRUKTUR

I løbet af de seneste år har vi etableret en pipeline til ekspresion, oprensning og krystallisering af proteinet fra stor mosesnegl. Vi har krystalliseret det rene protein sammen med alkaloidet DH β E for at bestemme den rumlige struktur, som snegleproteinet antager, når det binder alkaloidet.

Værktøjet er intens røntgenstråling, som fremstilles af acceleratore, der kaldes synkrotroner. Forsøgene blev udført på MAX-Lab i Lund. Røntgenstrålingen er så kortbølget, at det er muligt at »se« de enkelte atomer og bestemme deres art og placering i store proteinmolekyler, som typisk indeholder flere tusinde atomer.

Når røntgenstrålingen rammer proteinkrystallen, spredes strålen i alle retninger af de elektronskyer, som omgiver atomkernerne. Herved dannes der et spredningsmønster, som indeholder oplysninger om atomernes art og indbyrdes placering. Ved hjælp af computerberegninger med udgangspunkt i spredningsmønsteret er det muligt at bestemme, hvor de forskellige atomer er placeret i forhold til hinanden i proteinmolekylet.

På den måde har vi opklaret den detaljerede tredimensionelle struktur af snegleproteinet, når det binder DH β E.



Øverst: Proteinkrystaller.

Venstre: Et spredningsmønster.

Kvalitetssikring af målrettede nanopartikler til kemoterapi

METALHOLDIGE LÆGEMIDLER TIL BEHANDLING AF KRÆFT KAN INDGIVES I FEDTHOLDIGE NANOPARTIKLER – LIPOSOMER – SOM MÅLRETTET MEDICINEN MOD SVULSTERNE, SÅ KROPPENS RASKE CELLER SKADES MINDST MULIGT. DET ER VIGTIGT, AT LIPOSOMERNE ER STABILE, SÅ DE IKKE FRIGIVER CELLEGIFTEN UNDER OPBEVARING ELLER TRANSPORT. NYE ANALYSEMETODER KAN GIVE SIKKERHED FOR KVALITETEN.

FORFATTERE

Cand.scient. Tam Nguyen er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci.

Ph.d. Jesper Østergaard er lektor på Institut for Farmaci.

Ph.d. Stefan Stürup er lektor på Institut for Farmaci.

Ph.d. Bente Gammelgaard er professor på Institut for Farmaci.

LIPOSOMER ER NANOPARTIKLER

Liposomer er små kugler af fedtstoffer, hvor et centralt hulrum er omsluttet af en membran, der minder om en cellemembran. Membranen er opbygget af et dobbeltlag af fedtstoffer – kaldet fosfolipider – som består af en vandopløselig fosfatdel og en fedtopløselig lipiddel.

Når fosfolipider anbringes i en vandig opløsning, danner de spontant en kugleformet membran, som består af to lag. I dobbeltlaget gemmer fosfolipiderne deres fedtopløselige dele inde midt i membranen, mens en vandopløselig del og en fedtopløselig lipiddel danner membranens yderside og inderside. Når liposomer benyttes til transport af cisplatin, er lægemiddelstoffet opløst inde i det vandfyldte hulrum. Liposomernes egenskaber kan skræddersys til et givet formål ved at variere arten af fosfolipiderne eller ved at modificere dem kemisk.

Liposomers størrelse kan variere fra 25 nm til 10 µm i diameter, og den typiske størrelse for liposomer til medicinsk brug er 100 nm, hvilket ligger indenfor definitionen på nanopartikler. Betegnelsen bruges om partikler med diameter på mellem 1 til 100 nanometer.

En gruppe kemoterapeutiske lægemiddelstoffer til behandling af kræft indeholder metaller. Det klassiske eksempel er cisplatin. Da stoffet blev opdaget og godkendt af myndighederne i 1970'erne, blev det muligt at behandle flere livstruende kræftformer med gode resultater; fx steg helbredelsesraten for testikelkræft markant. Cisplatin virker ved at binde sig til DNA i kræftcellen, hvorved cellen dør.

