

DET SUNDHEDSVIDENSKABELIGE FAKULTET
KØBENHAVNS UNIVERSITET



Lægemiddelforskning



2013

Lægemiddelforskning

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

Redaktion

Rolf Haugaard, Tommy Panduro
og Ulf Madsen (ansvarshavende)

Design og layout

Kliborg Design

Fotos, grafik og illustrationer

Henning Dalhoff
Sune Kliborg Lyngé
iStockphoto
Tommy Panduro
Søren Brøgger Christensen
Magda Skou Møller
Brian Lohse
Birgitte Ruste
Nils Nyberg
Regner Lotz
Ebba Holme Hansen
Nickolaj Petersen
Jens Raadal
Birger Brodin
Jette S. Kastrup
Helle S. Waagepetersen
Hanne Mørck Nielsen

Tryk

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



Lægemiddelforskning 2013

Lægemidler er omdrejningspunktet for al forskning på de to institutter på det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, som er knyttet til School of Pharmaceutical Sciences (PharmaSchool): Institut for Farmaci og Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Med nærværende udgave af Lægemiddelforskning dækkes et bredt udsnit af igangværende forskningsprojekter på de to institutter, som tilsammen udgør grundlaget for udbuddet af forskningsbaserede uddannelser på PharmaSchool.

Forskning indenfor lægemiddelområdet er af natur interdisciplinær og omfatter både natur-, sundheds-, samfunds- og teknisk-videnskabelige projekter. Mange projekter er integrerede for at opnå en både bred og dybdegående forståelse, som er nødvendig for udvikling indenfor lægemiddelområdet. Jeg håber, at vi med nærværende magasin vil bringe næring til nysgerrigheden – og husk, at du kan følge med på institutters, PharmaSchools og fakultetets hjemmesider, som er nævnt nedenfor.

God fornøjelse,

Ulf Madsen
School Director

Institut for Farmaci: farmaci.ku.dk
Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi: ilf.ku.dk
School of Pharmaceutical Sciences: pharmaschool.ku.dk
Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet: sund.ku.dk

Indhold

6

Fra plantegift til målrettet lægemiddel mod kræft

Af Søren Brøgger Christensen, Eleonora Sandholdt Paulsen, Nhu Thi Quynh Doan, Poul Nissen, Jesper Vuust Møller og Craig Dionne

9

Sukkerafhængighed er kræftcellers Akilleshæl

Af Magda Skou Møller, Søren Skou, Richard Edward Gillilan og Bente Vestergaard

12

Biologiske lægemidler – fra molekyle til medicin

Af Hanne Mørck Nielsen, Camilla Foged, Lene Jørgensen og Sven Frøkjær

15

Genmodificerede virusbiblioteker: Producerer milliarder af potentielle biologiske lægemiddelstoffer

Af Brian Lohse

18

NMR: En drøm for tekniknørder

Af Nils Nyberg og Sileshi G. Wubshet

21

NMR: En teknik med mange anvendelsesområder

Af Nils Nyberg og Dennis Aslak Olsen

24

Svær vurdering af lægemidler: Hvordan afvejer man bedst nytte kontra risiko?

Af Berit Nautrup Andersen og Ole Jannik Bjerrum

26

Optimal behandling af kritisk syge med vancomycin

Af Tina Andersen, Dorthe Vilstrup Tomsen, Jan Bonde, Michael Tvede og Lona Loring Christrup

29

Kronisk syge unge har svært ved at passe deres behandling

Af Signe Hanghøj, Kirsten A. Boisen og Lotte Stig Nørgaard

32

Forskeruddannelse baner vej for: Bedre medicinbrug blandt børn i Uganda

Af Ebba Holme Hansen, Annette Olsen, Marianne Stubbe Østergaard og Susan Reynolds Whyte

Simpelt system viser lægemidlers omdannelse i kroppen

Af Nickolaj Petersen, Henrik Jensen, Steen Honoré Hansen og Stig Pedersen-Bjergaard

35

Nyt princip til forlænget smertebehandling af gigt:

Medicindepot dannes efter injektion i leddet

Af Susan Weng , Mette Agergaard Thing, Jesper Østergaard, Jesper Kristensen, Martin Hansen og Claus Selch Larsen

38

Vaccination i slimhinderne skal forhindre sygdomsfremkaldende mikroorganismer i at nå ind i kroppen

Af Camilla Foged, Pall Thor Ingvarsson, Frank Follmann, Dennis Christensen og Hanne Mørck Nielsen

41

Depression: Bedre dyremodeller – bedre medicin

Af Helle M. Sickmann, Tina Arentzen, Tim B. Dyrby, Niels Plath og Morten Pilgaard Kristensen

44

Cellemodel af blodhjernebarrieren kan mindske brugen af forsøgsdyr

Af Birger Brodin, Hans Christian Cederberg Helms, Maria Selch Hersom, Carsten Uhd Nielsen og Helle Waagepetersen

47

På jagt efter et virkningssted i hjernen

Af Karla Frydenvang, Lina Juknaite og Jette S. Kastrup

50

Glutamatdehydrogenase

– et nøgleenzym i hjernens energiomsætning

Af Malin H. Stridh, Kamilla Pajicka, Jakob Dahl Nissen, Camilla Wendel Nielsen, Arne Schousboe og Helle S. Waagepetersen

53

Fra plantegift til målrettet lægemiddel mod kræft

Kliniske undersøgelser har vist, at en nyudviklet lægemiddeld kandidat har en effekt på leverkræftpatienter. Stoffet er baseret på en plantegift, der dræber alle celler, men ved kemisk omdannelse og udnyttelse af et særligt enzym er giften blevet målrettet mod blodkar i kræftsvulster. De indledende undersøgelser var tilrettelagt for at undersøge bivirkninger og ikke med henblik på at behandle patienter, men resultaterne er opmuntrende.

Forfattere

Ph.d. Søren Brøgger Christensen er professor MSO på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Cand.scient. Eleonora Sandholdt Paulsen er ph.d.-studerende på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Cand.scient. Nhu Thi Quynh Doan er ph.d.-studerende på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Ph.d. Poul Nissen er professor på Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Århus Universitet.

Dr.med. Jesper Vuust Møller er professor på Institut for Biomedicin – Fysiologi og Biofysik, Århus Universitet.

Ph.d. Craig Dionne er direktør for GenSpera Inc., San Antonio, USA.

Naturen har skabt nogle ekstremt giftige forbindelser, og en række af disse stoffer er særligt giftige over for celler, der deler sig. Et eksempel er taxol fra takstræet, som anvendes til kemoterapi. Naturen er langt bedre end mennesker til at fremstille ekstremt giftige forbindelser, men vi er til gengæld dygtige til at udnytte giftstofferne til behandling af fx kræft.

Det er karakteristisk for mange kræftceller, at de deler sig hurtigere end størstedelen af kroppens normale celler. Ved at behandle kræften med plantegifte fra takstræet eller singrønslægen, opnås en selektivitet over for de hurtigt voksende kræftceller, men desværre vil stofferne også ramme andre hurtigvoksende celler i kroppen. Dette er forklaringen på, at mange patienter, der undergår kemoterapi, taber håret og får svækket deres immunforsvar. Hårtabet er et forbigående kosmetisk problem, men den nedsatte aktivitet af immunsystemet kan i værste fald blive fatal.

I de senere år er det lykkedes at udvikle lægemidler til behandling af en række hurtigt voksende kræftformer, men det er stadig svært at behandle langsomt voksende former som fx prostatakræft, og i dag er mulighederne for at helbrede disse sygdomme meget begrænsede. En farbar vej vil være at målrette giftstofferne, så de kun rammer kræftceller, men det er uhyre vanskeligt, fordi kræftceller kun udviser små forskelle fra normale celler.

Cellegift fra skærmpolante

Et tværfagligt samarbejde mellem denne artikels forfattere har ført til en strategi, som giver nyt håb. Strategien er baseret på to forhold. For det første har gruppen opdaget en cellegift med en ny virkningsmekanisme, og for det andet har vi fundet et unikt enzym i blodkarrene i kræftsvulster, som gør det muligt at målrette cellegiften mod kræftcellernes blodforsyning.

Cellegiften stammer fra skærmpolanten *Thapsia garganica*, som vokser i Middelhavsområdet. Planten har endnu ikke fået almindeligt anerkendt dansk navn – men giftgulerod kunne være en mulighed. Når planten vokser på marker, hvor der går får, spiser fårene slet ikke af planten, selv om al anden vegetation er ædt. Det gør fårene kloge i, for planten indeholder en række stærke giftstoffer, hvoraf den dominerende gift kaldes thapsigargin.

Thapsigargin's giftvirkning beror på, at stoffet trænger ind i cellen og blokerer en ionpumpe, der opretholder en lav koncentration af calciumioner i cellevæsken og en høj koncentration af calciumioner i visse intracellulære organeller. Hvis calciumpumpen blokeres, forhindres denne funktion, og det er fatalt for cellen, som begår selvmord i løbet af nogle timer via programmeret celledød. Den omtalte calciumpumpe findes i alle celler, så uden modifikationer slår thapsigargin alle kroppens celler ihjel.

Målretning imod svulster

I forbindelse med gruppens arbejde blev det konstateret, at blodkarrene i en række kræftsvulster indeholder et unikt enzym, som kaldes prostata specifikt membran antigen (PSMA), fordi enzymet oprindeligt blev opdaget i prostatakirtlen. Undersøgelser har nu vist, at enzymet findes i 95 procent af leverkræftsvulster, 70 procent af ovariekræftsvulster, 95 procent af nyrekræftsvulster og 42 procent af brystkræftsvulster. Derimod findes enzymet ikke i påviselige mængder i normalt væv i leveren, æggestokkene, nyrerne eller brysterne.

PSMA enzymet er meget specifikt med hensyn til de proteinsekvenser, det kan spalte, og derfor har vi udviklet en modifikation af thapsigargin, som indeholder en spaltelig proteinsekvens, et peptid. På den måde har vi fremstillet et såkaldt prodrug, som kun spaltes i den menneskelige organisme, hvor det møder PSMA-enzymet – altså ved tumorerne. Ved spaltningen frigives giftstoffet, hvorpå det trænger ind i svulsten og dræber kræftcellerne.

Prodrugget kan sammenlignes med en håndgranat. Så længe splitten sidder i granaten, er den harmløs, men hvis splitten fjernes, eksploderer håndgranaten efter kort tid. Prodrugget er harmløst, fordi proteindelen ikke kan trænge gennem de fedtholdige cellemembraner, og derfor kan det uspaltede prodrug ikke komme ind til calciumpumpen i de raske celler.



Blomstrende giftgulerod (*Thapsia garganica*) vokser i landene omkring Middelhavet. Plantegiften thapsigargin udvindes fra roden eller fra frugterne. Foto: Forfatterne

Lægemedeldesign fra krystalstrukturer

For at prodrugget kunne spaltes af PSMA-enzymet måtte der sættes en lang kæde ind i molekylet. Thapsigargin er nemlig så voluminøs, at plantegiften ikke kan passe ind i enzymets bindingslomme. Ved hjælp af den indsatte kæde, som består af 12 CH_2 -grupper, kunne peptiddelen gå ind i enzymets bindingslomme og blive fraspaltet, hvorimod thapsigargindelen forbliver uden for enzymet.

Det var ikke givet på forhånd, at thapsigargindelen forlænget med denne kæde kunne hæmme calciumpumpen i kræftcellerne og sende dem på selvmordskurs. Heldigvis viste det sig at være tilfældet, og ved hjælp af proteinkrystallografi kunne vi vise, hvordan den frigjorte cellegift binder sig til calciumpumpen. Krystalstrukturen viser, at calciumpumpen er så fleksibel, at kæden kan gå tværs gennem pumpen og derfor ikke forhindrer giftstoffet i at binde sig i pumpens bindingslomme.

Modelforsøg og dyreforsøg

Konceptet er blevet afprøvet i en række modelforsøg, hvor kræftceller blev dyrket under tilsætning af prodrugget. De celler, der ikke danner PSMA-enzymet, bliver kun påvirket i meget høje koncentrationer af prodrugget, hvorimod kræftceller, der danner enzymet, bliver dræbt selv i lave koncentrationer, fordi kræftcellerne frigør giftstoffet fra prodrugget.

Næste trin var at indgive prodrugget til sunde dyr, heriblandt mus, og forsøgene viste, at stoffet ikke blev spaltet i musene. I stedet forsvandt prodrugget langsomt fra musenes blod sandsynligvis via udskillelse i nyrerne. Men når musene blev påført kræftknuder, der danner PSMA, kunne det aktive giftstof påvises i svulsterne, som svandt ind. For at få tilladelse til at give prodrugget til men-

nesker, undersøgte vi, om stoffet havde uacceptable bivirkninger på de dyr, der står mennesker nærmest, nemlig aber. Forsøgene viste, at stoffet kunne indgives i doser, der var mindst lige så store som den forventede virksomme dosis hos mennesker, uden at der blev observeret uacceptable bivirkninger.

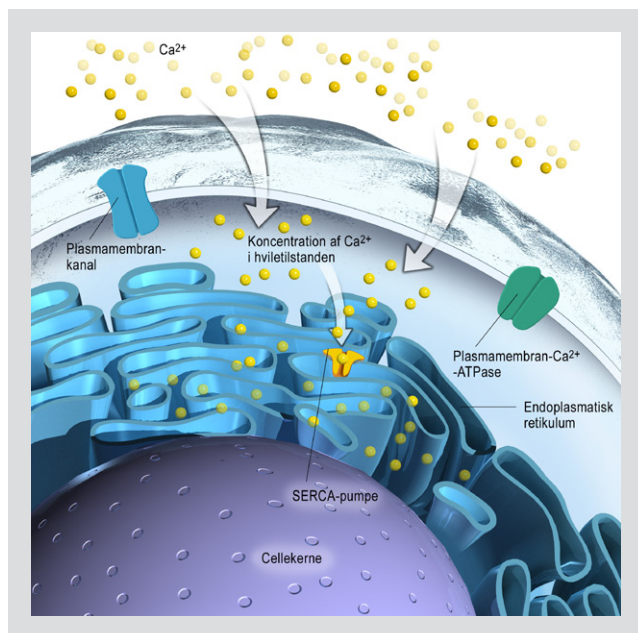
Kliniske forsøg med kræftpatienter

Efter de vellykkede dyreforsøg kontaktede gruppen de amerikanske sundhedsmyndigheder i Food and Drug Administration (FDA) med henblik på at få tilladelse til at gennemføre kliniske studier, og tilladelsen blev givet i september 2009.

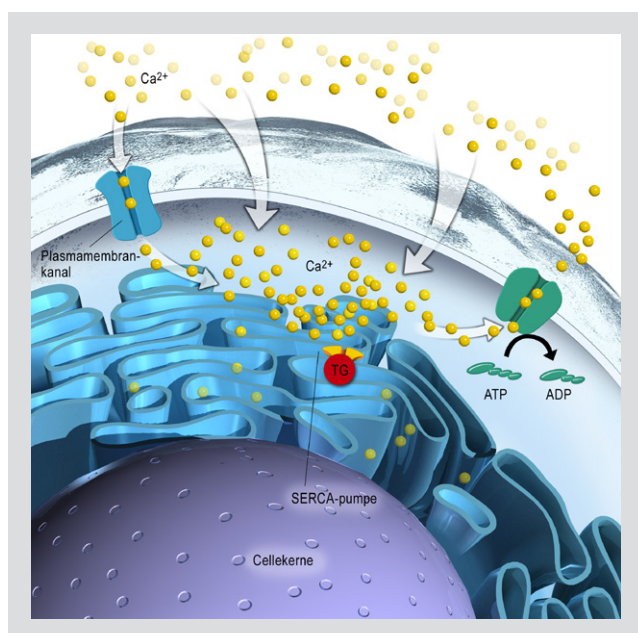
De indledende kliniske fase 1 forsøg var udelukkende designet til at undersøge, om behandlingen medfører uacceptable bivirkninger. 28 kræftpatienter, som det ikke var lykkedes at behandle med kendte behandlingsformer, blev udvalgt til at deltage i undersøgelsen. Disse patienter led af flere forskellige typer kræft. Forsøgene var meget tidskrævende, idet kliniske forsøg af denne type startes med at indgive meget små mængder af prodrugget. Dosis bliver så langsomt øget, for at sikre, at der ikke opstår bivirkninger. Først efter to års behandling var patienterne nået op på en dosis, der kunne udvise en effekt.

Selv om forsøget som nævnt fokuserede på toksiske bivirkninger og ikke var planlagt til at undersøge, om behandlingen rent faktisk virker imod kræften, observerede vi alligevel en klinisk effekt hos nogle enkelte patienter. Blandt patienterne var der fem patienter, som ikke havde reageret positivt på behandling med det normalt anvendte lægemiddel mod deres sygdom. Statistikken viser, at disse patienter efter to måneder kunne forventes at udvikle svulster, der ikke kan behandles. En meget opmuntrende observation var, at i tre af tilfældene blev perioden inden dannelsen af svulsterne forlænget med adskillige måneder. Selv om dette er lovende, tillader et forsøg med kun fem patienter naturligvis ikke at konkludere, at lægemidlet rent faktisk virker. Hertil kræves, at et langt større antal patienter har været i behandling og har reageret positivt på behandlingen.

I øjeblikket rekrutteres 28 patienter med leverkræft for at undersøge effekten af en forsøgsbehandling med lægemidlet. Vi forventer, at resultaterne fra disse fase 2 forsøg vil foreligge ved udgangen af 2014. Hvis resultaterne er lovende, skal der gennemføres fase 3 forsøg på flere tusinde patienter, inden vi bliver i stand til at konkludere, om stoffet er virksomt imod leverkræft uden uacceptable bivirkninger og kan frigives til almindelig behandling. Derfor vil der gå 4 til 5 år før det kan blive muligt at anvende det nye lægemiddel i almindelig behandling af kræftpatienter. En sådan lykkelig udgang af projektet ville være et eksempel på et helt nyt koncept i kræftbehandling.



A

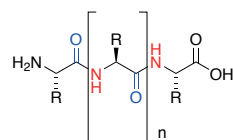


B

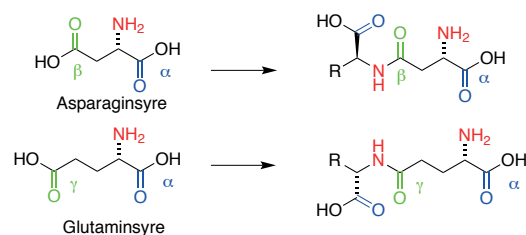
(A) SERCA-pumpen er en intracellulær ionpumpe, som holder koncentrationen af calciumioner lav i cellevæsken ved at pumpe ionerne ind i organeller, som kaldes det sarcoplasmatiske eller endoplasmatiske retikulum – afhængigt af, hvilken type celle, der er tale om. (B) Hvis ionpumpen blokeres med thapsigargin (TG), stiger koncentrationen af calciumioner ved diffusion ud af organellerne. Dette kan medføre en yderligere indtrængen af ioner ved åbning af en ionkanal (blå) i cellemembranen. En pumpe i cellemembranen (grøn) vil forsøge at pumpe ionerne ud af cellen. Hvis ikke cellen formår at genetablere hviletilstanden, vil den begå selvmord. Illustrationer: Henning Dalhoff

Selektiv spaltning af prodrugget

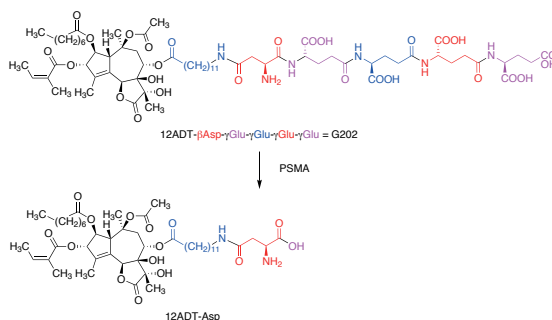
Proteiner består af lange perlekæder, som er sammensat af de 20 forskellige aminosyrer, der findes i kroppen. Almindelige proteiner er opbygget ved, at α -aminogruppen (rød) i en aminosyre danner en peptidbinding til α -carboxylsyren (blå) i den næste aminosyre. Det indrammede område viser aminosyreenheden i peptidet og R symboliserer de sidekæder, som sidder på aminosyrerne, n er et vilkårligt tal op til flere hundrede.



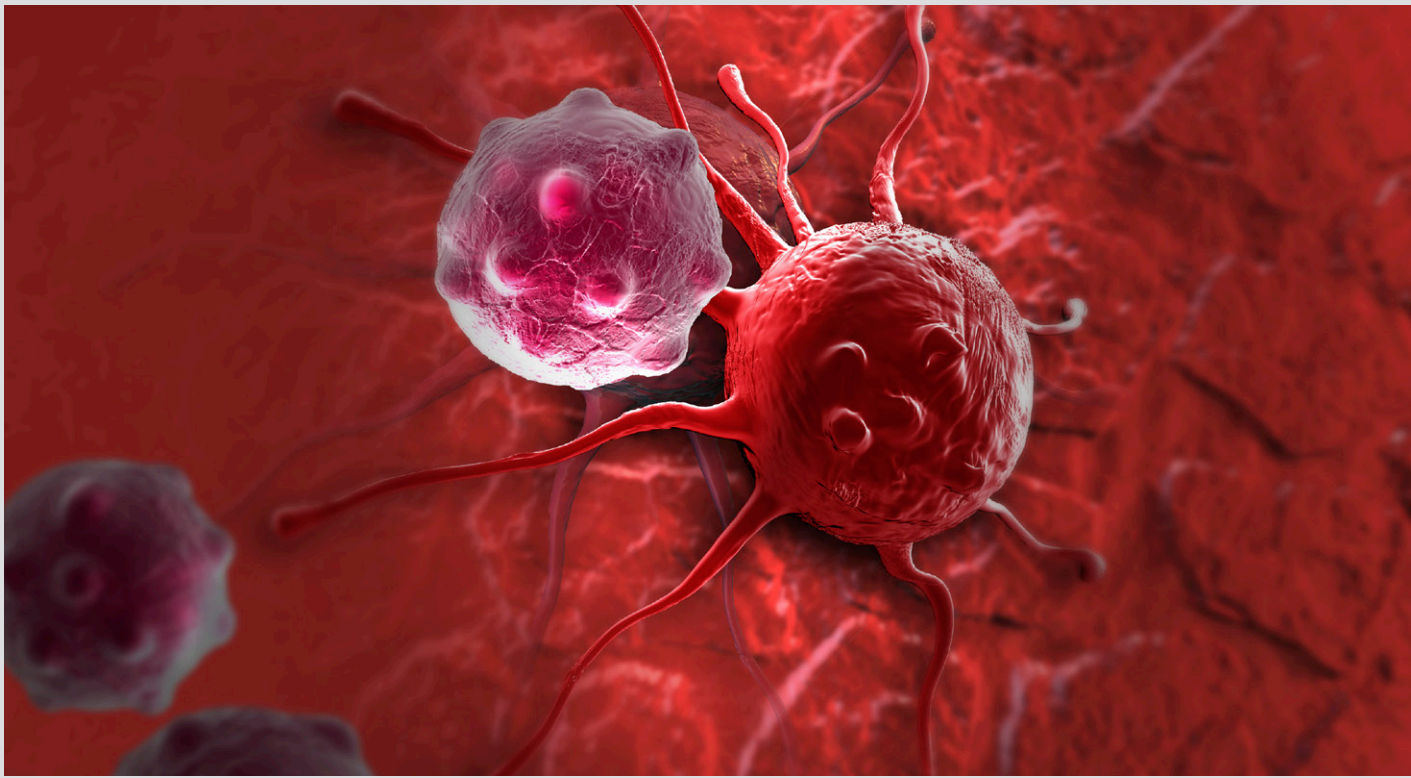
Kroppen råder over et stort arsenal af enzymer kaldet proteaser, som kan nedbryde proteiner ved at bryde peptidbindingerne. De to sure aminosyrer, asparaginsyre og glutaminsyre, indeholder to carboxylsyregrupper og kan således danne to typer peptidbindinger. Såfremt α -aminosyregruppen (blå) indgår i bindingen, dannes den type proteinstoffer, der er afbilledet i strukturen ovenfor. Hvis den anden carboxylsyre (grøn) indgår i bindingen, dannes forbindelser som vist i strukturene nedenfor:



Denne type peptidbindinger spaltes ikke af kroppens almindelige proteaser, men PSMA-enzymet i kræftsvulster er en undtagelse. Dette er udnyttet i prodrugget G202, som ses i strukturen nedenfor:



Når PSMA spalter prodrugget, frigives stoffet 12ADT-Asp, som er en modificeret udgave af thapsigargin og en virksom cellegift.



Kræftceller er afhængige af store mængder sukker i form af glukose for at kunne vokse hurtigt og sprede sig i kroppen. Foto: iStockphoto.com.

Sukkerafhængighed er kræftcellers akilleshæl

Kræftceller er afhængige af sukker, og det kan udnyttes til at bekæmpe svulsterne ved at bremse aktiviteten af et nøgleenzym, som omsætter sukkeret til energi. Vi undersøger enzymets virkningsmekanismer for at blive bedre til at hindre kræftcellerne i at sprede sig i kroppen.

Forfattere

Ph.d. Magda Skou er postdoc på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Ph.d. Søren Skou er postdoc på Niels Bohr Institutet.

Ph.d. Richard Edward Gillilan er seniorforsker på CHESS synkrotron, USA.

Ph.d. Bente Vestergaard er lektor på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Kræftceller har brug for enorme mængder energi i forhold til almindelige celler for at kunne opretholde deres hurtige vækst og sprede sig i kroppen. Derfor er bl.a. kræftceller karakteriseret ved en ændret omsætning af sukkerstoffet glukose.

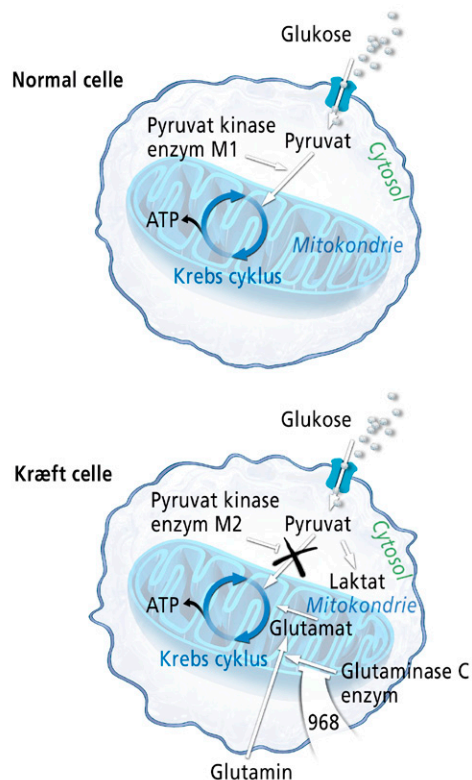
I normale celler bliver glukose omdannet til pyruvat, som herefter omdannes videre til ATP i mitokondrierne, som er cellernes kraftværker. ATP er et molekyle, der bærer energi, og det fungerer som kroppens brændstof, som holder alle processerne i cellerne i gang.

I kræftceller bliver glukosen brugt til syntese af andre celledele i cellevæsken, og ATP bliver i stedet dannet ud fra aminosyren glutamin. Kræftcellens overlevelse er derfor direkte afhængig af de biokemiske processer, som omdanner glutamin til ATP (se figuren på næste side).

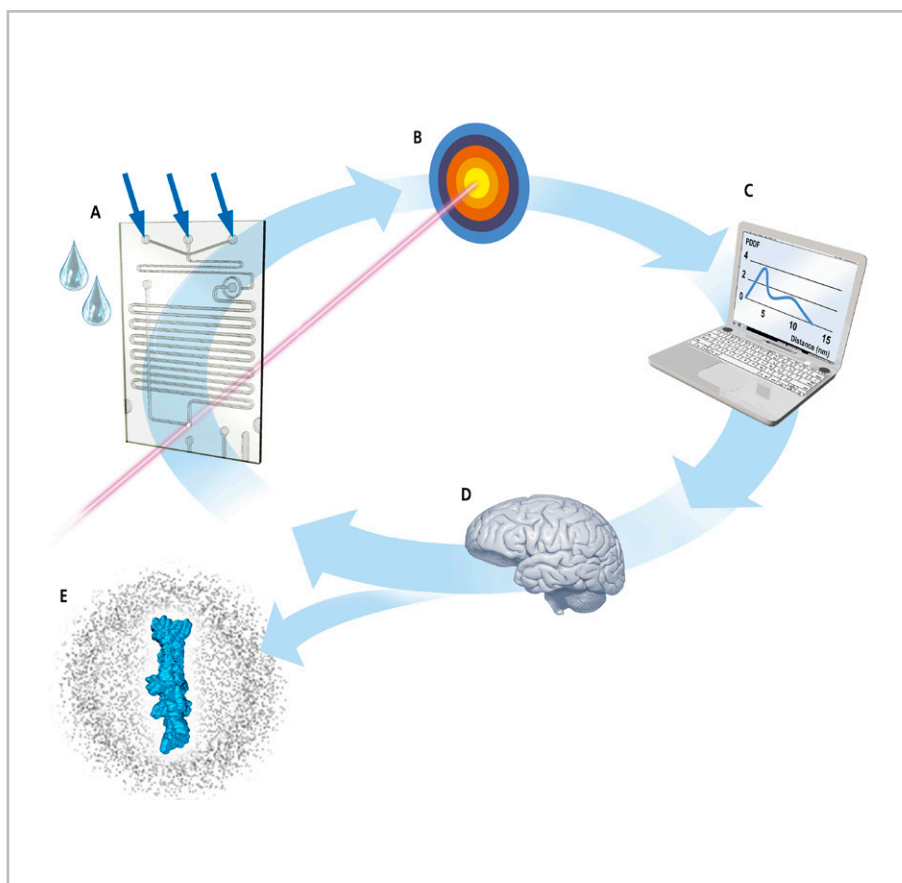
Derfor har forskere i flere årtier arbejdet på at bekæmpe spredningen af kræftsvulster ved at sulte kræftcellerne for glukose og glutamin, men desværre uden held. For nyligt lykkedes det imidlertid for en forskergruppe fra Cornell University i USA at stoppe væksten af brystkræftceller ved at tilsætte et lille molekyle, som de kalder #968. Ved videre undersøgelse fandt forskergruppen frem til, at dette molekyle hæmmer aktiviteten af nøgleenzymet glutaminase C.

Enzymet findes i kræftcellers mitokondrier, hvor det katalyserer omdannelsen af glutamin til glutamat, som derpå udnyttes til at danne brændstoffet ATP. Ved at hæmme enzymet reducerer man kræftcellernes produktion af biologisk brændstof, og det standser væksten i kræftsvulsterne. Da glutaminase C er et specifikt nøgleenzym i de syge kræftceller, er det relevant at lære mere om dets tredimensionelle struktur, fordi strukturen er afgørende for enzymets funktion.

Øget kendskab til den præcise rumlige form, som enzymet antager, når det omdanner glutamin til glutamat kan gøre det muligt at optimere designet af det nye lægemiddelstof #968 og derved



En normal celle (øverst) bruger glukose til at fremstille ATP, som er et biologisk brændstof. Kræftcellen (nederst) omsætter glukose til laktat og fremstiller i stedet ATP ved hjælp af nøgleenzymet glutaminase C. Hvis enzymet hæmmes med et lægemiddelstof kaldet #968, går kræftcellen sukkerkold og dør. Illustration: Henning Dalhoff



opnå en forøget evne til at slå kræftceller ihjel uden at skade kroppens raske celler.

Dynamiske enzymer i opløsning

Vi har undersøgt strukturen af glutaminase C i forskellige relevante opløsninger ved brug af småvinkel røntgenspredning (SAXS), som er velegnet til studier af proteiners struktur og dynamik (se figuren på næste side). En stor fordel ved metoden sammenlignet med klassisk røntgenkrystallografi er, at man kan undersøge enzymer og andre proteiner under mere fysiologisk relevante betingelser og dermed opnå information om enzymernes tredimensionelle former i deres naturlige miljø. Hvis flere enzymer samles i komplekser, når de sætter fart i biokemiske processer, er det også muligt at se dette.

Forsøgene blev udført ved hjælp af et avanceret microfluid-blandingssystem som muliggør, at vi kan undersøge mange forskellige opløsninger i løbet af kort tid og ud fra små mængder af enzymet. De fleste enzymer, inklusive glutaminase C, ændrer deres tredimensionelle form, når de arbejder, og derfor var det essentielt at opnå data, som belyser enzymets strukturelle forandringer indenfor korte tidsintervaller (se figuren nederst til højre).

Struktur og funktion

Glutaminase C er et enzym, der danner komplekser med flere eksemplarer af enzymet, når det udfører sin funktion og omdanner glutamin til glutamat, som derpå omdannes til det biologiske brændstof ATP i kræftcellerne. Komplekserne kaldes oligomerer, og man har længe haft mistanke om, at en ændring i det oligomere

stadie – dvs. antallet og formen af enzymer i komplekset – er koblet til den enzymatiske aktivitet.

De præcise detaljer var imidlertid ukendte, og derfor undersøgte vi de strukturelle egenskaber for to udgaver af glutaminase C. I den ene version havde enzymets proteinkæde sin fulde længde, mens et endestykke var klippet af proteinkæden i den anden version. Dette endestykke kaldes C-terminalen og er helt unikt for enzymet glutaminase C i kræftceller. Netop tilstedeværelsen af den specielle C-terminal adskiller kræftenzymet fra normal glutaminase, som findes i sunde celler. Derfor ønskede vi at afklare endestykkets betydning for funktionen af det kræftcellespecifikke enzym.

Analyserne af den fulde og den afkortede udgave af enzymet blev udført med udgangspunkt i røntgendata optaget i forskellige opløsninger. Forsøgene viste, at enzymet er mere stabilt i fuld længde, end den afkortede version er. Analysen evaluerede også, hvilke oligomerer, der blev målt i hver opløsning ud fra en stor pulje af mulige strukturer af dimerer, tetramerer og oktaomerer; dvs. komplekser af to, fire og otte enzymer. Resultatet viste, at de forskellige opløsninger med det lange og det afkortede enzym indeholdt alle tre oligomerer.

Hvis man sammenligner fordelingen af oligomerer for de to varianter af enzymet, danner det fulde enzym imidlertid en større pulje af tetramerer end den afkortede version. Den enzymatiske aktivitet blev også testet, hvilket viste, at enzymet i fuld længde har den højeste aktivitet. Tilsammen viser disse data, at enzymets aktive version er tetramerstadiet.

Vores røntgendata muliggjorde også at beregne en tredimen-

Røntgen viser enzymets strukturelle ændringer

Figuren illustrerer, hvordan vi udfører en SAXS røntgenanalyse ved brug af et microfluid-blandingssystem.

Den viste forsøgsopstilling kan bruges til at opnå information om et enzyms strukturelle egenskaber, når man ikke på forhånd kender enzymets strukturelle reaktion på ændringer i opløsningen. Fx kan forandringer i saltkoncentrationen eller ændringer af opløsningens pH få enzymet til at antage en anden rumlig form.

A. Ved analysen blandes enzymet i forskellige opløsninger på en lille chip. Sammensætningen af opløsningerne styres af et computerprogram.

B. Røntgendata viser enzymets struktur i de frisk blandede opløsninger, og de strukturelle informationer registreres automatisk. Den violette linje nederst i figuren illustrerer den røntgenstråle, som gennemlyser prøven og spredes af elektronskyerne omkring atomerne i enzymet. Det cirkulære spredningsmønster afspejler enzymets tredimensionelle struktur.

C. Den indledende automatiserede dataanalyse giver oplysninger om enzymets strukturelle stadie. Disse oplysninger kan blandt andet fortælle, om enzymet er foldet i sin funktionelle tredimensionelle form, eller om det er udfoldet som en lang perlekæde af aminosyrer. I sidste tilfælde er enzymet sandsynligvis inaktivt. Oplysningerne kan også angive, om et enzym danner større komplekser med flere eksemplarer af enzymet, når det arbejder. Det kan fx være dimerer, hvor to enzymer tilsammen udfører funktionen, eller tetramerer, hvor det aktive kompleks er opbygget af fire enzymer. Disse oligomere stadier har betydning for, hvor enzymatisk aktivt glutaminase C er.

D. Sammensætningen af de efterfølgende opløsninger beregnes automatisk ud fra resultaterne af de indledende analyser. Intelligente algoritmer – symboliseret med en hjerne på figuren – evaluerer resultaterne og beslutter selv, hvordan forsøgene fortsættes.

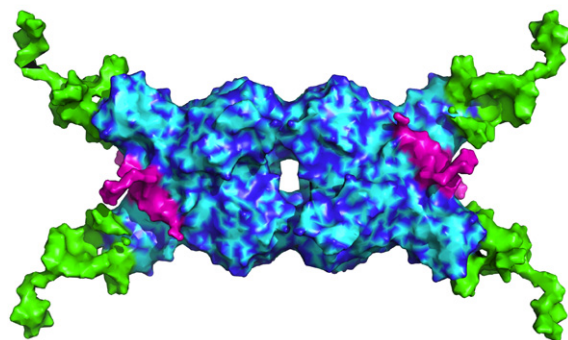
E. Hvis det lykkes at fremstille en opløsning, hvor enzymet opfører sig på en interessant måde, kan man ved videre analyse af de målte røntgendata generere en tredimensionel struktur af enzymets overflade.

sionel struktur af glutaminase C tetrameren. En del af strukturen er tidligere bestemt på atomart niveau, men vi er de første til at præsentere en struktur, der inkluderer begge endestykker i enzymet; den C-terminale ende og den N-terminale ende.

Optimering af lægemiddelstoffer

Alle disse nye informationer om det kræftspecifikke enzyms oligomere struktur kan nu danne basis for nye strategier for fremtidens lægemiddeludvikling. Vores undersøgelser viser, at det er tetramerstadiet, som kan omdanne glutamat til glutamin og derved sørge for dannelsen af brændstoffet ATP i kræftceller. Denne information kan bruges til at forøge virkningen af lægemiddelstoffet #968 eller til at designe helt nye lægemidler.

Vores analyse viser, at hvis man blokerer for enzymets mulighed for at danne en tetramer, blokerer man også dets aktivitet. Det er uvist præcist, hvor lægemiddelstoffet #968 binder til enzymet, men tidligere analyser indikerer, at det binder til den flade på enzymerne, hvor tetramererne formes. Vores resultater er med til at bekræfte de tidligere resultater, og man kan ud fra denne information prøve at optimere molekylets binding til tetrameriseringsfladen. Den nye information om kræftenzymets aktive oligomere form kan også bruges til specifikt at designe helt nye molekyler, der binder til denne flade. ■



Her ses strukturen af en tetramer af glutaminase C; en tetramer består af fire eksemplarer af enzymet, som til sammen danner det aktive kompleks. Strukturen af den blå del af enzymet er tidligere blevet bestemt på atomart niveau, men vi er de første til at præsentere en struktur, der både inkluderer den første del af proteinkæden (grøn) og endestykket af proteinkæden (pink)

Illustration: Forfatterne

Biologiske lægemidler – fra molekyle til medicin

Biologiske lægemidler, som er baseret på peptider, proteiner og nukleinsyrer, bruges i stigende grad til at behandle kroniske sygdomme og lidelser. Biologiske lægemiddelstoffer er ofte meget potente og virksomme i små doser, men det er alligevel en stor udfordring at formulere lægemidlerne på en måde, så de aktive stoffer kan passere kroppens barrierer og nå frem til virkningsstedet i tilstrækkelig store mængder.

Forfattere

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

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

Ph.d. Lene Jørgensen er lektor på Institut for Farmaci.

Ph.d. Sven Frøkjær er professor på Institut for Farmaci og prodekan på det Sundhedsvidenskabelige Fakultet.

Biologiske lægemidler – eller biopharmaceuticals på engelsk – er baseret på lægemiddelstoffer, der har udspring i biologisk materiale som peptider, proteiner og nukleinsyrer. De biologiske lægemidler udgør en voksende del af de stoffer, som bruges til behandling af alvorlige kroniske sygdomme og lidelser. Stofferne kan fx afhjælpe mangel på bestemte proteiner i kroppen og på den måde være med til at opretholde livsvigtige funktioner. Gennem de seneste år har biologiske lægemidler udgjort mellem 15-30 procent af alle nye godkendte lægemidler i USA, og rent økonomisk udgør stofgruppen 40-60 procent af de lægemidler, som forventes at blive blockbusters. Det vil sige medicin, hvor den årlige omsætning overstiger en milliard dollars.

En forudsætning for udvikling af nye biologiske lægemidler er, at de kan fremstilles i en form, som kan doseres til patienten og nå frem til virkningsstedet i kroppen. Det er ofte en udfordring, fordi store biologiske molekyler som proteiner kun i ringe grad er i stand til at passere biologiske membraner som tarmvæggen, og derfor må langt de fleste biologiske lægemidler injiceres. I de senere år er der imidlertid kommet et stigende fokus på muligheden for anvendelse af andre administrationsveje. Et eksempel er udvikling af insulin på tabletform, som medicinalindustrien for tiden investerer store summer i. Det er dog stadig en kæmpe udfordring at designe formuleringer af biologiske lægemiddelstoffer, som kan stabilisere de komplekse biomolekyler, så de ikke nedbrydes

i maven, tarmene eller i blodet, og samtidig øge deres evne til at passere gennem biologiske membraner.

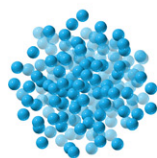
Potente, store og hydrofile molekyler

Mange biologiske lægemidler er baseret på terapeutiske proteiner og de mindre peptider, som begge består af aminosyrer som byggesten. Disse lægemidler anvendes primært som substitutionsterapi, hvor lægemiddelstoffet erstatter et naturligt forekommende, men manglende, peptid eller protein i kroppen eller supplerer et for lavt niveau af det pågældende peptid eller protein. Nogle eksempler på dette er væksthormon, insulin og erythropoetin (EPO), som bruges til behandling af henholdsvis dværgvækst, insulinmangel og blodmangel. Det samme gælder for koagulationsfaktorer, som er livsvigtige biologiske lægemidler til behandling af patienter med bløderilidelser. Andre typer af biologiske lægemidler er antistoffer, der anvendes til behandling af kræft, knogleskørhed og urinsyreigt, samt antigener, eller mindre fragmenter heraf, som stimulerer immunsystemet ved vaccinationer. Nukleinsyre-baserede stoffer, som benyttes til forskellige former for gentterapi, er ligeledes en vigtig stofgruppe.

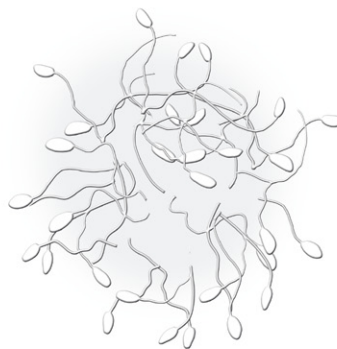
Fælles for de biologiske lægemiddelstoffer er, at de generelt er store molekyler, og at deres rumlige tredimensionelle struktur har stor betydning for deres effekt. Til gengæld er stofferne ofte yderst potente, hvilket betyder, at den mængde, der skal til for at opnå den ønskede virkning, ikke er ret stor. Alligevel er det en stor udfordring at fremstille lægemiddelstofferne og dernæst formulere lægemidler, som gør lægemiddelstoffet i stand til at nå frem til virkningsstedet i kroppen.

Modificering af biologiske lægemidler

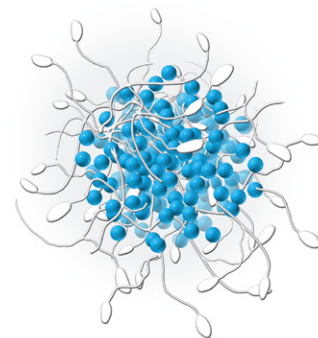
Nye avancerede metoder til kemisk syntese eller modifikation af store molekyler, som i sig selv er terapeutisk aktive, har resulteret i mange nye potente lægemiddelstoffer. Faktisk er kemisk syntese blevet så effektiv, at det ikke bare er muligt, men også økonomisk fordelagtigt at fremstille peptider med en molekylvægt på op til ca. 3000 Dalton ved syntese. Dermed er kemisk syntese blevet et reelt alternativ til genteknologi, når det gælder fremstilling af små peptidlægemiddelstoffer. Et eksempel er antimikrobielle peptider til bekæmpelse af sygdomsfremkaldende bakterier, som har udviklet resistens imod traditionelle antibiotika som penicillin. Pro-



Insulin



Kompleksdannende
hjælpstof



Drug delivery system
(kompleks)

Oral administration af fx. insulin kræver brug af hjælpestoffer og avancerede formuleringsmetoder. De molekulære strukturer af insulin (model t.v.) og hjælpestoffet (midt) har betydning for interaktionen mellem stofferne. Hjælpstoffet er en hydrofil polymer. Ved at optimere forholdet mellem det biologiske lægemiddelstof og hjælpestoffet (t.h.) kan man opnå små partikulære strukturer, som er bedre end insulin alene til at tåle det barske miljø i mave-tarmsystemet. Foreløbige resultater tyder på, at sådanne komplekser kan lede til den ønskede effekt på glukoseniveauet i blodet hos forsøgsdyr. Credits: Henning Dalhoff

teiner som insulin med en molekylvægt på ca. 5800 Dalton eller blødermedicin som faktor VIII med en molekylvægt på omkring 330.000 Dalton må dog fortsat produceres i gensplejede gærceller eller pattedyrsceller.