Cisplatin er kemisk opbygget omkring metallet platin. De gode resultater førte til, at forskningen i metalbaserede lægemiddelstoffer med andre egenskaber blev intensiveret med henblik på at fremstille stoffer med færre bivirkninger. I dag er der to nyere platinbaserede lægemiddelstoffer på markedet, carboplatin og oxaliplatin, og flere andre lægemiddelstoffer baseret på platin og ruthenium er i klinisk afprøvning. På trods af, at der er fremstillet og testet tusindvis af nye kemiske metalforbindelser, har succesraten dog været forholdsvis lav. Derfor spiller cisplatin og andre platinforbindelser fortsat en central rolle indenfor kræftbehandling.

LIPOSOMER AFLEVERER MEDICINEN I SVULSTEN

Al kemoterapi er et tveægget sværd, fordi de giftige lægemiddelstoffer, som skal eliminere kræftcellerne, også skader raske celler i kroppen. Derfor er der fokus på at udvikle nye afgiftssystemer til lægemiddelstoffer – drug delivery systemer – hvor cellegiftene målrettes direkte mod kræftsvulsterne og i mindre grad skader raske celler undervejs. Det giver mulighed for at øge dosis og slå alle kræftcellerne ihjel.

En af de mest lovende metoder er at pakke cisplatin ind i små hule fedtkugler kaldet liposomer. Her udnytter man, at kræftceller i modsætning til raske celler vokser så hurtigt,

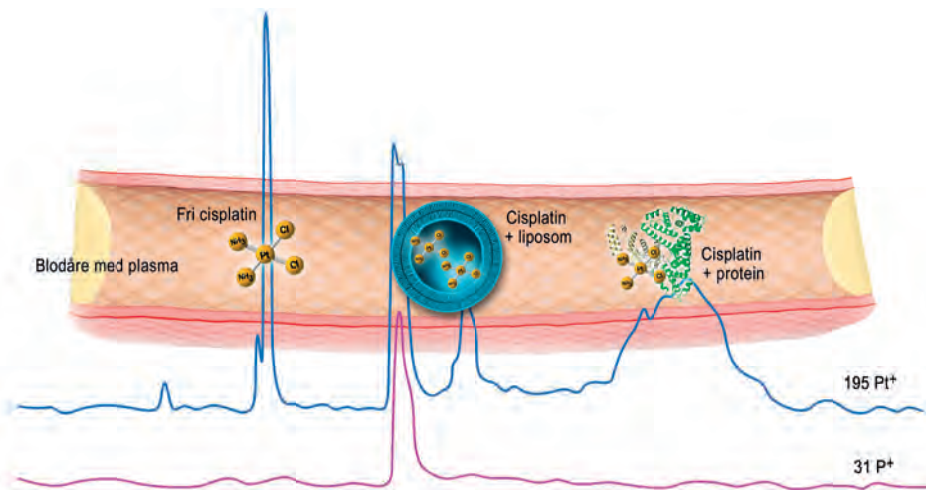
at de blodkar, som forsyner svulsten med blod, er utætte. Derfor kan nanopartiklerne lække ud af blodbanen og komme ind i vævet omkring kræftcellerne, hvor der ofte er enzymer til stede, der kan åbne liposomerne. Så frigiver liposomerne deres ladning af cisplatin, som trænger ind i kræftcellerne. Med andre ord: Langt det meste af cellegiften ender i svulsten, hvorved skadevirkningerne på kroppens raske væv minimeres.

STABILITET PÅ HYLDEN

Cisplatin – og mange andre kemoterapeutiske stoffer – indgives ved injektion, og lægemidler baseret på liposomer er ligeledes injektionsvæsker. Det er vigtigt, at lægemidlet er stabilt, så liposomerne ikke frigiver cisplatin under opbevaring og transport, og derfor er det nødvendigt at udvikle metoder til undersøge, om cisplatin frigives fra liposomerne.

Ved målingerne skal man kunne skelne mellem den mængde cisplatin, som findes inde i liposomerne, og den mængde, der eventuelt er frigjort, enten fordi liposomerne er ødelagt, eller fordi cisplatin har fundet vej ud gennem liposomernes membraner. Vi anvender størrelseskromatografi til at adskille liposomerne, som er forholdsvis store partikler, fra de meget mindre frie cisplatinmolekyler.