I mange tilfælde kan man opnå en række fordele ved at udnytte mulighederne for kemisk at stabilisere molekylet eller give det egenskaber, så det bedre kan trænge igennem de vigtigste barrierer i kroppen, fx tarmvæggen, og derved opnå en god terapeutisk effekt. Det virksomme molekyle kan også modificeres med henblik på at optimere stabiliteten under produktion og ved opbevaring af det færdige lægemiddel.

Ligeledes åbner kemisk modifikation mulighed for at forbedre effekten af lægemiddelstoffet efter administration til patienten via injektion. Det er således muligt at øge proteiners cirkulationstid i blodet ved at hæfte en fedtsyrehale på molekylet. Herved kan man opnå en forlænget effekt, fx ved at lægemiddelstoffet binder sig til proteiner i blodplasma og derved danner et depot, hvorfra stoffet frigives gradvist over tid. Dette er vigtigt ved mange former for substitutionsterapi, hvor målet er at opretholde en bestemt og konstant koncentration af et peptid eller protein i kroppen ved indtagelse af en eller nogle få doser i døgnet. Metoden med påhæftning af fedtsyrehaler udnyttes fx af Novo Nordisk A/S i den langtidsvirkende insulinanalogue Levemir®.

Sådanne modifikationer kan dog resultere i, at lægemiddelstoffet bliver mindre potent, hvis man alene ser på interaktionen med den relevante receptor i kroppen. Men på grund af de nye egenskaber kan det være fordelagtigt at gå på kompromis med dette, hvis lægemidlet overordnet set virker bedre.

Drug delivery – vejen til virkningsstedet

Når man har udviklet et aktivt biologisk lægemiddelstof, er det næste trin at formulere et lægemiddel, som gør lægemiddelstoffet i stand til at nå frem til virkningsstedet i kroppen. Her er det essentielt at forstå det aktive molekyles egenskaber og de biologiske barrierer, som stoffet møder, inden det når frem til sit mål. Desuden er det især vigtigt at erkende, at netop for biologiske lægemiddelstoffer kan man ikke forvente, at en optimal design-løsning for ét aktivt molekyle også kan bruges til et andet molekyle af næsten samme størrelse, hvis dette molekyle har en helt anden tredimensionel struktur, der fx er mindre stabil.

Samtidig er det en stor udfordring at designe biologiske lægemidler, som kan indgives til patienter uden injektion. For det første er selv små biologiske lægemiddelstoffer store molekyler sammenlignet med traditionelle kemisk fremstillede lægemiddelstoffer. For det andet indeholder molekylerne ofte mange strukturelle detaljer såsom en høj grad af ionisering, en kompleks tredimensionel struktur eller meget følsomme bindinger, som gør lægemiddelstoffet sårbart overfor kemisk og enzymatisk nedbrydning i kroppen. Derfor er det ofte yderst kompliceret at udvikle en effektiv drug delivery strategi for biologiske lægemiddelstoffer. Gennem vores forskning fokuserer vi derfor på at opnå en detaljeret mekanistisk forståelse for hvordan lægemiddelstoffernes unikke egenskaber kan være afgørende for effekten af hjælpestofferne og de udviklede drug delivery systemer.

En lovende metode til fremstilling af lægemidler til oral administration er at stabilisere det biologiske lægemiddelstof gennem en kompleksdannelse eller ved indkapsling af molekylet i mikropartikler eller nanopartikler. Kemiske modifikationer af det aktive molekyle kan i nogen grad forbedre interaktionen mellem lægemiddelstoffet og hjælpestofferne i nanopartiklerne, så partiklernes egenskaber optimeres til at kunne klare det barske miljø i mave-tarmsystemet bedst muligt. Samtidig kan modifikationen i sig selv øge stoffets stabilitet i tarmvæsken eller fremme diffusionen ind over tarmvæggens slimlag og videre ind gennem cellemembranerne i tarmcellerne. For at opnå et bedre lægemiddel er det afgørende, at alle disse elementer betragtes i en sammenhæng og ikke hver for sig.

Derfor fokuserer vi på at anvende biologisk nedbrydelige og ufarlige hjælpestoffer i kombination med formulerings teknologier, som gør det muligt at udvikle terapeutisk aktive biologiske molekyler til lægemidler, som kan passere tarmslimhinden eller langeslimhinden. På den måde kan lægemidlerne indtages gennem munden eller inhaleres frem for at skulle injiceres. Med netop det formål deltager vi i det Europæiske netværk Collaboration on the Optimization of Macromolecular Pharmaceutical Access to Cellular Targets.

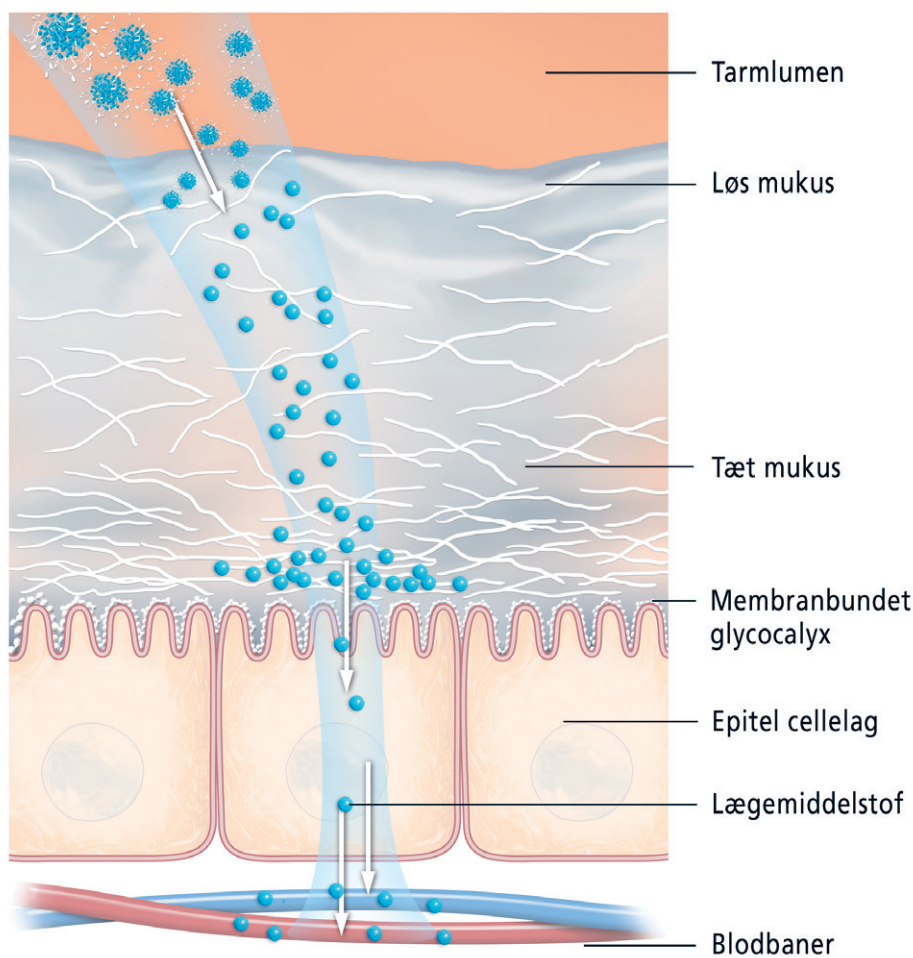
Ind gennem slimhinder

Det er essentielt at have velegnede testmodeller og analytisk ekspertise for at klarlægge, hvordan forskellige hjælpestoffer og

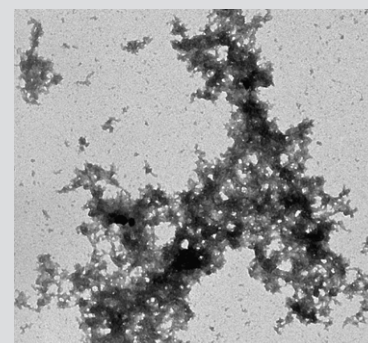
formuleringsstrategier kan medvirke til at forbedre et biologisk lægemiddels evne til at passere slimhinder.

For tiden undersøger vi ved hjælp af et batteri af forskellige testmetoder, om en række transportpeptider og fedtsyre-modifikationer kan bruges til at udvikle biologiske lægemiddelstoffer til brugbare lægemidler til oral administration. Et af de lægemiddelstoffer, som vi undersøger, er insulin, som blandt andet kombineres med polymerer med meget positivt ladede hydrofile områder, der vil kunne interagere med insulins elektronegative overflade såvel som med det mere lipofile indre miljø af molekylet. Ved at optimere forholdet mellem det biologiske lægemiddelstof og hjælpestofferne kan man opnå små partikulære strukturer.

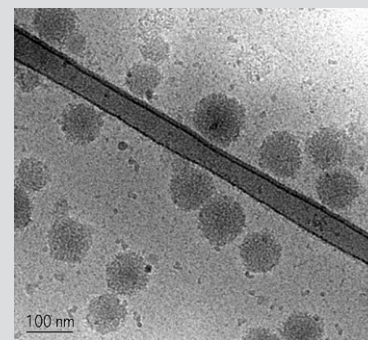
Foreløbige resultater tyder på, at sådanne komplekser kan lede til den ønskede effekt på glukoseniveauet i blodet hos forsøgsdyr. For at kunne optimere yderligere på effekten af drug delivery systemet, er det nødvendigt at opnå et detaljeret kendskab til de bagvedliggende mekanismer, som blandt andet bliver afgørende for, om det aktive biomolekyle kan leveres fra tarmen til blodet. Til dette formål udvikler vi forskellige relevante modeller for tarmslimhinden, så vi i laboratoriet kan teste potentielle biologiske lægemidlers evne til at trænge gennem tarmvæggen og komme ind i blodbanen. ■



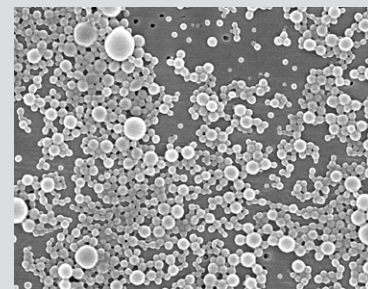
En model af tarmslimhinden bruges til at undersøge, om de eksperimentelle partikulære lægemidler kan passere gennem slimhinden. Tarmslimhinden består af et slimlag ovenpå et tæt monolag af epitelceller understøttet af en membran, der adskiller slimhinden fra det underliggende væv. På overfladen af epitelcellerne findes glycocalyx molekyler, der er med til at binde et komplekst viskøst netværk af glycoproteiner til epitelet. Det tætte lag af glycoproteiner dækkes af et mere løst lag af glycoproteiner og andre komponenter. Alt i alt udgør slimhinden således en fysisk, men dynamisk barriere, der kan være vanskelig at trænge igennem for biologiske lægemiddelstoffer. Illustration: Henning Dalhoff



A



B



C

Eksempel på hvordan forskellige hjælpestoffer og formuleringsprocesser har indflydelse på udseendet af lægemidler. Billederne viser mikroskopisk forstørrelse af tre forskellige formuleringer, der makroskopisk alle ligner vandige opløsninger. **A)** viser dannelse af et løst kompleks mellem insulin og små hjælpestoffer, **B)** viser nogle mere uniforme partikler dannet mellem et protein og hydrofile polymerer, mens **C)** viser nogle faste partikler bestående af kun delvist hydrofile polymerer, der indkapsler et biologisk lægemiddelstof. Fotos: Forfatterne

Genmodificerede virusbiblioteker:

Producerer milliarder af potentielle biologiske lægemiddelstoffer

Bakteriofager er vira, der inficerer bakterier. Ved hjælp af genteknologi kan man fremstille biblioteker med milliarder af fager, som hver især præsenterer et bestemt protein, peptid eller antistof på sin overflade. Næste trin er at undersøge, om der blandt alle de udstillede biomolekyler er et stof, som binder sig til den receptor, det enzym eller det proteinkompleks som skal påvirkes medicinsk. I givet fald kan man være på sporet af et nyt lægemiddelstof.

Forfatter

Ph.d. Brian Lohse er lektor på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Biologiske molekyler som proteiner og peptider spås en stor fremtid som lægemidler, diagnostiske markører og vacciner. Biomolekylerne er meget specifikke overfor de målmolekyler, de skal påvirke medicinsk, hvad enten der er tale om enzymer og receptorer i menneskekroppen eller på sygdomsfremkaldende bakterier, vira eller parasitter. Evnen til selektivt at påvirke de ønskede mål åbner op for udvikling af lægemidler med et minimum af bivirkninger.

Proteiner er opbygget af peptider, som svarer til korte fragmenter af proteiner. Peptiderne består af kæder af aminosyrer, og rækkefølgen af aminosyrerne er vigtig for den biologiske aktivitet. Proteiner i alle levende organismer er opbygget af 20 forskellige essentielle aminosyrer, som kan sættes sammen på et nærmest uendeligt antal måder. Derfor er det mildt sagt ikke let at finde netop det specifikke peptid, som kan påvirke en given receptor eller et enzym på den ønskede måde. Det er baggrunden for, at vi arbejder med en kraftfuld metode, som kan fremstille biblioteker med milliarder af forskellige peptider eller antistoffer.

Teknikken kaldes fag display. Bakteriofager – eller blot fager – er vira, som inficerer bakterier. Biblioteket fremstilles ved at gensplejse fager, så de udover at fremstille deres egne proteiner også danner et ekstra proteinmolekyle såsom et antistof eller et peptid, som de præsenterer på deres overflade. Sammensætningen og antallet af aminosyrer i det udstillede proteinmolekyle kan styres ved hjælp af den DNA-sekvens, som indsættes i fagen. Biblioteket fremstilles ved at indføre et stort antal forskellige gensekvenser i forskellige fager, hvorpå de gensplejsede vira opformerer i bakterier, som fagerne naturligt inficerer, fx tarmbakterien *E. coli*.

Fag-biblioteket kan nu bruges til at teste, om et eller flere af de udstillede proteiner eller peptider binder til den ønskede receptor. Når det er tilfældet, kan man være på sporet af et potentielt lægemiddelstof – eller af en biomarkør, som kan mærkes med et fluorescerende stof og bruges til diagnostik eller forskning ved hjælp af billeddannende metoder.

Mange anvendelsesmuligheder

Fag display teknologien blev introduceret i 1985 af George Smith. Han fremstillede gensplejsede fager, der udtrykte fremmede aminosyresekvenser, som kunne binde et antistof til sig. Siden da er der opbygget et stort antal biblioteker af fager, som præsenterer fremmede peptider og proteiner på deres overflader, og der er sideløbende blevet udviklet en række metoder til screening af bibliotekerne. Fag display teknologien har haft en positiv effekt indenfor immunologi, cellebiologi og farmakologi samt indenfor opdagelse af nye lægemiddelstoffer, hvilket primært er det område, som vi arbejder med i vores forskningsgruppe EpiDiscovery.

En særlig gruppe af proteiner er antistoffer, som spiller en central rolle i immunforsvaret ved at genkende sygdomsfremkaldende

A. Grafisk fremstilling af fagen M13, som vi bruger til at fremstille peptid-biblioteker og antistof-biblioteker. Det gøres ved at indsætte tilfældige DNA-sekvenser i et stort antal fager. De indsatte DNA-sekvenser koder for en masse forskellige peptider. Nederst på fagen ses proteinet pIII (grønne kugler). Det er på overfladen af dette protein, at de fremmede peptider eller antistoffer dannes og præsenteres.

B. Målmolekylet (sorte kugler), som vi ønsker at påvirke medicinsk, immobiliseres i brønde i bunden af pladen. Derefter tilføres fag-biblioteket.

C. Kun fager, der har dannet et bindende peptid (lyserøde kugler) på overfladen af pIII proteinet, bindes til målmolekylet. De øvrige fager vaskes væk under den efterfølgende oprensning.

D. Ved at sænke pH i brønden frigøres de bundne fager, hvorefter de isoleres og opformeres. Derpå gentages processen som i trin B, indtil man har en stærk binding.

E. Fagerne, som findes i høj koncentration i bunden af skålen, suges op i pipetten. Efter en opkoncentrering sekventeres deres genom inklusive den indsatte DNA-sekvens. På den måde får vi den præcise genetiske opskrift på det bindende peptid, som nu kan syntetiseres i laboratoriet via peptidkemi. Derpå kan peptidets farmakologiske egenskaber undersøges i forskellige testsystemer, fx et inhibitions assay, som kan vise, om peptidet er i stand til at hæmme målmolekylets biologiske aktivitet.

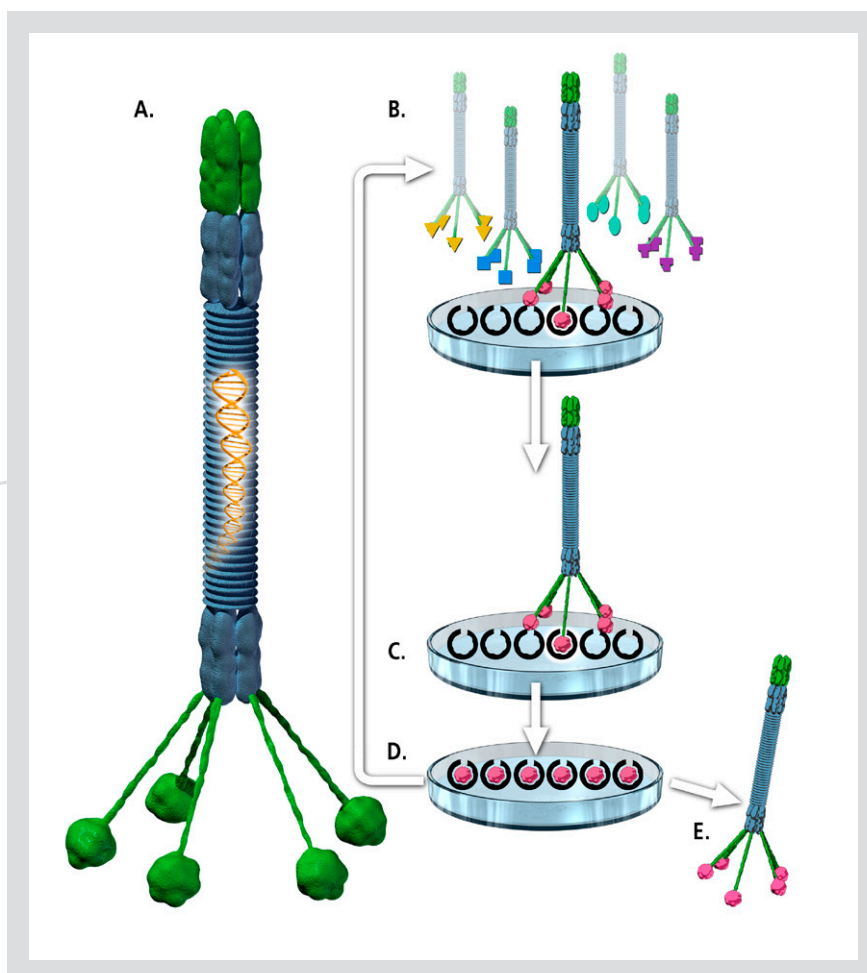


Illustration: Henning Dalhoff

mikroorganismer. På verdensplan er den største medicinske og kommercielle succes, som er opnået ved brug af fag display, fremstillingen af et humant monoklonalt antistof kaldet Adalimumab, der specifikt binder sig til og inaktiverer tumor necrosis factor. Dette stof starter det uønskede inflammatoriske respons i autoimmune sygdomme som astma, gigt og psoriasis, hvor immunforsvaret går galt i byen og angriber kroppens egne celler. Det monoklonale antistof reducerer inflammationen og lindrer sygdommens symptomer ved at hæmme aktiviteten af tumor necrosis factor. Antistoffet, der markedsføres af det amerikanske firma Abbott Laboratories, sælges i penne, som bruges til injektion. Salget indbragte 9,3 milliarder dollars i 2012.

Fag display metoden kan også bruges til at opdage biologisk aktive proteiner og peptider, som kan nedkæmpe sygdomsfremkaldende mikroorganismer, eller antistoffer, som kan benyttes som vacciner. Desuden kan metoden anvendes til at finde modgifte imod biologiske toksiner som fx slangegift. I sidst nævnte tilfælde leder man efter peptider eller antistoffer, som binder sig til giftmolekylerne og inaktiverer dem.

Teknologien bag fag display

Der findes adskillige typer af fager, som er velegnede som værktøjer i fag display, og hver af dem har fordele og ulemper set i forhold til de applikationer, man er på jagt efter. Fx er den såkaldte Ff-familie af fager fremragende kloningsværktøjer, fordi deres størrelse ikke er fastlåst igennem deres DNA. Man kan derfor inkorporere lange fremmede DNA-sekvenser i deres genom blot ved at forlænge genomet.

Når man skal opbygge et fag display bibliotek til et givet formål, er det første trin at identificere det målmolekyle, som man

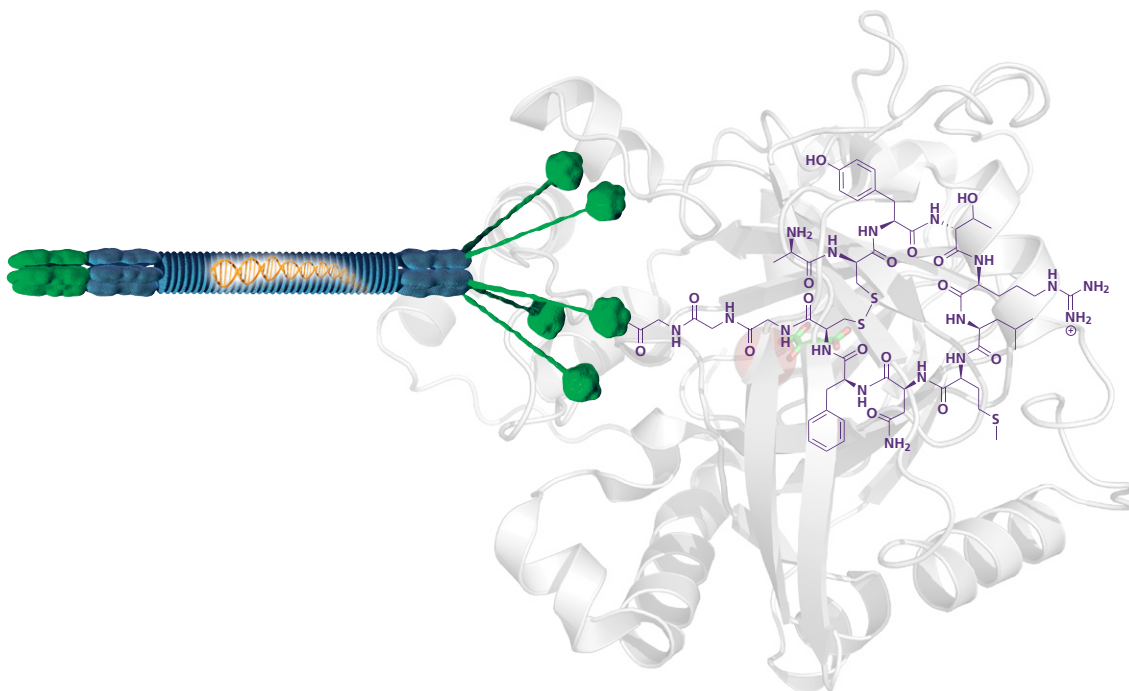
ønsker at påvirke medicinsk. Målet kan være hvilket som helst molekyle i kroppen eller i en sygdomsfremkaldende mikroorganisme; enzymer, proteiner, receptorer i cellemembranerne eller sågar hele celler.

Biblioteket fremstilles ved at indsætte fremmede DNA-fragmenter i fager, som udtrykker deres proteiner på overfladen af viruspartiklen. I forlængelsen af den DNA sekvens, som koder for fagens eget overfladeprotein, indsættes en tilfældig rækkefølge af genetiske bogstaver, som koder for tilfældige aminosyrer. Desuden indsættes en lille bro kaldet en linker, fx et antal af aminosyren glycine. Broen adskiller fagens eget overfladeprotein fra det fremmede peptid eller antistof, som fagen nu præsenterer på overfladen. Vi bruger især fagen M13, som har fem proteiner på overfladen, og på disse fem proteiner kan der udtrykkes et fremmed proteinmolekyle.

På jagt efter lægemiddelstoffer

En klar fordel ved fag-biblioteker er den enorme diversitet af forskellige proteiner, peptider, antistoffer eller fragmenter af antistoffer, som kan udtrykkes på viruspartiklernes overflader. For eksempel findes der antistof-biblioteker med 10 milliarder forskellige antistoffer, og det samme gælder for biblioteker med peptider. Fag display er yderst fleksibelt og kan modificeres, så biblioteket kan tilpasses til stort set et hvilket som helst målmolekyle. Frem for at syntetisere sig frem til et potentielt lægemiddelstof, fx et lille organisk molekyle eller et mindre peptid, kan man her som en grov tommelfinger regel screene milliarder af peptider på få uger.

Som nævnt arbejder vi med adskillige typer af fag display biblioteker, men her vil vi kun præsentere, hvordan vi bruger peptid-biblioteker i jagten på nye lægemiddelstoffer. Vi har for



Figuren viser et cyklisk peptid, som er præsenteret på fagens pIII protein. Cykliske peptider er typisk mere stabile end lineære peptider og derfor velegnede som lægemiddelstoffer. Illustration: Henning Dalhoff, Sune Kliborg og forfatterne (3D)

nylig fundet et cyklisk peptid, som binder og inhiberer et enzym kaldet KDM4C, som udtrykkes i meget høj grad i kræftceller; fx ved brystkræft eller prostatakræft. Enzymet er derfor et muligt mål for nye lægemidler, som selektivt kan slå kræftcellerne ihjel.

Første trin i vore undersøgelser er at dække bunden af brøndene i en testplade med enzymet. Herefter tilsættes et eller flere forskellige biblioteker af gensplejsede fager. Flertallet af de peptider, som fagerne præsenterer, vil ikke være i stand til at binde til det kræftrelaterede enzym, og de vaskes væk, når brønden skylles ren. Men hvis et af peptiderne binder sig til enzymet, bliver fagen med det pågældende peptid hængende på enzymet i brønden. På den måde fandt vi et stabilt cyklisk peptid, som selektivt hæmmer enzymet. Derpå isolerede vi den bindende fag og sekventerede dens genom, hvorved vi kunne bestemme rækkefølgen af de genetiske bogstaver i den indsatte DNA-sekvens. Det svarer til at aflæse strekkoden på en vare i supermarkedet.

Peptid hæmmer et kræftrelateret enzym

Ved at afkode DNA-sekvensen får vi kendskab til sammensætningen og rækkefølgen af den kæde af aminosyrer, som de indsatte gener koder for, og så kunne vi selv syntetisere peptidet og teste dets biologiske aktivitet i laboratoriet. Peptidet kaldes BL151, og vi har efterfølgende modificeret det lidt, så det hæmmer det kræftrelaterede enzym bedre. Andre modifikationer gør peptidet i stand til at trænge igennem cellemembraner, og i den kommende tid vil vi teste peptidet i en cellelinje med kræftceller for at afklare, om det kan slå kræftcellerne ihjel. Vi vil også udføre toksikologiske studier for at verificere, at peptidet ikke har giftvirkninger på raske celler.

Hvis undersøgelserne opfylder vore forhåbninger, har vi ved hjælp af fag-biblioteket skabt et godt udgangspunkt for udvikling af et virksomt lægemiddelstof mod fx brystkræft eller prostatakræft. Her vil man typisk starte med at opklare, hvordan kæden af aminosyrer er foldet og danner en bestemt rumlig form, når peptidet binder til enzymet. Netop peptidets rumlige facon er afgørende for dets biologiske aktivitet, og kendskabet til den tredimensionelle struktur åbner mulighed for at designe modificerede peptider, som er endnu bedre til at sætte enzymet ud af spillet i kræftceller.

Diagnostiske biomarkører

Selv om man finder et peptid, som binder specifikt til det kræftrelaterede enzym, er der ingen garanti for, at peptidet som BL151 er i stand til at hæmme enzymets aktivitet. Men anstrengelserne behøver ikke at være spildte af den grund!

Fx kan peptider, der binder specifikt, men ikke ændrer ved enzymets egenskaber, mærkes med fluorescerende farvestoffer eller radioaktive isotoper og bruges som biomarkører. Det åbner mulighed for at undersøge enzymets aktivitet i kræftceller med forskellige billeddannende teknikker, eller for at bruge det mærkede peptid som et diagnostisk værktøj til at påvise kræft, forhåbentligt på et tidligt stadium. ■

NMR: En drøm for tekniknørder

NMR-scannere er meget alsidige forskningsværktøjer og baseret på en avanceret teknologi. På Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi råder vi over et veludrustet NMR-laboratorium, hvor vi går på jagt efter nye potentielle lægemiddelstoffer.

Forfattere

Ph.d. Nils Nyberg, NMR & MS Manager ved Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Ph.d. Sileshi G. Wubshet er postdoc på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

I 1980'erne så jeg den amerikanske tv-serie Star-Trek med fornøjelse, og jeg bemærkede alle de gadgets, personalet på rumskibet Enterprise brugte. Især strålevåbnene var interessante for en ung tekniknørd, men der var også et lille håndholdt apparat, tricorderen, som blev benyttet til at scanne både levende og døde ting. Med en fejende bevægelse hen over objektet fandt Dr. McCoy "Bones" på stedet ud af alt, hvad der var værd at vide om genstandens eller personens aktuelle tilstand: Brækkede ben, forgiftninger, kemisk indhold og besættelse af onde ånder.

Heldigvis findes der ingen krav om, at teknisk udstyr i science-fiction serier skal kunne realiseres – ikke engang i fremtiden – men mit gæt er, at instrumentet meget vel kunne have været baseret på principperne bag NMR, kernemagnetisk resonans, fordi NMR-scannere ganske som tricorderen har mange forskellige anvendelsesområder. Samtidig opfylder virkelighedens scanner alle teknik-

nørdens forventninger. Ganske vist er ydersiden intetsigende, men indeni er den magnetiske scanner fuld af avanceret teknologi.

Et kig ind i scanneren

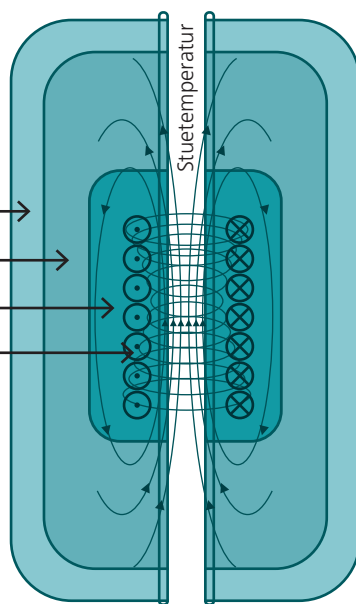
Et NMR-instrument ligner en kæmpemæssig termokande, typisk to meter høj og en meter i diameter, med tre kraftige ben og nogle rør på oversiden. Beholderen indeholder flere tanke, der er monteret indeni hinanden som i en russisk dukke, og i midt inde i scanneren er det et hult rør, som går fra toppen til bunden.

Den inderste tank omgiver en elektromagnet, der består af en spole med en flere kilometer lang ledning af et materiale, som er superledende ved ekstremt lave temperaturer. Spolen er nedkølet med flydende helium, som er det koldeste medium, der findes – kun fire grader over det absolutte nulpunkt på minus 273 °C. Fordelen ved denne type elektromagnet er, at den ikke er afhængig af strømtilførsel. Når den superledende spole en gang er opladet med elektroner, bliver strømmen ved med at cirkulere i spolen, fordi der ikke er nogen elektrisk modstand. Det dannede magnetfelt er statisk, homogent og meget kraftfuldt, specielt i det vertikale rør midt i apparatet, hvor kemiske prøver kan placeres. Selve prøven er ikke nedkølet i flydende helium og kan undersøges ved stuetemperatur.

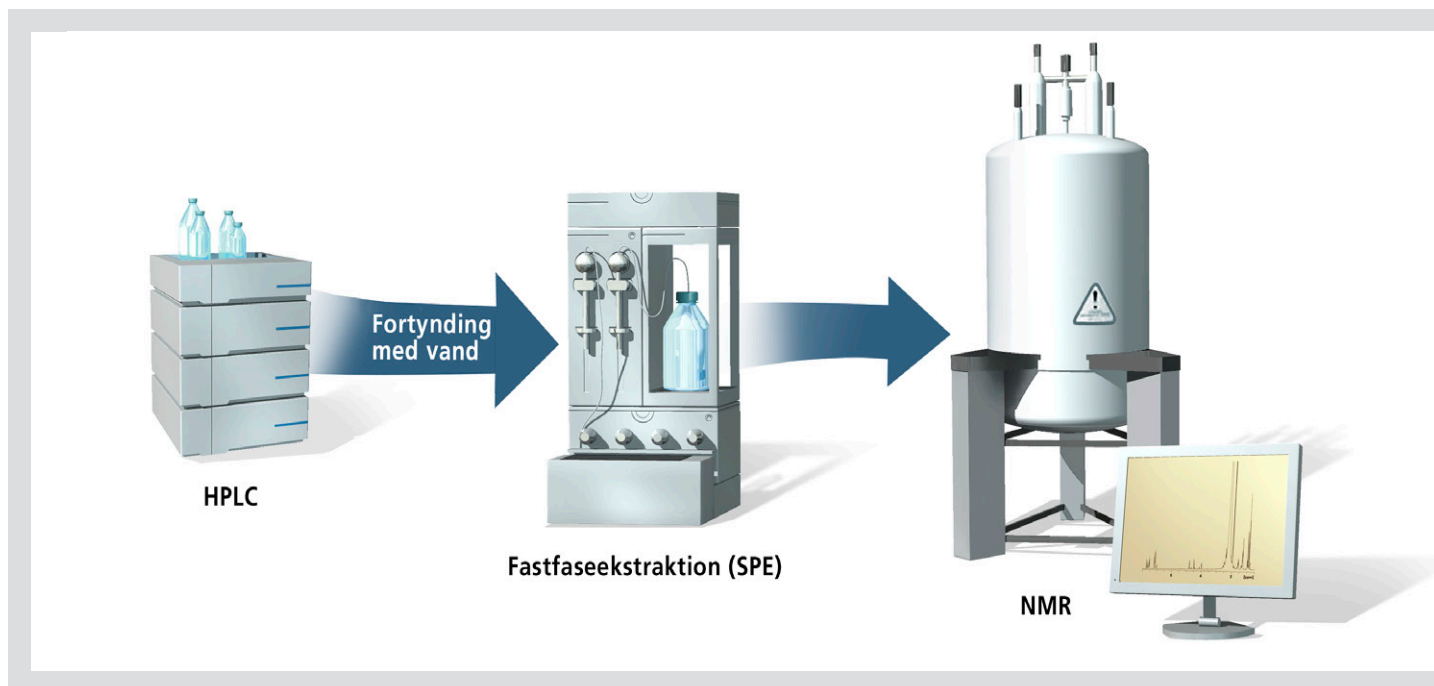
Ulempen ved den superledende teknologi er, at helium er meget kostbart, og derfor er heliumtanken omgivet af en tank med flydende kvælstof for at minimere fordampningen af helium. Flydende kvælstof, som har en temperatur på minus 196 °C, koster det samme som mælk, mens flydende helium koster lige så meget

En superledende NMR-magnet

- Vakum og isolation
- Flydende kvælstof, -196 °C
- Flydende helium, -269 °C (4.2K)
- Superledende spole



Fotoet til højre viser en 600 MHz NMR-apparat på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi. Foto: Birgitte Ruste, ILF. Til venstre ses en skematisk tegning af scanneren. Illustration: Sune Kliborg



Find, oprens og identificer! Sådan går vi på jagt efter farmaceutisk interessante stoffer i komplekse ekstrakter; fx indholdsstofferne i en plante. Stofferne adskilles fra hinanden med væskechromatografi (HPLC), de udvalgte stoffer oprenses og opkoncentreres ved hjælp af fast-fase-ekstraktion (SPE), og til sidst analyseres de i NMR-scanneren. Illustration: Henning Dalhoff

som en vellagret flaske single-malt whisky indkøbt i Sverige. Disse superkolde væsker skal påfyldes med jævne mellemrum for at erstatte de fordampede mængder, for ellers ophører superledningen i magnetspolen. Hvis det sker, vil den stærke strøm pludseligt møde elektrisk modstand, og så frigives energien i form af varme, hvilket kan resultere i en eksplosion.

Udover den store superledende spole findes der mindre spoler omkring prøven i røret. Disse spoler virker som antenner og udsender ultrakorte pulser af radiobølger, som rammer prøven. Når pulsene slukkes, kan de små spoler fornemme et svagt ekko fra prøven, som indspilles flere tusinde gange i sekundet. Ekkoet indeholder information om prøven, og processen gentages flere gange for at forstærke signalet. For at fortolke det indspillede signal omregnes det til et spektrum, og på den måde kan vi finde ud af, hvilke frekvenser der gemmer sig i ekkoet. På et moderne NMR-instrument udføres analysen automatisk: Prøven, som er opløst i et egnet opløsningsmiddel, leveres til en lille robot, som flytter den ind i målekammeret, og efter nogle få minutter er spektret udskrevet.

I korte træk er NMR-scanneren altså en kombination af en meget stærk magnet, radioforstærkere og radiomodtagere. Forkortelsen står for Nuclear Magnetic Resonance, og i princippet er der tale om den samme type instrument, som på sygehuse kaldes for MRI-scannere, der står for Magnetic Resonance Imaging. Brugen af forkortelserne skyldes, at mange mennesker i modsætning til fiktionens frygtløse Kaptajn Kirk nødig vil stoppes ind i en maskine, som hedder noget med Nuclear. Men faktisk er det lige præcis dette ord, som er kendetegnende med teknikken. Signalet kommer nemlig fra det inderste af atomerne og molekylerne i prøven – atomkernerne.

Ser magnetiske atomkerner

Det er kun de typer af atomkerner, som er magnetiske, scanneren kan observere. Måske tænker du på, at jern er magnetisk, men det er ikke denne type magnetisme, der er tale om. Alle atomkerner med et ulige antal neutroner eller et ulige antal protoner har det, som fysikerne kalder for et magnetisk moment, og det er

disse atomkerner, som er NMR-aktive. Den vigtigste kerne er brint (^1H), som består af kun én proton. Denne kerne er vigtig, fordi de fleste organiske forbindelser indeholder brint, og brint er samtidig den atomkerne, som kan detekteres i de mindste mængder. Det indebærer, at NMR er en noget nær universel detektor for organiske stoffer.

En anden kerne, som tit bliver analyseret med NMR er kulstof-13 (^{13}C), som har én ekstra neutron sammenlignet med den almindeligt kulstof-12 (^{12}C). Desværre er kulstof-13 sjælden, og i naturligt materiale er det kun en procent af alle kulstofatomerne, som er den tunge magnetiske variant. Sammen med det faktum, at kulstof-13 har et lavt magnetisk moment, medfører den lave forekomst, at ^{13}C -NMR er næsten 6000 gange mindre følsomt end ^1H -NMR. Andre observerbare kerner er fluor-19, nitrogen-15 og deuterium (^2H). De fleste NMR-apparater kan observere flere forskellige typer atomkerner ad gangen ved at variere frekvensen for radiobølgerne.

Der findes to forskellige strategier til at få et pænt spektrum med klare signaler og mindst mulig støj. Den første går ud på at analysere en stor mængde af stoffet, hvis det er tilgængeligt. Den anden strategi er at indsamle NMR-signaler over lang tid – op til flere dage.

Veludrustet NMR-center

Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi er veludrustet med NMR-apparater. Samlet i en rummelig kælder findes det hele fire scannere. Styrken af magneterne måles i MHz, og vi har to 400 MHz og to 600 MHz instrumenter. Tre af dem har automatisk udskiftning af prøver, som gør det muligt at optage spektre hele døgnet, hele ugen og stort set alle dage året rundt.

Som nævnt er NMR nærmest en universel detektor for organiske stoffer, og et af vore højt prioriterede områder er jagten på ukendte naturstoffer, som kan danne udgangspunkt for udvikling af nye lægemiddelstoffer. Naturen rummer et sandt overflodshorn af stoffer med en eller anden form for biologisk aktivitet – ganske enkelt fordi det slet ikke kan betale sig for planter, marine organismer, svampe eller bakterier at fremstille uvirk-

somme stoffer for sjov. Levende organismer har brug for aktive stoffer til deres interne processer og for et arsenal af stoffer, der er rettet imod omverdenen. Det kan fx være giftstoffer, som kan slå konkurrenter ihjel, eller forsvarstoffer, som kan afværge angreb fra andre organismer.

Mange af stofferne produceres kun i meget små mængder. For at finde ud strukturen af et naturstof ved hjælp af NMR har vi typisk brug for mindst 1 mg oprenset stof, og det kan tage lang tid at oprense en tilstrækkelig stor mængde. Derfor arbejder vi med at udvikle NMR-teknikken for at øge følsomheden og derigennem få mulighed for at analysere de små mængder, som det er muligt at fremstille i laboratoriet.

Copenhagen Small-Molecule NMR Centre

Institut for Lægemediadesign og Farmakologi (ILF) er netop blevet vært for Copenhagen Small-Molecule NMR Centre, som er en såkaldt kernefacilitet indenfor NMR. Med en kernefacilitet menes en samling af avanceret udstyr, som ikke ejes af enkelte forskergrupper. Centret er stiftet for at fremme god videnskab, hjælpe med ansøgninger til forskningsfonde, tiltrække ledende forskere på verdensplan, understøtte undervisning på alle niveauer og sikre en effektiv anvendelse af instrumenterne. I øjeblikket har vi to NMR-instrumenter, som kan benyttes af alle fra studerende til professorer med et minimum af oplæring.

Optimering af følsomheden

Ét af vores NMR-apparater er designet til at håndtere meget små prøvevolumener, så vi kan nøjes med kun 30 µL i et rør med en diameter på 1,7 mm. Dette volumen er så lille, at vi bruger en robot udstyret med en tynd nål for at fylde rørene. Disse små rør rummer altså meget lidt materiale, og netop derfor er det vigtigt for detektionen at opkoncentrere prøven så meget som muligt.

De specifikke stoffer fra fx en plante, vi ønsker at undersøge, isolerer vi fra et ekstrakt, hvor komponenterne adskilles fra hinanden ved hjælp af en type væsekromatografi, som kaldes High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). Adskillelsen af stofferne opnås ved at pumpe ekstraktet gennem et rør med et porøst materiale, som i varierende grad fastholder molekyler som følge af deres polaritet. De mest polære molekyler bevæger sig hurtigt gennem røret, mens mindre polære stoffer bremses lidt og kommer senere ud af røret. På den måde adskilles indholdsstofferne i prøven fra hinanden.

Når stofferne kommer ud et ad gangen, opsamles de i små patroner, som er fyldt det samme porøse materiale, hvor stoffet fastholdes på overfladen af porerne. Fordelen ved metoden er, at vi kan gentage processen mange gange for at opkoncentrere et udvalgt stof på patronerne. Når vi vurderer, at mængden er tilstrækkelig, tørres patronerne, og indholdet skylles ud med et opløsningsmiddel. Teknikken kaldes for Solid Phase Extraction (SPE), og den samlede analyseproces kaldes for HPLC–SPE–NMR. Kort fortalt adskilles stofferne ved væsekromatografien, isoleres og opkoncentreres ved fast-fase-ekstraktionen og analyseres i NMR-scanneren.

Følsomheden af NMR-analysen kan desuden øges med en faktor 10 ved at nedkøle de små antenner, som udsender og aflytter

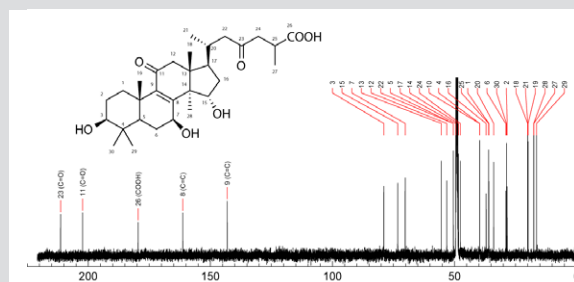
radiopulser, med en kold heliumgas med en temperatur på minus 250 °C. Teknikken, som kaldes for kryogen køling, minimerer den elektroniske støj og gør det muligt at detektere meget svage radiosignaler fra prøven.

Farmakologiske undersøgelser

Med denne type udstyr er det lykkedes at optage ^{13}C -spektre af et stof fra en spiselig svamp, *Ganoderma lucidum*, som er populær i traditionel kinesisk medicin, hvor svampen bruges til at forebygge allergier, gift, kræft og hjertekarsygdomme.