Udløbet fra den størrelseskromatografiske kolonne kobles til et massespektrometer, som kan detektere grundstoffer på baggrund af deres masse-ladningsforhold (m/z). Ved samtidigt at måle på platin med masse-ladningsforholdet 195 og fosfor med masse-ladningsforholdet 31 kan man se, hvilke fraktioner fra kolonnen, der kun indeholder platin svarende til frigivet cisplatin, og hvilke fraktioner, der indeholder både fosfor og platin svarende til liposomer med cisplatin i



Analyse af cisplatin i plasma. Analysemetoden giver mulighed for at skelne mellem frit cisplatin, som er frigivet fra liposomerne (første blå top) og cisplatin, som er bundet i liposomer (midterste blå og røde top) samt frigivet cisplatin, som har bundet sig til protein (sidste blå top). Den røde top er signal for fosfor. Da liposomerne er dannet af fosforholdige lipider (fosfolipider), ses en top for både platin og fosfor, når de platinholdige liposomer detekteres.

ILLUSTRATION:HENNING DALHOFF

det vandige hulrum. På den måde kan man vurdere, om produktet er stabilt, fx om liposomerne nedbrydes med tiden.

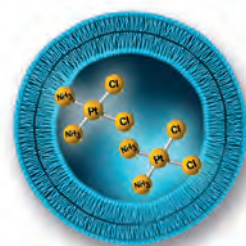
STABILITET I BLODET

Når man har udviklet et stabilt liposombaseret lægemiddel, er det naturligvis også vigtigt at kunne vurdere, om cisplatin frigives, når lægemidlet injiceres i kroppen. Det ideelle lægemiddel skal være stabilt, så længe det cirkulerer i blodet, men være i stand til at frigive sin last, når liposomet når frem til kræftsvulsten.

Der er altså brug for analysemetoder, som kan skelne mellem frit og liposomindkapslet lægemiddelstof i blodplasma. Analysen er kompliceret, fordi plasma indeholder store mængder af salte, proteiner og andre

stoffer, som kan indvirke på resultatet. Derfor anvender vi her en anden separationsmetode, kapillarelektroforese. Fordelen ved metoden er, at der ikke opstår forstyrrende vekselvirkninger med de mange plasmakomponenter. Via optimering af analysebetingelserne er det lykkedes at separere liposomindkapslet og frit cisplatin. Samtidig kunne vi vise, at noget af det frigjorte cisplatin bandt sig til plasmakomponenter – sandsynligvis proteiner som albumin.

Udviklingen af disse analysemetoder har gjort det nemmere at vurdere kvaliteten af liposombaserede lægemidler både under udviklingen af nye indkapslingsmetoder og ved den efterfølgende afprøvning i dyr og mennesker. •



I liposomer vender fosfolipiderne deres vandopløselige dele ud imod blodet og ind imod det centrale hulrum, hvor lægemiddelstoffet er opløst i en vandig væske.

ILLUSTRATION:HENNING DALHOFF

EN AVANCERET VÆRKSTØJSKASSE

Størrelseskromatografi er en separationsmetode, hvor analytter adskilles på baggrund af størrelse og molekylvægt i en kolonne. Kolonnen indeholder porøst materiale med en porestørrelse, som medfører, at mindre molekyler kan sætte sig i materialet, mens større molekyler ikke tilbageholdes så kraftigt. På den måde opnås en separation efter størrelse, hvor store molekyler kommer ud fra kolonnen før de små. Størrelseskromatografi benyttes ofte til adskillelse af makromolekyler som proteiner, men kan også anvendes til at separere frit lægemiddelstof fra liposomindkapslet lægemiddelstof.

Kapillarelektroforese er en separationsmetode, hvor en blanding af analytter adskilles på baggrund af deres ladning og størrelse. Dette gøres ved at lægge en spænding på 10-30 kV hen over et tyndt rør – kapillaret – som er fyldt med en bufferopløsning. Nogle få nanoliter prøve injiceres i den ene ende af røret, en spændingsforskel påsættes, hvilket medfører at positivt ladede stoffer bevæger sig imod elektroden og detektoren i den an-

den ende. Små molekyler bevæger sig hurtigere gennem kapillaret end store molekyler. Neutrale molekyler påvirkes ikke af det elektriske felt, men trækkes hen mod detektoren af det elektrosmotiske flow, der opstår på grund af ladningsforskellen mellem kapillaroverfladen og buffervæsken. Systemet giver en separation efter ladning og størrelse, hvor små positive molekyler kommer først ud af kapillaret, fulgt af de større positive molekyler, neutrale molekyler og til sidst de negativt ladede forbindelser.

ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) er en detektionsmetode, hvor molekylerne i en prøve detekteres ud fra deres indhold af grundstoffer. Prøven føres ind i et 8000 °C varmt argonplasma, hvor alt organisk materiale brændes af, så der dannes positive ioner af grundstofferne i prøven. Grundstofferne detekteres efterfølgende via deres masse-ladningsforhold i et massespektrometer. ICP-MS instrumentet kan kobles sammen med udstyret til størrelseskromatografi eller kapillarelektroforese, hvorved

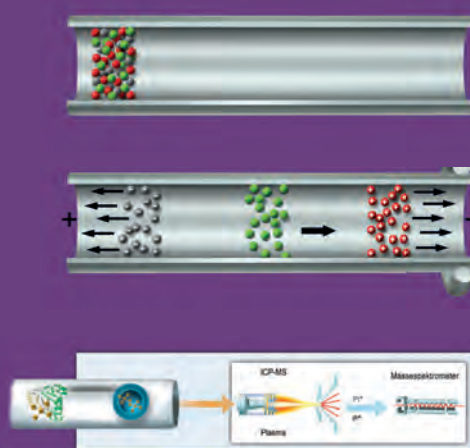


ILLUSTRATION:HENNING DALHOFF

molekylerne føres ind i massespektrometret, når de efter adskillelsen kommer ud fra kolonnen et efter et. Målingen giver et kromatogram, hvor grundstofsignalerne fra de forskellige molekyler kan følges over tid.



FOTO: NILLA BJÖRKLUND

Forekomst af lægemiddelstoffer i grundvand og havvand på Mallorca

FERSKVAND ER EN MANGELVARE PÅ MALLORCA, OG DERFOR GENBRUGES RENSSET SPILDEVAND TIL VANDING I LANDBRUGET OG I BYERNE. VANDET INDEHOLDER BIOLOGISK AKTIVE RESTER AF LÆGEMIDLER, SOM IKKE FJERNES I RENSNINGSANLÆGGENE, OG SOM KAN SKADE BÅDE PLANTER OG DYR. VI HAR UNDERSØGT VANDPRØVER TRE STEDER PÅ TURISTØEN, HVOR VI FANDT RESTER AF 18 FORSKELLIGE LÆGEMIDLER.

FORFATTERE

Ph.d. Erland Björklund er lektor på Institut for Farmaci.

Ph.d. Carlos Rodríguez-Navas González er forsker på Universitat de les Illes Balears, Spanien.

Ph.d. Martin Hansen er adjunkt på Institut for Farmaci.

Ph.d. Víctor Cerdà Martín er professor på Universitat de les Illes Balears, Spanien.

Ph.d. Kristine A. Krogh er lektor på Institut for Farmaci.

Der findes ikke permanente åer og søer på turistøen Mallorca, og derfor er ferskvand en mangelvare.

For at dække behovet genbruges store mængder rensset spildevand til vanding i landbruget, i byerne og på golfbanerne. Et væsentligt problem ved genanvendelsen er, at rensningsanlæggene på øen – og generelt i hele Europa – ikke er tilstrækkeligt effektive til at fjerne lægemiddelrester fra spildevandet. Den største del af øens rensede spildevand kommer fra hovedbyen Palma de Mallorca med lidt over 400.000 indbyggere og ender ude i Palma bugten.

Lægemiddelrester er i sagens natur stærkt biologisk aktive, og hvis disse stoffer spredes i miljøet, siver ned til grundvandet eller ender i havet, kan de forårsage uønskede økotoxikologiske effekter på flora og fauna. Det er især problematisk, hvis stofferne siver ned i grundvandet, fordi Mallorca udvinder store mængder grundvand til drikkevand til øens 1,1 million indbyggere og de omkring 14 millioner turister, som hvert år besøger ferieparadiset.

På trods af det store antal besøgende er spredningen af lægemiddelrester til vandmiljøet aldrig tidligere blevet undersøgt. Ved

hjælp af en multi-analysemetode fandt vi i alt 18 lægemiddelstoffer i vandprøver fra rensningsanlægsudløb, grundvand og havvand. Prøverne blev indsamlet i april 2011 fra tre forskellige områder på øen umiddelbart før turistsæsonen. Flere lægemiddelrester blev fundet i spildevandsudløbene i koncentrationer helt op til 30 µg/L. Nogle af lægemiddelresterne blev også fundet i grundvand og havvand, men i lavere koncentrationer.