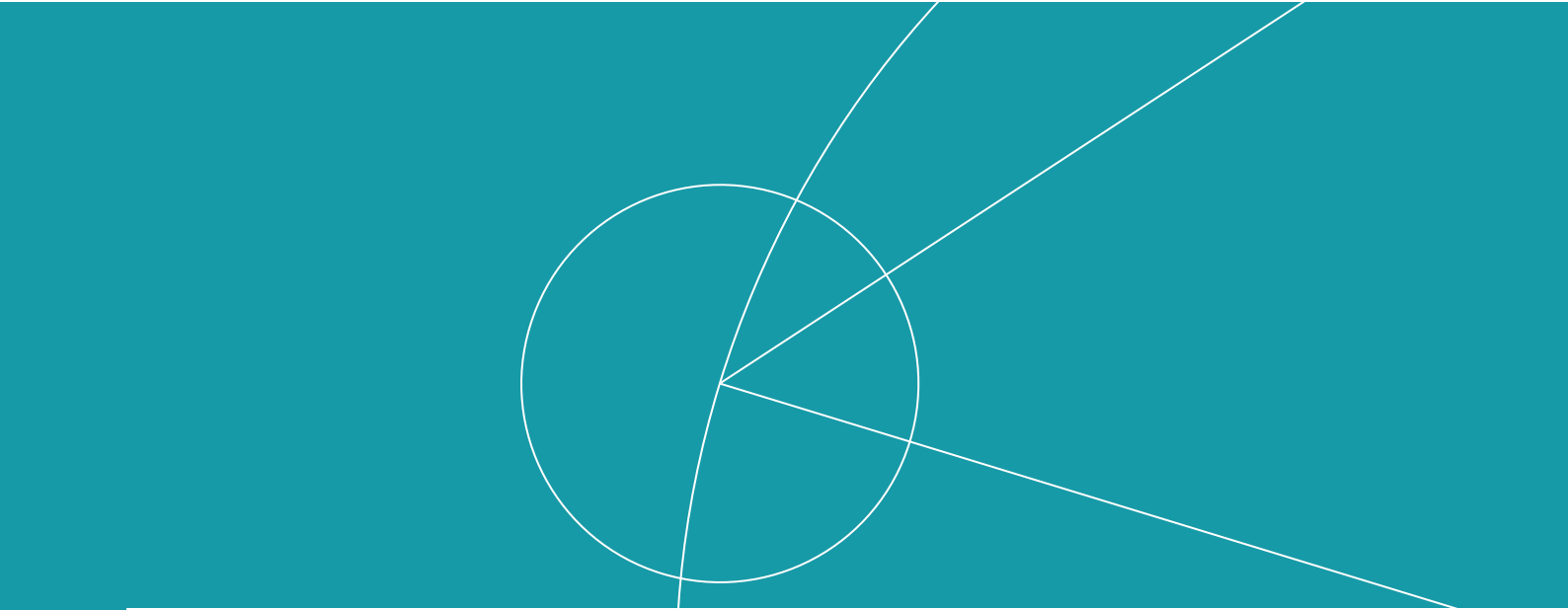
Svampen indeholder bl.a. en type kulstofforbindelser, kaldet triterpener, som blev selektivt ekstraheret og separeret, hvorefter NMR-analysen blev gennemført. Spektret viste, at hvert enkelt kulstof-13 atom i det undersøgte stof udsender sit eget signal, og samtidig er den elektroniske støj så lav, at opløsningen mellem signalerne er meget bedre, end hvad det ellers er muligt at opnå. På den baggrund har vi opklaret den kemiske struktur for et indholdsstof, som er afgørende for den biologiske aktivitet.

Dr. McCoy "Bones" ville næppe have byttet sin fiktive tricorder med virkelighedens NMR laboratorium, men vi tillader os at håbe, at han ville have nikket anerkendende og sagt, at vi er godt på vej, når det gælder om at undersøge naturens store medicinskab og finde nålen i høstakken i form af nye potentielle lægemiddelstoffer. ■



Øverst: Den spiselige svamp *Ganoderma lucidum* er gennem årtusinder blevet brugt i kinesisk folkemedicin. Foto: iStockphoto.com

Nederst: Svampen indeholder bl.a. en gruppe biologisk aktive kulstofforbindelser kaldet triterpener. Her ses et NMR-spektrum fra en kulstof-13 analyse af et triterpen med henblik på at opklare stoffets kemiske struktur. De skarpe toppe repræsenterer individuelle kulstof-13 atomer. På strukturtegningen kan man se, hvor de nummererede kulstof-13 atomer er placeret i molekylet. Illustration: Forfatterne



NMR: En teknik med mange anvendelsesområder

NMR-scannerne kan analysere stoffer i komplekse blandinger, bestemme mængderne af dem og opklare både den kemiske og rumlige struktur af de mest interessante substanser. Vi har for nylig i samarbejde med Sundhedsstyrelsen analyseret forskellige typer kaffe, hvoraf nogle blev indkøbt i udlandet via internettet. Og her gjorde vi et interessant fund.

Forfattere

Ph.d. Nils Nyberg, NMR & MS Manager ved Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Dennis Aslak Olsen er specialestuderende ved Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

NMR-analyser er den mest anvendte metode til at fastslå den kemiske og rumlige struktur af et nyt stof, som syntesekemikere har fremstillet i laboratoriet. Ud fra flere forskellige typer af NMR-spektre er det desuden muligt at vise, om stoffet er rent, og måle præcis, hvor meget af materialet, det er lykkedes at fremstille og oprense. Disse informationer er essentielle for udvikling af nye lægemiddelstoffer, når stoffets biologiske aktivitet efterfølgende skal undersøges i forskellige testsystemer.

Strukturoptælling

For en forsker, som undersøger naturstoffer fra planter, marine organismer, svampe eller bakterier er opgaven tit mere kompliceret end for syntesekemikerne. Her er udgangspunktet et ekstrakt med mange forskellige bestanddele, som er blandet i forskellige mængder, og derfor er det nødvendigt at starte med at adskille stofferne fra hinanden ved hjælp af kromatografi. Når vi selv har syntetiseret et nyt stof, har vi fra starten en klar forventning til strukturen, som vi så kan konfirmere ud fra spektre. Men den fordel har vi sjældent med ukendte naturstoffer. Når NMR-spektrene dukker op på computerskærmen, er vi nødt at stykke forskellige informationer sammen som brikkerne i et puslespil for at finde frem til, hvilket

stof det drejer sig om, og hvordan det er opbygget.

For at fastslå strukturen af et organisk stof er man nødt til at vise, hvordan atomerne er bundet sammen, og det er muligt ud fra NMR-eksperimenter. Her udnytter vi, at der udveksles informationer mellem atomkernerne i molekylet, hvilket sker via elektronerne i de kemiske bindinger. Sammenkoblede elektroner mellem kemisk forbundne naboatomer kan nemlig påvises i NMR-signalerne. På den måde er det muligt at finde ud af, om et ^1H -signal stammer fra et brintatom, som er nabo til et andet brintatom i molekylet. Et brintatom kan på samme måde både påvirke og blive påvirket af signalet fra et kulstof- ^{13}C atom, og når det er tilfældet, kan vi se, at netop de to kerner er bundet sammen. Ved at sammenholde NMR-signalerne fra alle ^1H og ^{13}C atomerne er det muligt at opklare strukturen af det samlede molekyle. Man kan sammenligne med et puslespil, hvor mulige bud på de enkelte brikkers placering vælges eller forkastes, mens man tålmodigt arbejder sig frem imod målet.

Ved analysen kan vi også finde ud af, om to atomer er placeret i nærheden af hinanden, selv om de ikke direkte er bundet sammen af en kemisk binding. Når NMR-maskinen sender radiobølger mod prøven, sparkes magnetiske atomer som brint og kulstof- ^{13}C op i en højere energitilstand, og når radiopulsen ophører, vil de gerne falde tilbage til grundtilstanden – de sætter sig billedlig talt ned i sofaen i stedet for at blive stående ved siden af den. En listig måde at opnå den ønskede hvile på er at overføre den overskydende energi til en nærliggende atomkerne. Dette atomare energibytte kan måles og giver en indikation om, at de to atomer sidder tæt på hinanden.

Ud fra flere forskellige typer af NMR-eksperimenter er det således muligt at drage konklusioner om, hvordan et stof er opbygget og opklare dets rumlige struktur, som er afgørende for stoffets biologiske aktivitet. Da de undersøgte stoffer ikke forbruges eller forandres ved analysen, er det også muligt at følge kemiske reaktioner.

Kvantificering

Det er vigtigt at kvantificere mængderne af de forskellige stoffer i komplekse blandinger, så man kan finde ud af, hvor meget af et farmaceutisk interessant stof, der findes i en prøve. Her er det tit umuligt at bruge en vægt – fx fordi stoffet findes i så små mængder, at en vejning ikke er praktisk, eller fordi der er tale om et organisk stof, som er blandet med salt eller med et opløsningsmiddel, som man ikke ønsker at regne med til vægten.

For de fleste metoder til kvantificering måler man et eller andet respons, fx hvor meget UV-lys af en vis bølglængde, som absorberes af stoffet, hvorpå man sammenligner signalet med signaler fra kendte mængder af stoffet og laver en kalibreringskurve.

Ulempen er at man er nødt til at lave én kalibreringskurve for hvert enkelt stof i blandingen, og hvis man finder et helt nyt og ukendt stof, er det ofte mere interessant at teste stoffets biologiske aktivitet end at bruge det til kvantificering.

NMR har ikke denne ulempe – under specielle betingelser er det muligt at bestemme mængden af stoffet ud fra et NMR-spektrum af et referencestof, som ikke behøver være relateret til det ukendte stof. NMR-signalet gør det nemlig muligt at beregne præcis hvor stor en koncentration, der giver signaler af en vis størrelse. Samtidig udnytter man, at NMR-spektrene indeholder information, som er specifikt relateret til strukturen af det ukendte stof. Derfor kan vi bestemme koncentrationen af et nyt interessant stof på trods af, at stoffet befinder sig i en blanding med flere lignende stoffer.

Afvigende nåle i høstakken

I visse projekter kan udfordringen være, at du har adgang til hundredvis af komplekse prøver. Det er måske blodprøver fra alle cykelrytterne i et cykelløb, urin fra flokke af får som spiser forskellige diæter, eller ekstrakter af alle de forskellige kaffeprodukter, du kan købe. En NMR-analyse af samtlige prøver i en sådan gruppe kan vise, hvordan de er relateret til hinanden. Måske er alle prøverne ens med undtagelse af nogle ganske få, der er anderledes. I den situation kan de afvigende og mærkelige prøver måske fortolkes som dopede cykelryttere, sultne får eller kaffe krydret med illegale stoffer.

NMR-spektre af komplekse blandinger kan analyseres med forskellige statistiske metoder som mønstergenkendelse. Hver prøve resulterer i et spektrum, som ikke kan fortolkes direkte, men kun ved sammenligning med spektrene fra alle de andre prøver. Man kan sige, at NMR bruges til at tegne en profil af prøven, som repræsenterer prøvens samlede indhold. NMR bliver tit brugt til denne type af sammenlignende studier, fordi det er muligt at de-

tektre alle organiske stoffer i en prøve, og fordi signalet fra hvert enkelt stof er direkte korreleret med koncentrationen.

Noget ekstra i kaffen

Ved et netop gennemført specialearbejde, udført i samarbejde med Sundhedsstyrelsen, var målet at finde ud af, om det er muligt at bruge NMR til at undersøge forskellige kaffebaserede produkter, der bl.a. markedsføres som "slankekaffe". En del af produkterne blev købt over internettet og sendt til os med post fra udlandet. Toldmyndighederne var også interesserede, for de gerne vil vide, om kaffen er blandet op med illegale stoffer eller lægemidler, som ikke står på indholdsfortegnelsen. Fordelen ved



Tværsnit af en NMR-scanner. Foto: Tommy Panduro



Så er der kaffe! Vi har analyseret et bjerg af forskellige kaffeprodukter, som både er doneret fra forretninger herhjemme og købt i udlandet over internettet.
Foto: Tommy Panduro

at bruge NMR-analyser til denne type undersøgelser er, at metoden ikke er målrettet mod nogle få stoffer, men fanger dem alle.

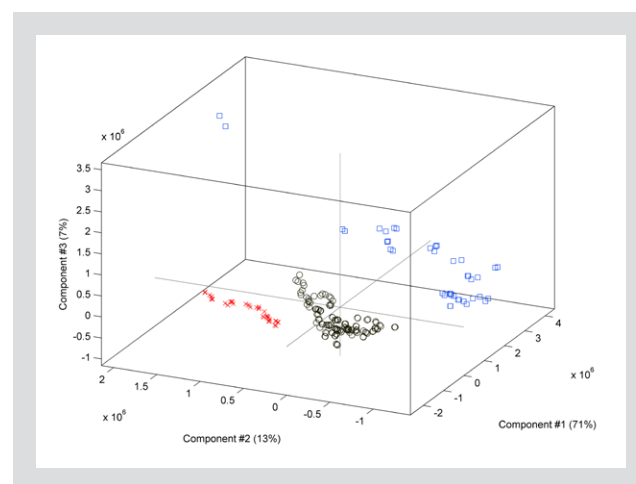
Vi startede med at indsamle forskellige, formodentligt helt legale, kaffeprodukter fra almindelige forretninger i Danmark for at teste, hvordan indholdsstofferne bedst kunne ekstraheres. Ud fra 42 kaffeprodukter bryggede vi kaffe, som blev frysetørret og opløst i en buffer for at fikse pH inden NMR-analysen. Desuden lavede vi NMR-prøver ved at opløse kaffen direkte i bufferen og derpå blot filtrere opløsningen inden analysen. Alle prøverne blev analyseret to gange i instrumentet, og til sidst var det 200 spektre, som var klar til at blive tolket.

Alle disse spektre blev analyseret samlet med en statistisk metode, som kaldes Principal Component Analysis (PCA). Helt kort fortalt svarer metoden til at omregne spektre med tusindvis datapunkter til nogle få værdier, som trods forenklingen beskriver prøven ganske godt. Prøver, som har lignende profiler set med NMR-øjne, placeres nær hinanden i diagrammet, mens prøver med profiler, som adskiller sig fra hinanden, placeres langt fra hinanden.

Konklusionerne fra denne analyse er, at pulverkaffe og almindelig kaffe rent faktisk er forskellige på trods af, at begge kategorierne er frysetørret. De prøver, som ikke blev frysetørret, adskiller sig også fra de frysetørrede, men det skyldes, at en større mængde blev ekstraheret. Overordnet kan man sige, at pulverkaffe adskiller sig fra almindelig kaffe, og at prøveforberedelsen, dvs. hvordan kaffen ekstraheres, er vigtig. Analysen har altså givet mere viden om, hvordan vi kan angribe problemet med at teste kaffe.

Når vi så testede kaffeprodukter, som var købt i udlandet via internettet, udviste disse et fuldstændigt anderledes mønster ved

NMR-analyse. Den store forskel skyldtes, at det var tilsat store mængder sukker, hvilket er mærkeligt med tanke på, at der var tale om såkaldt "slankekaffe". Da vi senere studerede prøverne i detaljer, var det muligt at observere NMR-signaler fra en tilsat amfetaminlignende substans. ■



Plottet viser en statistisk analyse af 200 NMR-spektre af kaffeprodukter. De røde kryds repræsenterer frysetørret pulverkaffe, de sorte ringe repræsenterer frysetørret almindelig kaffe, mens de blå firkanter repræsenterer ekstraheret kaffe, som ikke er frysetørret. Afstanden mellem prøver i plottet er en indikation af hvor ens de er ud fra det, som NMR-apparatet registrerer.
Illustration: Forfatterne

Hvordan afvejer man bedst nytte kontra risiko?

Medicin, som markedsføres i Europa, skal have en positiv benefit-risiko balance, hvor fordelene ved et lægemiddel overstiger ulemperne. Når et firma søger om tilladelse til markedsføring, skal ansøgeren derfor redegøre for balancen mellem nytte og risici for patienterne. Mange dilemmaer er indbygget i vurderingen, og i dag findes der ikke klare regler for, hvilke metoder den farmaceutiske industri skal benytte. Derfor er der nu fokus på udvikling af objektive metoder til vurdering af benefit-risiko balancen.

Forfattere

M.Sc. Berit Nautrup Andersen er specialestuderende i Master of Industrial Drug Development og Head of Safety Operations and Risk Management, ALK A/S.

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

Er et nyt lægemiddel så nyttigt for patienterne, at eventuelle bivirkninger må accepteres? Eller er risikoen for alvorlige bivirkninger så stor, at lægemidlet ikke bør markedsføres, selv om det rent faktisk kan hjælpe nogle patienter? Den vurdering indeholder ofte svære dilemmaer, og derfor har vi undersøgt den eksisterende europæiske praksis på området gennem de seneste år.

Vurdering af nytte og risiko starter allerede, mens et lægemiddel er under udvikling. Her skal medicinfirmaet indsende en anmodning til myndighederne om at få lov til at udføre en klinisk afprøvning af et lægemiddelkandidat på en gruppe af patienter. I Danmark er det Sundhedsstyrelsen, Datatilsynet og en videnskabetisk komité, som giver tilladelsen. I ansøgningen skal firmaet redegøre for de antagne fordele og risici for forsøgspersonerne. Så længe afprøvningen foregår, skal der hvert år indsendes en såkaldt Development Safety Update Report til myndighederne.

Senere, når firmaet ansøger om tilladelse til markedsføring af det nye lægemiddel, skal virksomheden redegøre for benefit-risiko balancen på produktet, og redegørelsen skal bygge på alle tilgængelige data. Jo flere forsøg der er gennemført, og jo flere sikre data der er genereret, desto bedre kendes lægemidlets virkning og eventuelle bivirkninger. Hvis der er grupper af patienter, som ikke har afprøvet medicinen, fx børn eller nyresyge, vil myndighederne se det som en risiko, især hvis der blot er den mindste mulighed for, at de kan blive udsat for lægemidlet. Dermed mindskes chancen for at opnå en markedsføringstilladelse.

Efter markedsføring overvåges lægemidlet løbende af både firmaer og myndigheder, hvilket sker gennem indsamling af bivirkningsrapporter, og firmaet skal udarbejde en årlig Risk Management Plan. Planen er et dokument, der beskriver risikoprofilen på produktet med angivelse af, hvad der rutinemæssigt og ekstraordinært gøres for at nedsætte risikoen. Ændres risikoen for produktet, skal risikovurderingen opdateres og sendes til myndighederne. Derudover indsendes en årlig Periodic Safety Update Report til myndighederne i de første to år efter markedsføringen og derefter hvert tredje år. Rapporten fokuserer på ny information om bivirkninger, som er opstået i perioden. I denne rapport skal

benefit-risiko balancen anføres tillige med en beskrivelse af de metoder, som er brugt til vurderingen af balancen.

Samspil mellem industri og myndigheder

Myndighederne vil under behandlingen af disse ansøgninger og rapporter også selv forholde sig til de indsendte data. Konsekvensen af denne vurdering hos både firma og myndigheder kan være alt fra ingenting til, at markedsføringstilladelsen inddrages, og lægemidlet trækkes tilbage fra markedet. Det kan også være, at firmaet bliver bedt om at foretage nye afprøvnings, eller at medicinen kun må udskrives af speciallæger til specielle grupper af patienter.

Lægemiddelindustrien har ingen interesse i at skade patienter med deres produkter. Det er uetisk, ødelæggende for deres renommé og kan ende i retssager med efterfølgende store erstatninger, som vil kunne ruinere firmaet. Det er heller ikke i myndighedernes interesse at stå i en situation, hvor der er et lægemiddel på markedet, som udviser negativ benefit-risiko balance. Også de mister anseelse og troværdighed. Således er det vigtigt for både firmaer og myndigheder at kunne forudse så tidligt og så objektivt som muligt, om der er problemer med lægemidlet.



Akne er en akut hudsygdom, som primært rammer i teenageårene, og som ofte efterlader betydelige ar.

Et svært dilemma

Afvejningen mellem et lægemiddels nytte og bivirkninger er vanskelig. Et tænkt eksempel: Hvis du er en 18-25 årig kvinde og lider af svær akne med mange bumser, vil du så tage et lægemiddel, som med 100 procents sikkerhed kan få din akne til at gå væk, men som kræver, at du ikke må dyrke ubeskyttet sex, fordi produktet giver anledning til fosterskader med svære misdannelser? "Ja", vil du måske sige, "for jeg er alligevel for ung til at få børn". Benefit-risiko-balancen vil således være i orden for dig.

Problemet set med myndighedernes øjne er bare, at der er en generel høj risiko for, at unge dyrker ubeskyttet sex. Hvor mange børn, der fødes med misdannelser, kan samfundet tolerere som en konsekvens af et aknemiddel? Ingen? Hvis dette er tilfældet,

så skal lægemidlet slet ikke være på markedet! Men hvad nu hvis lægemiddelafrøvnningen viser, at medicinen øger livskvaliteten for de stakkels unge, som lider af svær akne? Og hvad nu hvis lægerne pålægges at give patienterne prævention i forbindelse med udskrivning af lægemidlet, og der udvikles et godt undervisningsmateriale til de unge patienter? Vil det nedsætte risikoen så meget, at aknemidlet kan markedsføres? Og hvem skal træffe afgørelsen? Myndighederne, lægemiddelproducenten eller patienten?

Godkendelse af lægemidler åbner således op for svære dilemmaer. Her er udfordringen lige nu, at der ikke eksisterer klare regler eller gode metoder til at vurdere benefit-risiko balancen objektivt. Det handler om værdier, og værdier er subjektive. Det, som tillægges positiv betydning af en person, kan meget vel være forskelligt fra, hvad en anden person mener. Derfor har vi stillet spørgsmålet: Hvad er praksis i dag under de nuværende regler indenfor benefit-risiko vurdering? Hvilke metoder eksisterer, og hvor meget anvendes de? Dette var målet for vores undersøgelser.

Kvantitative og kvalitative metoder

Basalt findes to metoder til beregning af benefit-risiko balancen: Den kvalitative og den kvantitative. Derudover er der nogle metoder, som benytter elementer af begge.

Historisk set har de fleste firmaer og myndigheder brugt en kvalitativ metode, som er baseret på ekspertvurderinger. Det betyder, at en ekspert eller en gruppe af eksperter gennemgår alle data for lægemidlet og derefter foretager en afvejning af de fordele og risici, som er forbundet med dets anvendelse. Her er problemet, at processen for, hvordan viden og data kombineres til beslutninger, ofte er ugennemsigtig, ustruktureret og personbestemt. Det indebærer en risiko for partiskhed og for, at niveauet af beviser for beslutningsgrundlaget er for lavt. Endvidere kræver en kvalitativ vurdering, at eksperterne er i besiddelse af stor viden og erfaring.

I et forsøg på at finde mere objektive metoder er der i løbet af de sidste 5-10 år blevet gennemført adskillige projekter hos både myndigheder og i lægemiddelbranchen. Ønsket har været at finde kvantitative metoder, som ved hjælp af computere, software og grafer kan beregne og visualisere benefit-risiko balancen for et givent lægemiddel.

De europæiske lægemiddelmyndigheder i London, European Medicines Agency, gennemførte således fra 2006-2012 en række projekter med henblik på at identificere de bedste metoder for myndighedsgodkendelse af lægemidler. Projektgruppen endte med at pege på en kvalitativ metode, kaldet ProACT-URL, som den bedste. Metoden er ret simpel og anvender grafisk visualisering af nytte og risiko.

Projektgruppen afprøvede også en kvantitativ metode kaldet Multi Criteria Decision Analysis. Metoden repræsenterer et første generations program, som er baseret på identificering af nyttekriterier og risikokriterier, som hver især tillægges en given vægt. På den baggrund beregner programmet så en benefit-risiko balance. Projektgruppen konkluderede, at metoden kan bruges i specielle og følsomme tilfælde. Derudover har flere af de største lægemiddelfirmaer været med til at teste en kvantitativ metode kaldet Pharmaceutical Research and Manufacturers of America Benefit-Risk Action Team. Metoden har helt klart nogle fordele i form af en metodisk fremgangsmåde og visuelle grafer, men indebærer også en risiko for partiskhed.

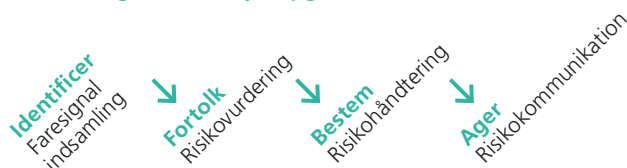
Myndighederne har således et dilemma. Kan de stole på de kvantitative metoder? En gennemgang af fordele og ulemper ved disse metoder viser nemlig, at de også har risiko for partiskhed og ugennemsigtighed. Endvidere ser det ud til, at lægemiddelleksperterne blot erstattes med IT-eksperter! Der er med andre ord brug for mere forskning.

Hvilke metoder bruger firmaerne?

Selvom intentionen om at udvikle velunderbyggede og objektive metoder absolut er til stede, bruges der altså fortsat ikke-gennemtestede kvantitative metoder til benefit-risiko vurdering af lægemidler. Vores undersøgelse viser, at alle de adspurgte lægemiddelproducenter bruger kvalitative metoder, men kun halvdelen af firmaerne har skriftlige procedurer for deres udførelse.

Kombinationen af de øgede lovkrav og offentlighed omkring data tvinger imidlertid firmaerne til at være mere strukturerede end tidligere. Efter vores mening er det bedste, firmaerne kan gøre på nuværende tidspunkt, at udarbejde skriftlige procedurer for deres metoder til benefit-risiko vurdering. Herved er det muligt for dem at bevise, redegøre for beviserne og reproducere de data og beslutninger, som ligger til grund for den fremførte benefit-risiko balance for lægemidlet til brug i dialogen med myndighederne og patienterne. ■

Farmakovigilance arbejdsopgaver



Farmakovigilance kommer fra det græske ord *pharmakon*, som betyder lægemiddel, og det latinske ord *vigilare*, som betyder at være vågen. Begrebet bruges indenfor overvågning af lægemidlers sikkerhed. Farmakovigilance omfatter følgende aktiviteter: Indhentning af information om, hvor sikre lægemidlerne er at bruge, identificering og analyse af de problemer og bivirkninger, som viser sig i behandlingen, samt udarbejdelse af planer for minimering af eventuelle risici. Overvågningen involverer både patienter, læger, lægemiddelindustri og myndigheder. Området er i stadig vækst og beskæftiger mange farmaceuter. Illustration: Sune Kliborg

En god benefit-risiko vurdering

European Medicines Agency's Benefit-risk Methodology Project fra 2009 anbefaler, at en god benefit-risiko vurderingsmetode skal sikre følgende:

- Al tilgængelig information inddrages.
- Information fra forskellige kilder kombineres.
- Diskussionen omkring nytte og risiko skal være struktureret.
- Usikkerheder inddrages i vurderingen, fx manglende afprøvning på børn.
- Antagelser og værdifastsættelse fremføres transparent.
- Konsekvenser ved forkert brug er forudset.
- Der er en procedure for at løse situationen, hvis der er forskellige synspunkter.
- Alle rapporter under lægemidlets udvikling, ansøgning om tilladelse til markedsføring og efter markedsføringen skal vise konsistens i de trufne beslutninger.
- At der foreligger en endelig skriftlig vurderingsrapport.
- At benefit-risiko balancen kan kommunikeres på forståelig vis.
- At den fremførte benefit-risiko balance er afbalanceret i forhold til myndigheder, patienter og læger.

Optimal behandling af kritisk syge med vancomycin

Vancomycin er et antibiotikum som anvendes til at behandle en række alvorlige infektioner, fx blodforgiftning og tarmbetændelse, samt andre infektioner, hvor bakterierne er blevet resistente overfor andre antibiotika. Behandlingen med vancomycin har i praksis vist sig at være svær, og et tæt samarbejde mellem farmaceuter, sygeplejersker og læger er afgørende for en optimal behandling af kritisk syge patienter.

Forfattere

Cand.pharm. Tina Andersen er ph.d.-studerende på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi samt på Intensiv Terapiklinik 4131 på Rigshospitalet.

Cand.pharm. Dorthe Vilstrup Tomsen er områdechef på Region Hovedstadens Apotek.

Dr.med. Jan Bonde er klinikchef på Intensiv Terapiklinik 4131 på Rigshospitalet.

Overlæge Michael Tvede er klinikchef på Klinisk Mikrobiologisk Afdeling på Rigshospitalet.

Ph.d. Lona Lourcing Christrup er professor på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Svære infektioner ses hyppigt hos kritisk syge patienter – disse infektioner kan enten være den direkte årsag til, at patienterne indlægges på intensive afdelinger, eller de kan forekomme hos stærkt svækkede patienter, som er indlagt af andre årsager.

Vancomycin er et antibiotikum, som anvendes til behandling af en række svære infektioner, fx blodforgiftning og tarmbetændelse, når bakterierne er multiresistente og ikke kan nedkæmpes med andre antibiotika. Den praktiske behandling med vancomycin er vanskelig, og det er en stor udfordring at optimere det komplekse behandlingsforløb, som indebærer et tæt samarbejde mellem flere forskellige sundhedsprofessioner. En nøje styret behandling er afgørende for at opnå effekt og undgå bivirkninger og resistensudvikling. Derfor er det afgørende at tilrettelægge behandlingen, så den passer ind i afdelingens daglige rutiner, og sikre at alle involverede faggrupper forstår vigtigheden af punktlighed i netop deres rolle.

Livstruende infektioner

Vancomycin er et effektivt antibiotikum, som hovedsagelig anvendes til at behandle svære infektioner med grampositive kokker. Der er dog flere forhold, som begrænser anvendeligheden: Udvikling af nyresvigt kan forekomme, og kredsløbsforstyrrelser kan opstå ved for hurtig indgift. Desuden har andre lægemidler i en

række sammenhænge vist en bedre effektivitet, og dertil kommer praktiske problemer med at individualisere doseringen.

Da vancomycin er et af de få antibiotika, der kan bekæmpe fx multiresistente stafylokokker, er det vigtigt at undgå, at bakterierne også bliver modstandsdygtige over for dette stof. Denne risiko kan mindskes ved, at man sørger for at anvende tilstrækkeligt høje doser, samt ved at man reserverer brugen af stoffet til infektioner, der ikke kan behandles med andre antibiotika.

Antibiotika og resistens

Antibiotika er lægemidler, som dræber bakterier eller hæmmer deres vækst. Det bedst kendte og mest anvendte antibiotikum er penicillin, som blev opdaget i 1928. Penicillin var det første effektive lægemiddel til at bekæmpe infektioner, som indtil da ofte slog patienterne ihjel.

Klinisk anvendelse af antibiotika kan medføre, at bakterierne udvikler resistens imod lægemidlerne, som så bliver virkningsløse. Derfor er der til stadighed behov for at udvikle nye antibiotika og for at optimere behandlingsstrategierne for de eksisterende lægemidler. Resistens blev et globalt problem allerede i starten af 1950'erne, hvor der opstod et stort behov for kunne nedkæmpe stafylokokker, som var blevet ufølsomme over for penicillin.

Fundet i Borneos regnskov

I 1953 blev vancomycin fundet i en jordprøve indsamlet af missionærer i Borneos regnskov, og den mikroorganisme, som danner vancomycin, blev isoleret. Vancomycin kom på markedet blot fem år senere. De første år indeholdt medicinen urenheder, som medførte nyreskader og svækket hørelse. I dag anvendes vancomycin i en oprenset form.

Vancomycin skal doseres præcist

Vancomycin er et smalspektret antibiotikum, som kun er virksomt overfor grampositive bakterier som streptokokker, enterokokker og stafylokokker. Lægemidlet virker ved at hæmme opbygningen af bakteriernes cellevæg, så bakteriernes vækst hæmmes, og de går til grunde.

Vancomycins effekt afhænger af, hvor lang tid koncentrationen



Infektioner med multiresistente gule stafylokokker behandles med vancomycin, som kan nedkæmpe bakterierne. Foto: iStockphoto.com

nen af stoffet er højere end den mindste effektive koncentration. Samtidig øges risikoen for, at bakterierne udvikler resistens, hvis en patient behandles med så lave doser, at koncentrationen i lange perioder kommer under den mindste effektive koncentration. Derfor er det afgørende, at koncentrationen af vancomycin under hele behandlingsforløbet er højere end den mindste effektive koncentration. På Rigshospitalets intensivafdeling anser man 15-20 mg/L for at være den mindste effektive koncentration ved alvorlige infektioner. På den anden side må koncentrationen ikke overstige en øvre grænse på omtrent 50 mg/L på grund af risikoen for bivirkninger. Det betyder, at vancomycin skal indgives i doser på et gram to gange dagligt til stabile patienter med normal nyrefunktion og normal vægt.

Vancomycin er vandopløseligt og samtidig et stort molekyle, som kun i ringe grad passerer gennem kroppens cellemembran. Hvis man indtager medicinen som tabletter, bliver stoffet i tarmen, indtil det udskilles med afføringen, hvorfor tabletter kan anvendes til behandling af visse typer tarmbetændelse. Hvis vancomycin gives som indsprøjtning, udskilles det gennem nyrerne i urinen, og hvis lægemidlet indsprøjtes for hurtigt i en lille blodåre, kan det medføre rødme og irritation i huden og i værste fald give smerter og muskelsammentrækninger i ryggen og brystet, åndedrætsbesvær og for lavt blodtryk. Vancomycin skal derfor indsprøjtes langsomt i store blodårer med en hurtig blodgennemstrømning. På Rigshospitalets intensivafdeling gives normalt en dosis på 1 g over en time.

Behandling af kritisk syge patienter

Kritisk syge patienter adskiller sig fra andre patienter ved at have en varierende nyrefunktion, og da vancomycin udskilles gennem nyrerne afhænger udskillelshastigheden af den aktuelle nyrefunktion. Derfor kan det være svært at forudsige, hvilken dosis af vancomycin, der giver en optimal behandling, hvor den laveste koncentration i blodet – dvs. lige inden, der gives en ny dosis – ikke kommer under 15-20 mg/L, men hvor koncentrationen heller ikke på noget tidspunkt overstiger 50 mg/L.

Derfor anvendes styret terapi, hvor man i det første behandlingsdøgn indgiver 1 g vancomycin to gange med 12 timers interval. Koncentrationen i blodet bestemmes i løbet af det andet behandlingsdøgn, og dosis justeres på baggrund af en vurdering af den hidtidige dosis og den aktuelle koncentration i blodet på det tidspunkt, hvor blodprøven tages.

På Rigshospitalet analyseres blodprøverne på Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, som bestemmer plasmakoncentrationen af vancomycin. Resultatet forligger 6-8 timer efter, at blodprøven er taget. De anvendte doser noteres løbende i patientens journal sammen med tidspunkterne for indgift og for blodprøvetagning.

Observationsstudie gennem 13 uger

Ved ethvert trin i behandlingsforløbet er der risiko for, at der begås fejl, hvilket kan skade patienten i form af behandlingssvigt, bivirkninger eller forgiftning. Hvis der fx noteres et forkert tidspunkt for blodprøvetagning eller en forkert dosering, vil vurderingen af den anvendte vedligeholdelsesdosis hvile på et forkert grundlag.

Med henblik på at sikre en optimal behandling på intensivafdelingen på Rigshospitalet er der udført et observationsstudie, hvor

samtligte trin i behandlingen blev overvåget gennem 13 uger. Data blev indsamlet for alle patienter, som modtog behandling med vancomycin i mere end 48 timer.

Patienternes køn, alder, vægt, højde og nyrefunktion blev registreret, og hver dag registreredes doser, indgivelsestidspunkter, tidspunkt for blodprøvetagning og koncentration af vancomycin i blodprøven. Det blev også registreret, hvis nogle af oplysningerne manglede.



Blodprøvetagning med henblik på at fastsætte den optimale dosis.
Foto: iStockphoto.com



Blodprøverne analyseres i laboratoriet. Her bestemmes plasmakoncentrationen af vancomycin. Foto: iStockphoto.com

For lave doser og dårlig timing

Studiet viste, at den indledende dosis var for lav hos en tredjedel af patienterne, og i 44 procent af blodprøverne var koncentrationen af vancomycin lavere end foreskrevet. Dette tyder på, at man generelt brugte for lave doser, hvilket svækker behandlingens effekt og øger risikoen for, at bakterierne udvikler resistens. Derfor er der udarbejdet nye retningslinjer med højere, vægtbaserede doser.

Tidspunktet for blodprøvetagningen var heller ikke optimalt, da de fleste af blodprøverne blev taget mere end tre timer før næste dosis blev givet, og ikke som foreskrevet umiddelbart inden indgift. Den målte koncentration vil således være højere end det sande minimum, hvilket kan være en af forklaringerne på, at der ofte gives for lave doser. Årsagen til, at blodprøverne blev taget for tidligt, er sandsynligvis, at den daglige rutine på afdelingen indebar, at blodprøver blev taget kl. 6.00, mens medicin, der skal administreres to gange dagligt, indgives kl. 8.00 og kl. 20.00.

Dette uhensigtsmæssige forhold blev rettet i de nye retningslinjer, så vancomycin nu skal gives kl. 6.00 og kl. 18.00. Sygeplejerskerne opfatter det som en positiv sidegevinst, at vancomycin ikke skal konkurrere med alle de mange øvrige lægemidler, der skal gives kl. 8.00 og kl. 20.

I overraskende mange tilfælde var der sammenfald mellem det tidspunkt, hvor vancomycin blev gjort klar i medicinrummet og det dokumenterede tidspunkt for start af indgiften. Dette er selvsagt en umulighed, og efter nærmere undersøgelse viste det sig, at nogle sygeplejersker for "nemheds skyld" registrerede klargøring og indgift simultant. Derfor er der nu udarbejdet et undervisningsmateriale, som indskærper vigtigheden af, at det er de korrekte tidspunkter, som dokumenteres i journalen.

Behandlingen forbedres

De nye retningslinjer, som blev udarbejdet på basis af resultaterne fra undersøgelsen, er nu blevet implementeret på afdelingen.

Vi er fortsat i gang med at undersøge effekten af ændringerne, men håber og tror, at retningslinjerne vil medvirke til at optimere behandlingen med vancomycin, så behandlingseffektiviteten kan øges, og risikoen for resistensudvikling kan reduceres. ■

Styret behandling

En optimal styring af behandlingen med vancomycin hos kritisk syge patienter, omfatter følgende trin:

- Valg og ordination af startdosis.
- Ordination af blodprøve.
- Registrering af indgivet dosis og doseringstidspunkt.
- Registrering af tidspunkt for udtagning af blodprøve til bestemmelse af koncentrationen af vancomycin.
- Afsendelse af blodprøve til analyse.
- Analyse af blodprøve.
- Modtagelse og registrering af resultatet af blodprøven.
- Revurdering af dosis på baggrund af resultatet, dosis og indgivelsestidspunkt.
- Valg af vedligeholdelsesdosis.
- Ordination af ny blodprøve.
- Registrering af indgivet dosis og doseringstidspunkt.
- Stillingtagen til rettidigt ophør med behandling.



På det sociale område er venner altafgørende i ungdomsårene. For unge med kroniske sygdomme kan det sociale liv være begrænset på grund af træthed, smerter, lægebesøg, behandling og langvarige eller gentagne indlæggelser, og mange unge med kronisk sygdom føler sig ensomme og isolerede. Foto: iStockphoto.com

Kronisk syge unge har svært ved at passe deres behandling

En ud af ti unge lider af langvarig sygdom, og det kan være meget svært for unge at passe en behandling. Lav medicin-efterlevelse er også udbredt hos voksne, men unge oplever særlige barrierer – uanset deres sygdom. De kan føle sig unormale, anderledes end vennerne og uden for fællesskabet. Konflikter med forældrene omkring medicinen, og dårlig kommunikation med lægerne kan ligeledes være barrierer imod at passe behandlingen.

Forfattere

Cand.mag. MPH Signe Hanghøj er ph.d.-studerende ved Ungdomsmedicinsk Videnscenter på Rigshospitalet.

Ph.d. Kirsten A. Boisen er afdelingslæge ved Ungdomsmedicinsk Videnscenter på Rigshospitalet.

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

Det udgør et stort problem for patientsikkerheden og folkesundheden, at mange patienter ikke tager deres lægemidler som fore-

skrevet. Faktisk er det en meget stor andel af patienterne, som har svært ved at passe deres medicinske behandling: 50-80 procent, når det gælder forebyggende behandling, og 30-60 procent, når det drejer sig om behandling af kronisk sygdom.

De barrierer, som voksne oplever, blev i 2003 beskrevet af Verdenssundhedsorganisationen WHO i en meget omfattende systematisk litteraturgennemgang. Rapporten viste, at voksnes medicin efterlevelse påvirkes af fem overordnede dimensioner; faktorer relateret til sundhedssystemet og de sundhedsprofessionelle; sociale og økonomiske faktorer; sygdomsspecifikke faktorer; behandlingsrelaterede faktorer; og patientrelaterede faktorer.

De fem dimensioner gør sig gældende både med hensyn til det, der påvirker medicin efterlevelsen, og for de interventioner, som bevisligt er effektive overfor utilstrækkelig medicin efterlevelse. De fem dimensioner dækker over mere end 100 enkeltfaktorer. Et eksempel på en vigtig enkeltfaktor er patienternes viden om sygdommen og behandlingen, men der skal ofte meget mere til end blot information fra en sundhedsprofessionel, før en person,

som har svært ved at passe sin medicinske behandling, bliver i stand til at ændre adfærd.

Den korte version af WHO's budskab er, at manglende medicin efterlevelse omfatter komplekse problemer, som kræver multidimensionelle løsninger, og at viden er en nødvendighed, men ikke tilstrækkelig forudsætning for, at folk ændrer lægemiddeladfærd.

Kronisk syge unge

Lægemiddelbrugere er ikke kun voksne personer. Mange unge anvender medicin i deres dagligdag, selv om unge generelt betragtes som en rask befolkningsgruppe. Realiteten er imidlertid, at forekomsten af langvarig sygdom blandt unge er stigende.

Det skyldes, at flere børn med alvorlige medfødte sygdomme nu overlever barneårene, samt at hyppigheden af en række almindelige sygdomme som astma og diabetes er steget. Flere undersøgelser viser således, at omkring 10 procent af en ungdomsårgang lider af en langvarig sygdom, der påvirker dagligdagen. Det giver særlige udfordringer i en livsfase, hvor et væsentligt tema er 'at være som de andre'.

Flere undersøgelser viser, at unge i endnu højere grad end voksne har svært ved at passe en langvarig behandling, og i løbet af de sidste ti år er der kommet større fokus på årsagerne til dette. Forskere fra en lang række lande har forsøgt at afdække, hvilke barrierer unge med kroniske sygdomme oplever, når de skal tage deres medicin. Men indtil nu er resultaterne fra disse undersøgelser aldrig blevet analyseret i sammenhæng. Derfor har forskere fra Ungdomsmedicinsk Videnscenter på Rigshospitalet nu samlet og analyseret alle vestlige studier siden 2000, med fokus på kronisk syge unges selvoplevede barrierer imod at passe en medicinsk behandling.

Unge udvikling ved langvarig sygdom

Alle unge gennemgår i løbet af få år en markant og vigtig biologisk, psykologisk og social udvikling. Denne hastige udvikling har betydning for, hvordan man lever med en kronisk sygdom, herunder hvordan man passer en langvarig behandling.

Evnen til abstrakt tænkning, impulsstyring og langtidsplanlægning styrkes i løbet af ungdomsårene, og det har stor betydning for den unges forståelse af sygdommen og behandlingen og for kommunikationen med sundhedspersonalet. Neurofysiologisk forskning har vist, at hjernen ikke er færdigudviklet ved pubertetens afslutning, og at især de områder i hjernen, som styrer funktioner som planlægning, opmærksomhed, impulskontrol og arbejdshukommelse, er under stadig udvikling frem til midten af 20'erne. I de tidlige ungdomsår er tidsperspektivet almindeligvis ultrakort, og tænkningen er ofte konkret: »Jeg tog ikke min medicin i går, og jeg har det o.k. i dag, så det behøver jeg nok ikke«. Med tiden forlænges tidsperspektivet og evnen til at abstrahere fra det konkrete øges: »Jeg glemte min medicin i går, og jeg har det o.k. i dag, men på længere sigt går det ikke på den måde«.

På det sociale område er venner altafgørende i ungdomsårene. For unge med kroniske sygdomme kan dette formende sociale liv med venner være begrænset på grund af træthed, smerter, lægebesøg, behandling og langvarige eller gentagne indlæggelser. Mange unge med kronisk sygdom føler sig derfor ensomme og isolerede fra deres jævnaldrende.

At være ung er vigtigere end sygdommen

Litteraturgennemgangen analyserer barrierer blandt unge på tværs af 13 kroniske sygdomme, fx gigt, kræft, astma og diabetes,

og analysen viser, at unge oplever de samme barrierer, som voksne gør, fx glemsomhed. Men derudover oplever de også specifikke barrierer, som er knyttet til deres tilværelse som ung.

Sygdommene er meget forskellige, hvad angår behandlingsbyrden i form af antallet af daglige behandlinger og bivirkninger, samt med hensyn til symptomer og alvor i form af sygelighed eller dødelighed, hvis behandlingen ikke passes. Men alligevel oplever unge stort set de samme barrierer på tværs af diagnoser og behandlinger. Det interessante er således, at de specifikke barrierer ikke knytter sig til selve sygdommen, men til det at være ung.

Særlige barrierer for unge

Som led i unges løsrivelse fra forældrene opstår typisk en række konflikter. Det gælder selvfølgelig for alle unge og ikke kun for de, som har en kronisk sygdom, men løsrivelsen for unge med en kronisk sygdom kan være endnu sværere end for andre unge, fordi de er bundet til deres forældre som følge af forældrenes ansvar for den medicinske behandling i barneårene.