STORBYEN PALMA DE MALLORCA

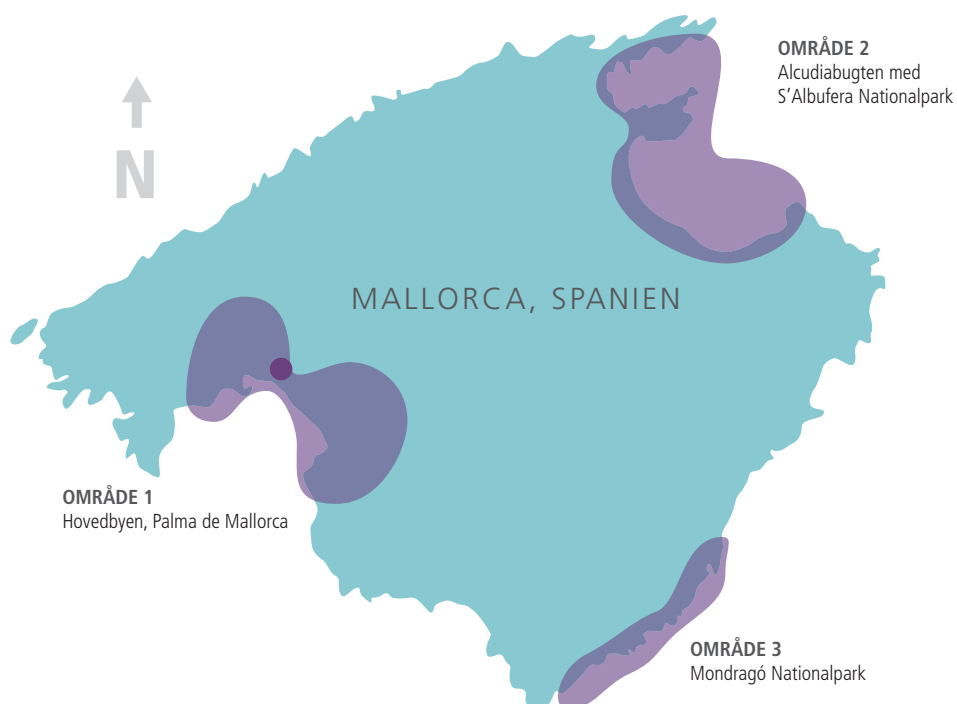
I Palma de Mallorca undersøgte vi spildevand fra to rensningsanlæg, og derefter indsamlede vi havvandsprøver fra Palma bugten ca. 50 m fra anlæggenes udløb i havet. I udløbsvandet og havvandet fandt vi adskillige lægemiddelrester:

- Hjertemedicinen atenolol var til stede i udløbsvandet fra rensningsanlæg 1 i koncentrationer på over 20 µg/L og blev også identificeret i målbare koncentrationer i havvandet. Koncentrationerne var dog heldigvis lavere end de niveauer, der medfører kroniske effekter på fisk.
- Lægemidlet carbamazepin, som bruges til behandling af epilepsi og skizofreni, er kendt for at være et stabilt lægemiddelstof i miljøet og blev fundet i lave koncentrationer på 0,2 µg/L i udløbene fra begge rensningsanlæg. Stoffet blev ikke fundet i

havvand. Carbamazepin er blevet undersøgt med hensyn til toksicitet ovenfor fisk. Effekter ses dog først i koncentrationer, der er mere end tusinde gange højere end de målte koncentrationer i udløbene.