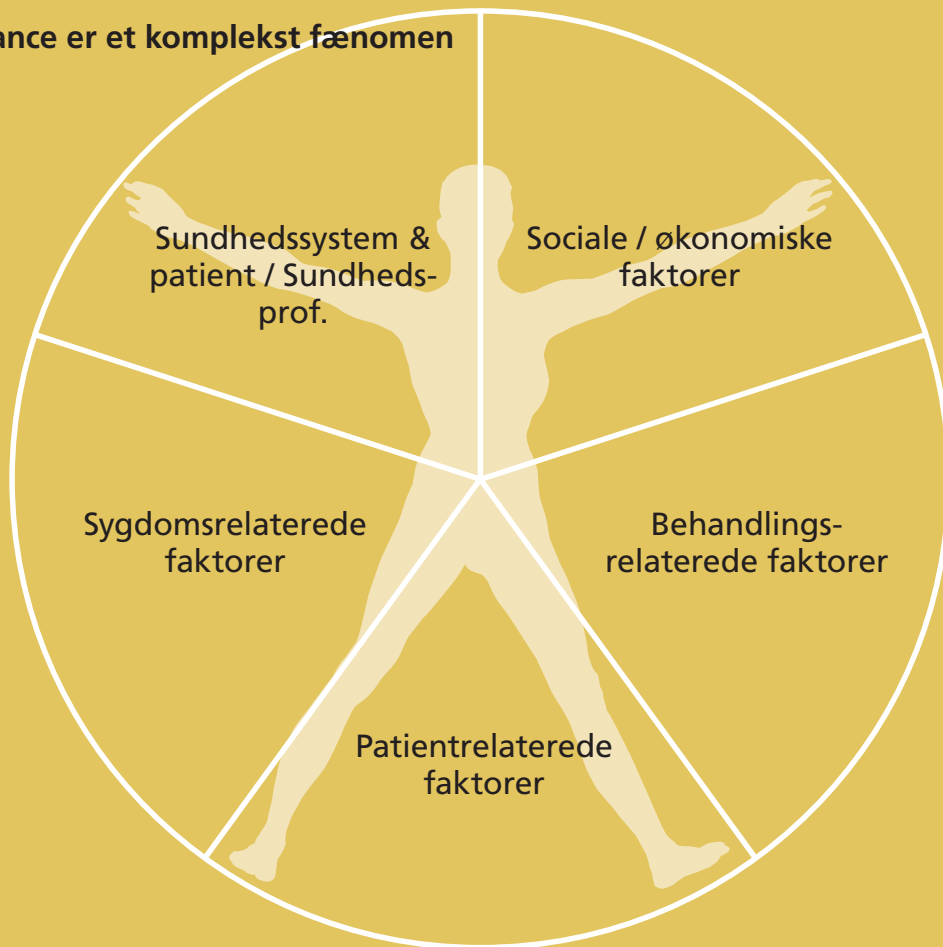
For forældrene kræver det tillid og mod at overgive ansvaret omkring behandlingen til den unge selv. Konflikterne opstår typisk, når den unge ikke varetager behandlingen efter forældrenes anvisninger – fx ved at indtage medicinen på andre tider af døgnet – eller når forældrene har svært ved at overdrage behandlingsansvaret i det tempo, som den unge selv ønsker. Unge på tværs af diagnoser angiver overvågning fra forældre, restriktive forældre og overbeskyttende forældre som en årsag til lav medicin efterlevelse.

I takt med løsrivelsen fra forældrene knytter unge stærkere bånd til deres jævnaldrende. Venner får en ny plads i den unges liv, som dem man betror sig til, og dem man tilbringer mest tid sammen med. Unge spejler sig i deres jævnaldrende og ønsker i høj grad at være som dem. En kronisk sygdom kan dog betyde, at man ikke er som de andre. Man stikker ud fra mængden, man skal have medicin med i tasken, man skal måske måle blodsukker



Unge vil gerne være som deres jævnaldrende, men det er ikke let for langtids-syge unge. Man skiller sig ud, hvis medicinen altid skal være i tasken, hvis man skal måle blodsukker i klassen, hvis man er på diæt og ikke kan spise det samme som vennerne, eller hvis man må gå tidligt fra festen for at nå hjem og tage sin behandling til tiden. Derfor springer unge kronikere ofte behandlingen over, og det kan forværre deres sygdom. Illustration: Regner Lotz

Non-compliance er et komplekst fænomen



Utilstrækkelig medicin efterlevelse er generelt – både for voksne og unge – påvirket af fem dimensioner. De fem dimensioner, som er skitseret på figuren, påvirker ifølge WHO medicin efterlevelsen både i form af tilskyndelser til at passe behandlingen og barrierer, som står i vejen for at følge anvisningerne. De fem dimensioner spiller også ind på effekten af de tiltag, som fremmer medicin efterlevelsen. Illustration: iStock og Sune Kliborg

i klassen, og man skal måske nå hjem på et bestemt tidspunkt for at tage sin behandling.

Det er alt sammen medvirkende til, at mange kronisk syge unge føler sig anderledes og uden for fællesskabet. Langt de fleste angiver, at det at føle sig unormal, anderledes og begrænset i forhold til sine venner er en kæmpe barriere imod at passe sin behandling. Det er simpelthen lettere at glemme sin sygdom for en stund, lade medicinen ligge derhjemme, og deltage i det sociale liv på lige fod med raske venner.

En del kronisk syge unge oplever endvidere, at forholdet til lægen kan være en barriere imod at passe behandlingen. Nogle unge oplever, at lægen ikke forsøger at sætte sig i deres sted og ikke forstår vigtigheden af, at behandlingsplanen skal kunne passe ind i deres liv og rutiner. Andre unge oplever, at lægen taler til dem, som om de stadigvæk var børn, eller at lægen primært kommunikerer til forældrene hen over hovedet på den unge.

Unge har særlige ressourcer, men også særlige udfordringer i et liv med langvarig sygdom og behandling. Der mangler fortsat viden om, hvordan gruppen af langtidssyge bedst støttes igennem

En svær pille at sluge

Unge med kronisk sygdom oplever særlige barrierer i forhold til at passe behandling:

- Konflikter med forældrene.
- At føle sig unormal og anderledes end vennerne.
- At føle sig uden for fællesskabet.
- Dårlig læge-patient kommunikation.

ungdomsårene – herunder støtte til at mestre sygdommen og passe behandlingen, samtidig med at den unge har et meningsfyldt ungdomsliv. WHO's budskab om, at utilstrækkelig medicin efterlevelse omfatter komplekse sammenhænge, der kræver multidimensionelle løsningstilgange, gælder i allerhøjeste grad for nutidens unge patienter. ■

Forskeruddannelse baner vej for

Bedre medicinbrug blandt børn i Uganda

Uganda er et af verdens fattigste lande, og 15 procent af alle nyfødte børn dør, inden de bliver fem år. I et projekt samarbejder vi med Makerere Universitetet i Kampala om at forbedre brugen af medicin til behandling af børn. Desuden er vi med til at styrke landets ekspertise på området gennem uddannelse af ti ugandiske forskere.

Forfattere

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

Ph.d. Annette Olsen er lektor og sektionsleder på Institut for Veterinær Sygdomsbiologi.

Ph.d. Marianne Stubbe Østergaard er seniorforsker på Afdeling for Almen Medicin. Ph.d.

Susan Reynolds Whyte er professor på Institut for Antropologi.

Børns brug af medicin er et forsømt forskningsområde på globalt plan og i særdeleshed i fattige lande. Et af verdens fattige lande er Uganda, som har en bruttonationalindkomst på 500 US dollar om året pr. indbygger, hvilket svarer til ca. en procent af danskernes gennemsnitsindkomst. Halvdelen af landets befolkning er 15 år eller yngre, og 15 procent af de nyfødte børn når ikke at opleve deres 5-års fødselsdag.

Børnene lider af en række akutte og kroniske sygdomme som luftvejsinfektioner, HIV/AIDS, malaria, parasitinfektioner og epilepsi, og deres tilstand forværres ofte af den udbredte underernæring og fejlernæring. Derfor har de syge børn et stort og påtrængende behov for behandling med lægemidler. Behandlingen kan finde sted på offentlige klinikker, i små private klinikker, i medicinbutikker, hos traditionelle healere, i skolen eller i hjemmet. Men desværre er både diagnosticering og behandling ofte utilstrækkelig og til tider endda direkte skadelig.

Uganda modtager udviklingsstøtte fra Danmark gennem Danida, som har valgt at støtte et tværfagligt forskningsprojekt med henblik på at fremme en bedre brug af medicin blandt børn. ChildMed projektet skal også styrke forskningskapaciteten i landet gennem uddannelse af ti ugandiske forskere: 4 ph.d.-studerende, 2 postdocs og 4 kandidatstuderende. Forskeruddannelsen finder sted i samarbejde mellem Makerere Universitet i Kampala og Københavns Universitet.

I projektet bliver der sat fokus på medicinering af fire typer sygdomme: Luftvejsinfektioner og astma, epilepsi, HIV/AIDS og schistosomiasis, som er en tropisk ormesygdom. De fire medicineringsscenarier belyser på hver sin vis fire tværgående dimensioner, som er vigtige og relevante for børns medicinbrug. Disse fire dimensioner er diagnoser, selve lægemidlerne, adgangen til dem og anvendelsen af dem, samt kommunikation om lægemiddelanvendelse. Desuden analyseres forekomsten og indholdet af politikker og guidelines af relevans for lægemiddelbehandling af børn.

Astma hos småbørn

Hver dag kommer hundredevis af mødre bærende på deres syge børn til det store Mulago hospital i Ugandas hovedstad Kampala. Her sidder de i lange rækker og venter på undersøgelse, og hvis barnet indlægges efter undersøgelsen, sker det på overfyldte hospitalssale. Mange af børnene har akut luftvejslidelser, hoster og kan næsten ikke trække vejret. Den triste realitet er, at hver femte af disse småbørn dør på hospitalet af vejrtrækningsbesvær og udmattelse. Hidtil er de fleste af børnene blevet behandlet med antibiotika ud fra den antagelse, at de havde lungebetændelse.



De fire ph.d.-studerende på billedet er alle i gang med projekter, som skal forbedre den medicinske behandling af børn i Uganda. Fra venstre ses Rebecca Nantanda, Phoebe Kajubis, Simon Muhumuza og Xavier Nsabagasan. Xaviers projekt er ikke omtalt i artiklen; han undersøger adgang og holdninger til børnevenlig medicin.



Man behøver ikke at kunne læse ugandisk for at forstå budskabet i denne plakat om sneglefeber: Ingen afføring og vandladning i nærheden af vandet!

I et studie har vi antaget, at en del af børnene kunne have akut svær astma frem for lungebetændelse. Symptomerne på de to sygdomme ligner nemlig hinanden, og samtidig vidste vi, at der er meget lidt opmærksomhed på astma i Afrika. Ph.d.-studerende og børnelæge Rebecca Nantanda undersøger derfor, hvad børn indlagt med svær hoste og vejrtrækningsbesvær i virkeligheden fejler. Det sker ved hjælp af detaljerede diagnostiske kriterier og undersøgelser for lungebetændelse, astma og andre luftvejssygdomme.

Studiet har foreløbig vist, at 40 procent af 600 småbørn, som blev indlagt sidste år med svær hoste og vejrtrækningsproblemer, faktisk havde astma. Nogle havde samtidig lungebetændelse. Studiet viser også, at dødeligheden af luftvejssygdomme hos disse småbørn er faldet overraskende meget, efter at studiet har sat fokus på astma og givet astmamedicin akut. En anden glædelig konsekvens er, at børneafdelingen på Mulago hospitalet i år har oprettet et astmaambulatorium. Her vil lægerne efterbehandle de småbørn, som har fået diagnosticeret astma under indlæggelsen. Derfor er der god grund til at forvente, at børnene får en bedre livskvalitet, fordi de vil være mindre syge og undgå mange genindlæggelser.

At være barn med epilepsi

Epilepsi er tre gange så udbredt i Afrika syd for Sahara som i den industrialiserede verden. Den forholdsvis store udbredelse af sygdommen skyldes bl.a. hjerneskader, som opstår i forbindelse med fødslen, samt at infektioner med parasitter i hjernen kan

forårsage epilepsi. Officielt er der 156 nye tilfælde om året pr. 100.000 indbyggere. Men der findes et langt større antal mennesker med epilepsi, som slet ikke bliver registreret i det offentlige sundhedsvæsen. Forklaringen er dels, at familierne ikke ønsker at erkende at et barn har epilepsi, og dels at sundhedsvæsenet ikke er tilstrækkelig rustet til at yde korrekt behandling.

Flere danske specialestuderende i samfundsfarmaci har undersøgt lokalbefolkningers kontakt med sundhedsvæsenet og analyseret deres opfattelser af sygdommen og erfaringer med behandlingen. Undersøgelserne viser, at de epilepsiramte er udsat for fordomme og stigmatisering på grund af sygdommens natur, hvilket ofte fører til, at der ikke gives forebyggende behandling. Derfor vil den epilepsiramte få krampeanfald, og han eller hun vil måske falde om med fråde om munden og miste selvkontrollen. I den lokale fortolkning skyldes disse anfald, at personen er besat af onde ånder.

På den baggrund har nogle børn i vores studier oplevet at blive forfulgt og mobbet i skolen, ja selv slået af deres lærere. Selv om vores børneinformanter hungre efter en almindelig skolegang, frygter de den også. Hvad nu hvis de får et anfald i klassen eller skolegården? Derfor forsøger nogle af dem – og ikke mindst deres omsorgsgivere – at skjule sygdommen. Som flere af dem sagde, "er det heldigt, at anfaldene normalt kommer om aftenen og natten", for så opdager naboerne dem ikke. Nogle tror desuden, at sygdommen er smitsom og undgår derfor samvær med den epilepsiramte.

I det offentlige sundhedsvæsen kan børnene få gratis behandling med medicin, men den lokalt mest anvendte epilepsimedicin kan medføre sløvhed og indlæringsproblemer i skolen. Desuden er der kun faste rammer for kontrolundersøgelser og nye forsyninger af medicin på hospitaler og de største sundhedscentre. Mange forældre forstår heller ikke, at sygdommen ikke kureres ved en enkelt behandling, men kræver langvarig behandling. Derfor op søger lokalbefolkningen de traditionelle behandlere, som søger at behandle "årsagen", nemlig de onde ånder, med urteafkog og ritualer.

Der er heldigvis eksempler på kroniske behandlingsprogrammer på sundhedsklinikker, som behandler epilepsi på en rationel måde, men der er alt for få af dem. Især mødre vil gøre næsten hvad som helst for deres syge børn, men hvis de skal rejse uden for nabolaget for at opsøge en god klinik, skal de bruge penge på transport og overnatning og går endvidere glip af deres indtægter, som normalt er på dagsbasis. Hermed starter en ond cirkel, som kan betyde, at barnet ikke bliver behandlet med hensigtsmæssig medicin.



Kommunikation med børn om HIV/AIDS

"Vær forsigtig med hvad du siger", advarer barnets bedstemor. "Hun forstår ikke, hvorfor hun er nødt til at tage medicin hver dag, og vi synes ikke, at hun er gammel nok til at vide, at hun er HIV-positiv". Der er 27.000 børn i Uganda, der tager antiviral medicin mod HIV, som de har fået af deres mødre. Programmet vokser, men desværre er der alvorlige kommunikationsproblemer knyttet til medicinering af HIV-positive børn.

Denne bamse skal minde en HIV-smittet pige om, at hun skal huske at tage sin daglige medicin.

Selv om nationale og internationale vejledninger anbefaler, at børn i und skolealderen skal informeres om deres sygdom og behandling, er mange omsorgsgivere tilbageholdende med at diskutere disse emner. Og hvis børnene ikke føler sig syge, og hvis de ikke forstår, hvorfor de skal tage medicin, så er det svært at praktisere det strenge medicinerings-regime, som er nødvendigt for at holde virussen i ave og undgå AIDS i udbrud. Phoebe Kajubis ph.d.-projekt handler om børns kommunikation omkring sygdommen og om omverdenens kommunikation med børn, som er i lægemiddelbehandling. Phoebe har observeret samtaler i klinikker og i klubber for HIV-positive børn, og hun har interviewet næsten 400 børn i alderen 8-17 år. Phoebe fandt, at kun halvdelen af børnene vidste, at de tog medicin for HIV.

Kommunikationen i hjemmet er ofte vanskelig. To tredjedele af de HIV-positive børn har mistet en eller begge forældre til AIDS-sygdommen, og over halvdelen bor hos omsorgsgivere, som ikke er deres biologiske forældre. Samtidig er HIV/AIDS kendt som en livsfarlig og miskrediterende sygdom, selv nu hvor behandling er mere udbredt. Omsorgsgiverne vil gerne beskytte børnene fra at vide, at de har en livstruende sygdom. De mener, at børn ikke kan

holde på hemmeligheder, hvorfor de måske vil fortælle det til andre, hvis de får klar besked. Derudover fandt Phoebe, at hierarkiske relationer i hjemmet gør det svært for børn at stille spørgsmål og at tale med voksne om deres følelser og bekymringer.

Phoebe Kajubi konkluderer, at sundhedsarbejderne har behov for undervisning i at tale direkte med børnene, når de kommer til klinikken. Derudover har omsorgsgiverne brug for mere støtte fra sundhedsarbejderne i den vanskelige kommunikation med børnene.

Behandling mod sneglefeber giver bivirkninger

I en landsbyskole i Jinja distriktet i Uganda stiller børnene op i en lang kø for at tage imod den medicin, som læreren giver dem mod parasitsygdommen schistosomiasis. På dansk kaldes sygdommen sneglefeber, fordi de orme, som forvolder sygdommen, passerer gennem snegle i deres livscyklus. Børnene er utrygge, fordi de har hørt fra kammerater, at de måske vil få ondt i maven og få kvalme, kaste op og blive svimle. En del af kammeraterne er da også blevet hjemme fra skole, fordi de ved, at behandlingen skal foregå i dag.

Ugandas kontrolprogram mod sneglefeber består af sundhedsoplysning til skolebørnene om sygdommen og dens konsekvenser samt massebehandling med ormemidlet praziquantel. Ved massebehandling forstås behandling uden foregående diagnose. Det kan man gøre, fordi praziquantel er så sikkert et stof, at det er i orden at behandle personer, som ikke er smittet med sygdommen. Ideen med at behandle børnene hvert år er at holde smitteniveauet i miljøet nede, fordi smittede børn udskiller ormenes æg med urin og afføring. Målet er desuden at opnå, at ingen børn får så store parasitbyrder, at det ødelægger deres organer. Udfordringen er at få børnene til at slutte op om en behandling, der gør dem dårligt tilpas, når de ikke føler sig syge.

Den lave tilslutning til behandlingen er et stort problem, og Simon Muhumuza prøver i sit ph.d.-arbejde at finde løsninger på det. Projektet har vist, at de vigtigste årsager til den lave tilslutning er børnenes angst for medicinens bivirkninger, at de ikke ved nok om sygdommen, samt at skolelærerne ikke bakker op om behandlingsprogrammet. Det er velkendt, at praziquantels bivirkninger er værst, hvis medicinen spises på tom mave, så projektet har forsøgt at forbedre tilslutningen ved at sørge for, at børnene får lidt mad, inden de behandles. Således har børnene i 6 skoler fået intensiveret sundhedsoplysning plus lidt mad inden behandlingen, mens børnene i 6 andre skoler kun har fået sundhedsoplysning. Resultatet var entydigt og viste, at børnenes tilslutning var signifikant højere og antallet af bivirkninger signifikant lavere i de skoler, hvor børnene blev tilbudt mad. Den højere tilslutning til behandlingen kunne også ses i en markant nedgang i antallet af børn med sneglefeber. ■

Simpelt system viser lægemidlers omdannelse i kroppen

Når medicin omdannes og nedbrydes i kroppen, kan der dannes giftige metabolitter, som medfører bivirkninger. Derfor er det nødvendigt at råde over teknikker, der kan teste lægemidlers omsætning i stofskiftet. Vi har udviklet et unikt og simpelt system til at studere lægemidlers metabolisme.

Forfattere

Ph.d. Nickolaj Petersen er lektor på Institut for Farmaci.

Ph.d. Henrik Jensen er lektor på Institut for Farmaci.

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

Dr. scient. Stig Pedersen-Bjergaard er professor på Institut for Farmaci.

Efter indtagelse af et lægemiddel omdannes og nedbrydes medicinen i kroppens stofskifte, fx ved en hydroxylering, hvor der hæftes en hydroxylgruppe ($-OH$) på lægemiddelstoffet, eller ved en demethylering, hvor der fraspaltes en methylgruppe ($-CH_3$). En sådan metabolisering kan påvirke lægemidlets effekt, og desuden kan omdannelsen til nye stoffer medføre bivirkninger eller få indflydelse på virkningstiden i kroppen. Typisk vil en hydroxylering gøre lægemiddelstoffet mere vandopløseligt, hvorved det hurtigere bliver udskilt gennem nyrerne.

De fleste metabolitter vil ligesom lægemidlet have en gavnlig virkning, men der kan også dannes toksiske metabolitter, som medfører uønskede bivirkninger. En særlig gruppe af disse giftige stofskifteprodukter er reaktive metabolitter, som er meget svære at detektere, fordi de hurtigt omdannes yderligere på grund af deres høje reaktivitet.

Ved udvikling af nye lægemidler er det derfor nødvendigt at råde over teknikker, som kan teste, hvordan lægemidler omdannes og nedbrydes i kroppen, så man undgår ubehagelige overraskelser, når medicinen skal afprøves på dyr eller mennesker.

De traditionelle metoder til at studere lægemidlers metabolisme er meget tidskrævende og vil ofte ikke være i stand til at detektere reaktive metabolitter af lægemiddelstoffet, fordi der går for lang tid mellem prøvetagningen og den kemiske analyse. I samarbejde med Oslo Universitet har vi udviklet et simpelt og effektivt modelsystem, som med kun få sekunders forsinkelse kan følge metabolismen af lægemidler ved hjælp af massespektrometri. Metoden identificerer de enkelte metabolitter ved at bestemme deres masse/ladningsforhold og måler løbende deres koncentration i prøven.

Massespektrometri kræver oprensede prøver, og grundstenen i systemet er derfor en effektiv oprensning af de biologiske prøver. Oprensningen er baseret på en metode, som kaldes elektromembran-ekstraktion, og ekstraktionscellen er koblet direkte til massespektrometret, hvilket muliggør de hurtige analyser.

Efterligner leveren

De fleste lægemidler metaboliseres i leveren, og derfor efterligner systemet forholdene i leveren. Omsætningen af lægemidlet foregår i et lille termostattyret reaktionskammer, der kan indeholde 1 ml reaktionsblanding, som består af en fysiologisk buffer med næringssalte samt mikrosomer fra rottelever. Mikrosomerne dannes ved homogenisering af levervæv, og de indeholder en stor del af de enzymer, som metaboliserer lægemidler. Reaktionskammeret er udstyret med en elektromembran-ekstraktionscelle, som selektivt kan ekstrahere lægemiddelstoffet og dets metabolitter og sende stofferne videre til massespektrometret.

Elektromembranen består af porøs plast med en masse små porer. Vand vil ikke trænge ind i disse porer på grund af overfladespændingen, men hvis man dypper membranen i et organisk opløsningsmiddel, vil opløsningsmidlet fylde porerne og danne en membran af olie.