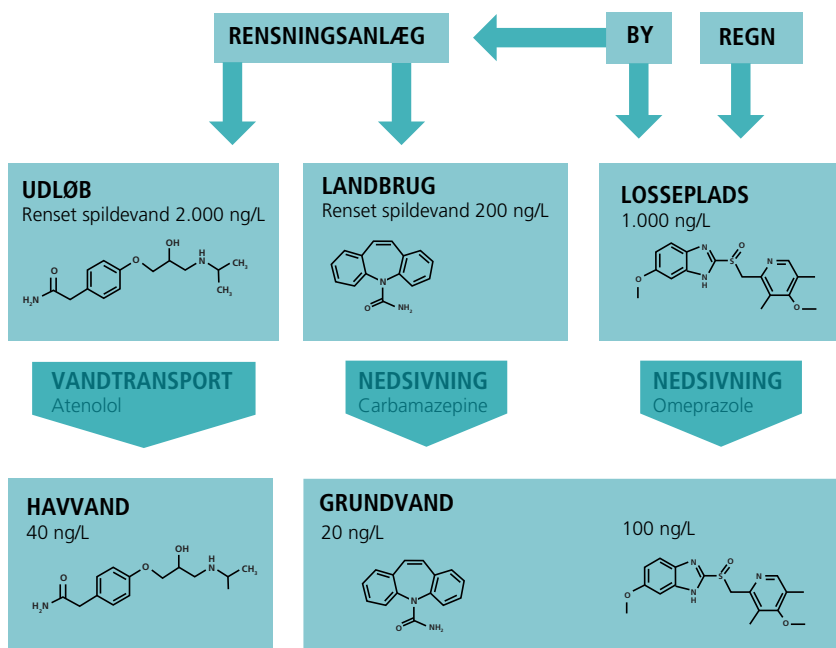
- Det anti-inflammatoriske lægemiddel diclofenac, som anvendes til behandling af leddegigt, er kendt for at have dræbt 95 procent af bestanden af gribbe i Pakistan, efter at fuglene spiste kadavere af køer, som var blevet medicineret med stoffet. Lægemiddelstoffet er i dag prioriteret af EU i udløbsvand. Stoffet blev ikke fundet i særlig høje koncentrationer i rensningsanlæggene og fortyndes derfor sandsynligvis ud i havet, hvor det ikke kan detekteres.
- Det angstdæmpende lægemiddel oxazepam blev fundet i koncentrationer over 1 µg/L i udløbsvandet, men kunne alligevel ikke identificeres i havvand på trods af, at stoffet er rimeligt stabilt.
- Mavesårsmedicinen omeprazol er det stof, som vi målte i de største mængder i spildevandet med koncentrationer helt op på 30 µg/L. Rester af stoffet forefindes også i havvandet i Palma bugten.

Generelt kan det konkluderes, at spildevandet fra storbyens rensningsanlæg udgør en kilde for lægemiddelrester til havmiljøet.



Kortet viser de tre områder på Mallorca, hvor vandprøverne blev indsamlet. Område 1: Hovedbyen Palma de Mallorca. Område 2: Hotelområdet i Alcudia og S'Albufera national park. Område 3: Nationalparken Mondragó.

ILLUSTRATION: MALENE HALD



Grafikken viser, hvordan og i hvilket omfang lægemiddelrester fra rensede spildevand og lossepladser ender i havvand, jord og grundvand. Her er spredningen i miljøet eksemplificeret med betablokkeren atenolol, som bruges til behandling af forhøjet blodtryk og hjerterytmeforstyrrelser; carbamazepin, der anvendes til behandling af epilepsi og skizofreni; samt mavesårsmedicinen omeprazol.

ILLUSTRATION: MALENE HALD

Koncentrationerne i havvandet er dog i de fleste tilfælde lavere end i det rensede spildevand på grund af nedbrydning eller fortynding.

TURISTBYEN ALCUDIA OG TO NATIONALPARKER

Turist og hotelområdet Alcudia er kendt for sine badestrande, og her satte vi fokus på, om nedsvivende spildevand fra en losseplads forurener grundvandet under lossepladsen og den nærliggende bugt. Vi indsamlede prøver af havvandet i bugten ud for byen Alcudia samt ud for nationalparken S'Albufera, som ligger ved Alcudia bugten.

Vandet fra lossepladsen indeholder i alt syv lægemiddelstoffer. Tre af disse lægemidler findes også i grundvandet under

lossepladsen; nemlig hormonet gestoden, der anvendes i p-piller, mavesårsmedicinen omeprazol samt antibiotikummet amoxicilin. Koncentrationerne i grundvandet var dog 5-15 gange lavere end på lossepladsen. Desuden detekterede vi mavesårsmedicinen cimetidin samt carbamazepin i grundvandet på trods af, at disse to lægemidler ikke kunne identificeres i vandet fra lossepladsen. Dette kan muligvis forklares ved, at rensede spildevand bruges til vanding af golfbaner og landbrugsarealer i området. Hypotesen bestyrkes af, at begge lægemidler blev fundet i udløbsvandet fra rensningsanlæggene i Palma de Mallorca, og man ved fra andre studier at carbamazepin er et svært nedbrydeligt stof. Fundet tyder på en kobling mellem lossepladser, hvor vand med lægemiddelrester siver ned til grundvandsmagasinerne, og kontaminering af grundvandet via genbrug af rensede spildevand til markvanding.

Alcudia bugten samt S'Albufera nationalpark er mindre forurenet med lægemiddelrester end Palma bugten, men indeholder dog en del lægemiddelrester. Mavesårsmedicinen omeprazol blev målt i havvandet ud for Alcudia og i havvandet ved nationalparken. Havvand fra nationalparken indeholdt også den vanddrivende medicin furosemid samt hormonet gestoden. Det er interessant at notere, at betydelige mængder af disse stoffer forekom i vandet fra lossepladsen på trods af, at der ikke er nogen direkte fysisk kobling mellem vandet fra lossepladsen og nationalparken. Flere analyser er således nødvendige for at forstå transporten af disse stoffer til

Palma de Mallorca



FOTO: ENLAND BOKRUND



FOTOS: ERLAND BJØRKLUND OG MARTIN HANSEN

S'Albufera nationalpark.

Nationalparken Mondragó er mere isoleret end S'Albufera, og vores målinger viser, at vandet her er meget rent. Det eneste lægemiddel, vi identificerede var mavesårsmidlet omeprazol, som blev påvist i koncentrationer på 0,02 µg/L vand. Dette stemmer også fint overens med, at der ikke er byer eller væsentlig aktivitet fra turisme i området.

LÆGEMIDDELSTOFFER I VANDMILJØET

Med udgangspunkt i de første målinger af forekomsten af lægemiddelrester i vandmiljøet på Mallorca, kan man skabe et præliminært overblik over spredningen af disse stoffer på øen. Undersøgelsen af lægemiddelresternes transportveje til grundvandet udgør et godt grundlag for at tilrettelægge en fremtidig overvågning af den meget vigtige naturressource, som grundvandet er på Mallorca. Samtidig giver undersøgelsen mulighed for at planlægge, hvordan forbedringer af de store byers rensningsanlæg kan gennemføres for at undgå udledning af lægemiddelrester til havmiljøet.

EFFEKTER PÅ DYR OG MENNESKER

Generelt har de niveauer af lægemiddelrester, som blev målt i grundvand og havvand,

ikke akutte toksiske effekter på dyreliv og mennesker. Men i dag har man kun begrænset viden om mulige langtidseffekter samt om de mulige kombinatoriske effekter, der kan opstå, når dyr og planter udsættes for små mængder af mange forskellige stoffer. Lægemiddelstoffer bør derfor ses som en kilde til forurening parallelt med pesticider og tungmetaller.

Økotoxikologiske studier har for nylig vist, at fx laks ændrer aktiveringen af generne i insulinsystemet efter blot fem dages udsættelse for relativt lave koncentrationer af hjertemedicinen atenolol, som var til stede i spildevandet fra rensningsanlæggene i Palma de Mallorca. Indtil man får større viden om de mange komplekse effekter, der kan opstå ved forurening med lægemiddelrester, er det nødvendigt med en vis overvågning af disse stoffer i miljøet. Samtidig forskes der nu i metoder til at forbedre rensningsanlæg, så de bliver bedre til at fjerne uønskede stoffer som lægemiddelrester fra det rensede spildevand. Endelig er det vigtigt at udvikle mere miljøvenlige lægemiddelstoffer, som lettere nedbrydes, hvis de ender i vandmiljøet. •

PRØVEINDSAMLING OG ANALYSEMETODER

1. Indsamling af 1 liter vandprøver i glasflasker.
2. Prøverne filtreres ved anvendelse af et glasfilter, som fjerner partikler.
3. Lægemiddelresterne oprenses og opkoncentreres ved at ekstrahere vandet gennem en fast-fase kolonne, hvor andre miljøfremmede stoffer i vandet bindes til kolonnens vægge.
4. Lægemiddelstofferne adskilles ved hjælp af væskekromatografi, og deres art og koncentrationer i vandet bestemmes ved hjælp af massespektrometri.

Alcudia Beach



FOTO: KARIN BJØRKLUND

DET SUNDHEDSVIDENSKABELIGE FAKULTET
KØBENHAVNS UNIVERSITET

BLEGDAMSVEJ 3B
2200 KØBENHAVN N

TLF. 35 33 60 00
WWW.SUND.KU.DK