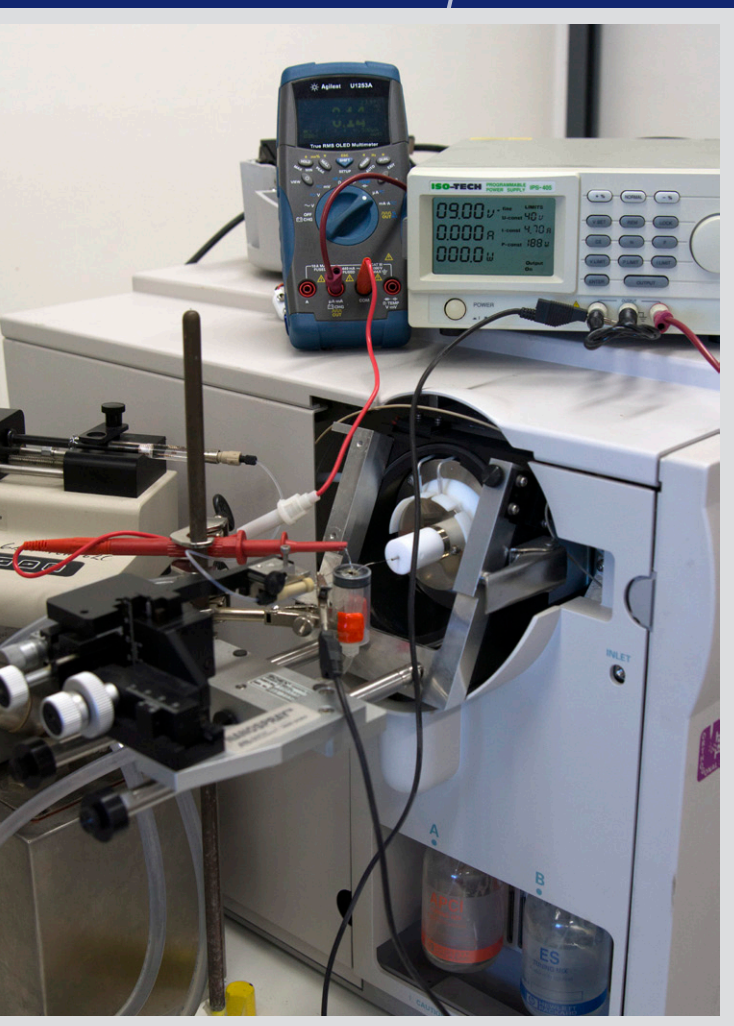


Foto: Tommy Panduro.

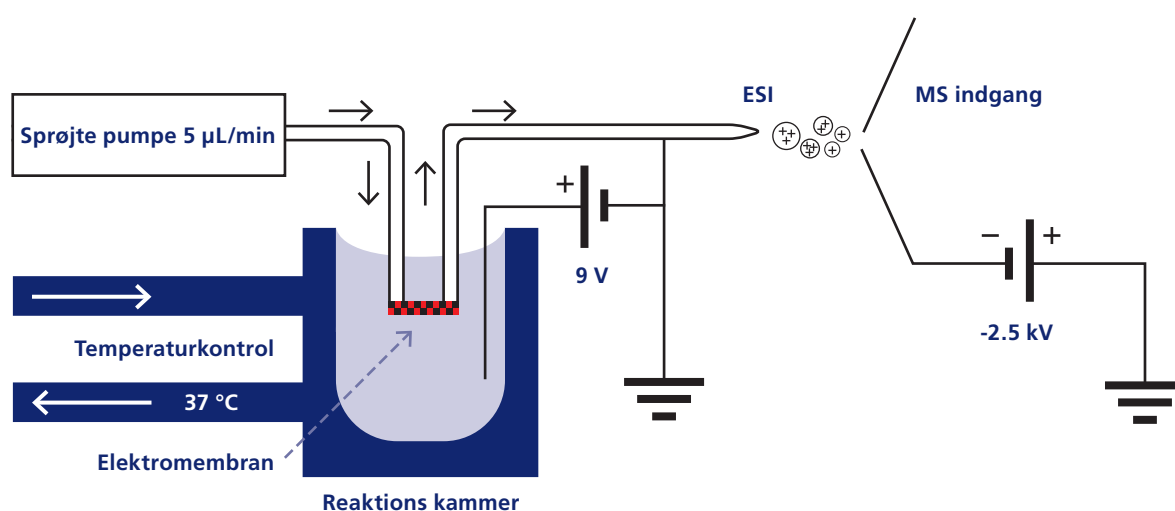
Oliemembranen fungerer nu som en fysisk barriere, som adskiller den komplekse biologiske prøve i reaktionskammeret fra en ren vandig opløsning på indersiden af membranen.

Ekstraktion via elektrisk spænding

Lægemiddelstoffet og metabolitterne ekstraheres selektivt fra reaktionsblandingen ind gennem membranen, og via et tyndt rør – et kapillar – sendes stofferne videre til analyse i massespektrometret.

Selve ekstraktionen sker ved at påføre et spændingsfald hen over membranen fx ved hjælp af et almindeligt 9 volts batteri. Basiske lægemidler er positivt ladede ved fysiologisk pH i reaktionsblandingen, og den negative elektrode anbringes derfor på den anden side af membranen, hvorved spændingsforskellen trækker de positivt ladede lægemiddelstoffer og metabolitter gennem membranen og ind i kapillaret. Buffersalte og små ioner som natrium kan ikke passere membranen på grund af deres ringe opløselighed i den organiske oliemembran, og derved undgår man, at saltene volder problemer i massespektrometret og i sidste ende ødelægger instrumentet.

Den vandige opløsning i kapillaret har et meget lille volumen, og det bevirker, at de ekstraherede stoffer opnår en højere koncentration, end de havde i reaktionsblandingen. Dette er en stor fordel, fordi opkoncentreringen medfører, at systemet kan detektere stoffer, der kun forekommer i meget lave koncentrationer i reaktionsblandingen.



Skitsen viser forsøgsopstillingen. En opløsning med et lægemiddelstof tilsættes reaktionskammeret, hvor kroppens metabolisme i leveren simuleres. Lægemiddelstoffet og dets omdannelsesprodukter ekstraheres selektivt gennem elektromembranen. Derpå bestemmes metabolitternes struktur og mængder over tid i massespektrometret. Illustration: Sune Kliborg

Direkte ind i massespektrometret

Ekstraktet fra oprensningen pumpes kontinuerligt videre gennem det kun 100 μm tykke kapillær hen til massespektrometret med et flow på 5 μL i minuttet. Ved at pålægge en stor spænding på 2000-3000 volt mellem enden af kapillæret og indgangen til massespektrometret, kan man få overskud af positive ladninger i de bittesmå dråber, der dannes for enden af kapillæret.

Den høje spænding trækker de ladede dråber hen mod indgangen til massespektrometret, hvorved der sker en effektiv forstøvning af prøven. Dråberne vil tørre ind undervejs, og den ekstra ladning ioniserer indholdsstofferne, så de får en ladning, når de kommer på gasform. Sådanne ioniserede molekyler kan detekteres i massespektrometret, som adskiller de forskellige indholdsstoffer ud fra deres masse/ladningsforhold.

Massespektrometret kan løbende måle massen og koncentrationen af lægemiddelstoffet og de metabolitter, der er blevet ekstraheret. Tilmed kan metoden bruges til strukturoptklaring af stofferne. De kemiske strukturer kan bestemmes ud fra massen af de enkelte stoffer, men instrumentet kan også justeres til at slå molekylerne i stykker og veje de enkelte dele, og det giver information om, hvor i molekylet de forskellige kemiske grupper er placeret. På den måde kan man fx opklare, hvor i et lægemiddelstof, der er sket en hydroxylering.

Metabolisering af lægemidler

Ved brug af den nye metode har vi studeret omdannelse og nedbrydning af flere forskellige lægemidler. Et eksempel er amitriptylin, som er et antidepressivt lægemiddel. Metabolismen af dette lægemiddelstof er kendt, og vi har derfor kunne bruge det til at validere vores system, som fungerer efter hensigten.

Hvilken information kan man opnå med systemet? Vi får et hurtigt overblik over, hvilke metabolitter af et lægemiddel, der dannes over tid, og samtidig kan vi bestemme den forventede halveringstid for stoffet i kroppen. Ydermere kan systemet på grund af opkoncentreringen og den korte analysetid detektere og strukturbestemme reaktive lægemiddelmetabolitter, som hurtigt omdannes videre. Systemet vil således kunne bruges til karakterisering af, hvordan nye lægemiddelkandidater metaboliseres i kroppen. Samtidig er det en praktisk fordel, at systemet har et meget lille forbrug af både prøve og enzymer.

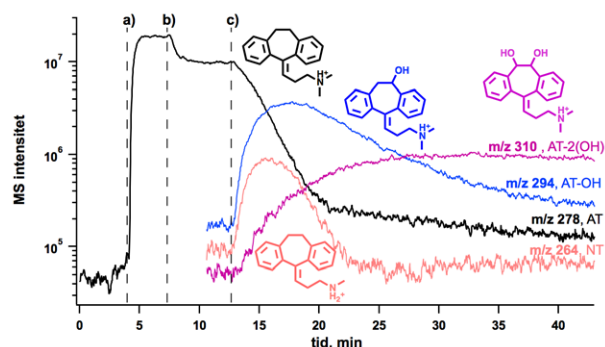
Forskningsgruppen har netop fået godkendt og bevilliget penge fra EU til at ansætte en ph.d.-studerende, som skal arbejde med systemet, og vi ser et stort potentiale for analyserne inden for lægemiddelforskning. ■

Analyse af et antidepressivt lægemiddelstof

Når metaboliseringen af et lægemiddelstof skal undersøges, fyldes reaktionskarret først med en fysiologisk buffer, som opvarmes til 37 °C. Efter ca. fire minutters opvarmning tilsættes det lægemiddel, vi ønsker undersøgt; i dette tilfælde det antidepressive lægemiddel amitriptylin. Lægemiddelstoffet, som har massen 278 g/mol, kan nu måles med massespektrometret. Efter tilsætningen, som er markeret med (a) i figuren, stiger signalet for amitriptylin kraftigt, indtil niveauet bliver konstant efter et minuts tid.

Derpå tilsættes mikrosomer fra rottelever (b), hvorefter signalet for lægemiddelstoffet falder lidt. Det skyldes, at amitriptylin delvist bindes til enzymer i mikrosomerne, hvorved den frie mængde af amitriptylin i opløsningen reduceres. Selve metabolismen starter, når der tilsættes nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat til reaktionsblandingen (c). Signalet for amitriptylin begynder derefter straks at falde, fordi lægemidlet nu omdannes til metabolitter med andre masser.

Hastigheden af metaboliseringen kan måles ud fra intensiteten af signalet i massespektrometret som funktion af tiden, hvorved lægemidlets halveringstid kan bestemmes. Ligeledes kan dannelsen af de forskellige metabolitter følges over tid ved brug af massespektrometret. I den viste kørsel ses dannelsen af metabolitterne nortriptylin med en masse på 264 g/mol, hydroxyamitriptylin med en masse på 294 g/mol og dihydroxyamitriptylin med en masse på 310 g/mol.



Signalet fra massespektrometret viser omdannelsen af det antidepressive lægemiddel amitriptylin og dannelsen af metabolitterne over tid. AT = amitriptylin (sort), NT = nortriptylin (orange), AT-OH = hydroxyamitriptylin (blå), AT-2(OH) = dihydroxyamitriptylin (violet).

Nyt princip til forlænget smertebehandling af gig:

Medicindepot dannes efter injektion i leddet

Depotmedicin til smertebehandling af gigtpatienter injiceres normalt i færdig form i det ramte led, hvorpå medicinen frigives over en periode. Et nyt og lovede princip er at injicere lægemiddelstoffet som en prodrug-opløsning, der danner depotet på injektionsstedet. Sådanne præparater kan afhjælpe et stort behov for behandlinger, hvor virkningen skal vare 7-10 dage.

Forfattere

Ph.d. Susan Weng Larsen er lektor på Institut for Farmaci.

Ph.d. Mette Agergaard Thing er postdoc på Institut for Farmaci.

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

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

Ph.d. Martin Hansen er post.doc på Institut for Farmaci.

Dr.pharm. Claus Selch Larsen er professor på Institut for Farmaci.

De fleste lægemidler indtages som tabletter eller injiceres direkte i en vene. I begge tilfælde transporteres lægemiddelstoffet hen til virkningsstedet med blodet. Det er den eneste realistiske metode, når målstedet i organismen ikke er samlet i en kropsdel, eller når lægerne skal behandle svært tilgængelige organer dybt inde i kroppen. Ulempen ved tabletter og injektioner i blodbanen er imidlertid, at blodet også bringer det aktive stof hen til alle andre væv og organer, som således unødigt udsættes for lægemiddelstoffet.

Hvis man kan målrette lægemiddelstofferne, så de kun transporteres til målområdet, er det muligt at minimere den indgivne dosis og dermed reducere risikoen for uønskede bivirkninger. En lokal og tillige forlænget virkning kan opnås i tilfælde, hvor det er muligt at placere et medicindepot tæt på virkningsstedet, fx et depotplaster eller et injiceret depotpræparat, hvorfra lægemiddelstoffet frigives langsomt over en periode.

I sidstnævnte sammenhæng er der et udtalt behov for nye teknologier til behandling af de store gigtsygdomme som slidgigt. Det samme gælder for smertebehandling efter mindre kirurgiske indgreb i kroppens led, fx kikkertoperationer. Sportsskader, der medfører ledbetændelse, er et tredje område, hvor der er brug for innovative behandlingsmuligheder, hvor virkningen skal vare 7-10 dage.

Depotlægemidler til injektion

Lægemiddelstoffer kan på forskellig vis indlejres i depoter, som er sammensat af farmaceutiske hjælpestoffer. I depotpræparater til injektion kan hastigheden for lægemiddelstoffets frigivelse – i det mindste delvist – styres via valget og sammensætningen af hjælpestofferne. Lægemiddelstoffet kan fx indlejres i bionedbrydelige mikrosfærer; en slags mikrokugler. Denne metode anvendes i et langtidsvirkende steroidpræparat til indsprøjtning i led, som er under udvikling. Lægemidlet, der skal lindre smerteepisoder ved

slidgigt, afprøves for tiden i kliniske forsøg med patienter.

Det er karakteristisk for denne type af partikulære depoter, at indholdet af det aktive lægemiddelstof typisk kun udgør 10-20 procent eller mindre af depotpræparatets samlede vægt. Partikulære depoter omfatter også mikrokrySTALLINSKE opslæmninger, hvor de faste krySTALLINSKE partikler består af et tungtopløseligt lægemiddelstof eller af et prodrug, som spaltes på stedet og derved frigiver lægemiddelstoffet.

Injicerbare suspensionspræparater indeholder kun et minimum af farmaceutiske hjælpestoffer. Dette er en klar fordel for depoter, der skal injiceres direkte i led, fordi risikoen for en lokal irritationsreaktion stiger med mængden af værtsfremmede partikler, som lægges ind i ledhulen. Sådanne præparater, der kan injiceres i led som knæ og albuer, har siden 1960'erne været anvendt til at mindske smerter og betændelsestilstande hos gigtpatienter over en tidsbegrænset periode. Varigheden af virkningen er her bl.a. styret af det enkelte prodrugs opløselighed samt af størrelsen og diameteren af de faste partikler.

Dyr sterilisation

MikrokrySTALLINSKE opløsninger udgør ved første øjekast et relativt ukompliceret formuleringsprincip for depotlægemidler til injektion. Den generelle anvendelighed af princippet kan dog være begrænset af to forhold.

For det første vanskeliggøres fremstillingsprocessen af, at det færdige produkt skal være sterilt. Sterilisation er omkostningskrævende og udgør en betydelig produktionsteknisk udfordring for alle partikulære præparater til injektion. For det andet kan det være svært at sikre en tilstrækkelig fysisk stabilitet af sådanne suspensioner under opbevaring. Her tænkes først og fremmest på ændringer i fordelingen af partikelstørrelsen under lagringen. Ændringer i denne parameter påvirker partiklernes samlede overflade og dermed den hastighed, hvormed det aktive lægemiddelstof opløses og bliver i stand til at udøve sin farmakologiske aktivitet.

Depotdannelse på injektionsstedet

Ved udvikling af depotpræparater til injektion har man forsøgt at omgå ovennævnte problemstillinger ved design af nye formuleringsprincipper, som er kendetegnet ved, at en præ-formulering med det opløste lægemiddelstof og alle de øvrige ingredienser først danner det egentlige depot på injektionsstedet, fx i form af en hydrogel.

Dannelse af hydrogeler med indesluttet lægemiddelstof kan opnås ved at opløse lægemiddelstoffet sammen med visse polymerer. Præparatet er en opløsning ved stuetemperatur, men danner en gel ved temperaturer over 34-36 °C. Depotgelen dannes med andre ord først, når præparatet injiceres i en 37 °C varm krop.

Indlejring af de aktive lægemiddelstoffer i bionedbrydelige mikrokugler kan opnås ved at opløse lægemiddelstoffet og visse

polymerer i et vævsforligeligt opløsningsmiddel. Efter injektion udfældes polymererne med indesluttet lægemiddelstof ved kontakt med den vandige vævsvæske. Herefter frigives lægemiddelstoffet langsomt over tid fra det nydannede depot.

For tungtopløselige lægemiddelstoffer kan der fremstilles præ-formuleringer ved at opløse lægemiddelstoffet ved hjælp af vandopløselige opløselighedsfremmende hjælpestoffer. Efter injektion af præ-formuleringen fælder lægemiddelstoffet ud og det suspensionsbaserede depot dannes.

Øget effekt og færre bivirkninger

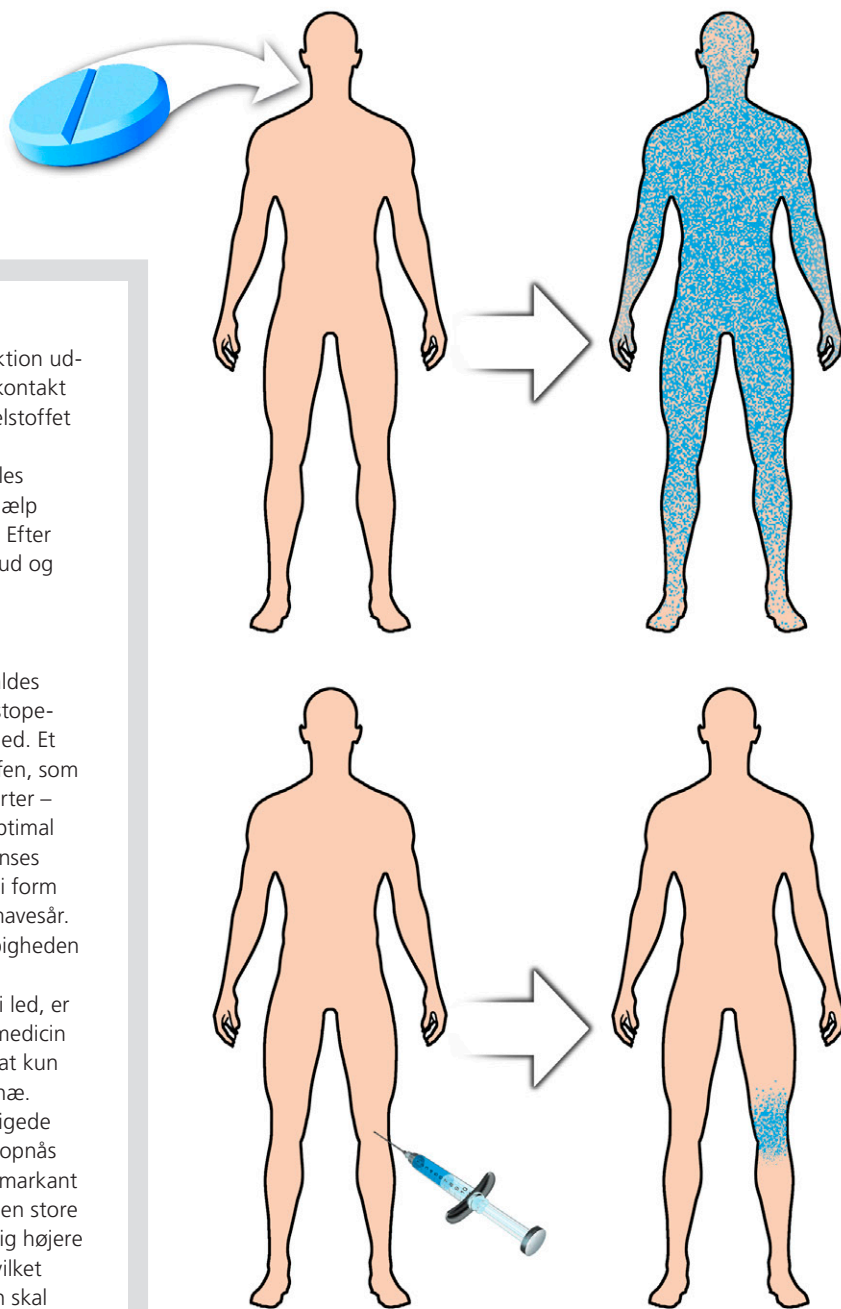
I dag indgår brug af en gruppe lægemiddelstoffer, som kaldes non-steroid-antiinflammatoriske stoffer (NSAID), i den postoperative smertebehandling efter mindre kirurgiske indgreb i led. Et velkendt eksempel på et sådant lægemiddelstof er ibuprofen, som indtages i tabletter til behandling af feber, slidgigt og smerter – især inflammatoriske smerter, som skyldes betændelse. Optimal anvendelse af disse lægemiddelstoffer i tabletform begrænses imidlertid af en risiko for bivirkninger i mave-tarmkanalen i form af kvalme, opkastninger, mavesmerter og øget risiko for mavesår. Bivirkningerne kan opstå selv efter kort tids brug, og hyppigheden af dem stiger med øgede doser.

Når det gælder behandling af slidgigt og sportsskader i led, er det derfor langt fra ideelt at indtage den smertestillende medicin i tabletter. For oral NSAID behandling gælder det nemlig, at kun omkring 1/3.000 af dosis når frem til et givent led, fx et knæ. Hvis man i stedet injicerer lægemidlet direkte i det beskadigede knæled, vil den smertestillende effekt teoretisk set kunne opnås med 0,03 procent af den oralt indgivne dosis. Ud over en markant reduktion af bivirkningerne har direkte injektion i leddet den store fordel i forhold til oral terapi, at man kan opnå en væsentlig højere koncentration af lægemiddelstoffet i virkningsområdet, hvilket resulterer i en bedre smertelindring. Såfremt behandlingen skal strække sig over længere tid, kan det anvendte lægemiddelstof med fordel injiceres i form af et depotpræparat.

Ny prodrug-strategi

Vi undersøger nu, om den nye strategi med injektion af en præ-formulering, som danner et suspensionsbaseret depot ved injektionsstedet, kan bruges til lokal smertebehandling i led. Her er det imidlertid en udfordring, at dannelsen af depotet forudsætter, at det anvendte NSAID lægemiddelstof er relativt tungtopløseligt omkring neutral pH, hvilket kun er tilfældet for ganske få af de klinisk anvendte stoffer. Langt de fleste af lægemiddelstofferne, fx diclofenac og ibuprofen, indeholder en carboxylsyregruppe, som vil være ioniseret, og dermed bliver stoffet let opløseligt ved fysiologisk pH 7.4. Disse lægemiddelstoffer er derfor opløselige i ledvæsken og kan ikke i sig selv føre til den ønskede dannelse af medicindepotet på stedet.

Prodrug-princippet er tidligere blevet brugt til at fremstille



Når gigtsmerter behandles med tabletter, fordeles medicinen i hele kroppen. Derfor er det nødvendigt med store doser for at lindre patientens smerter, og det medfører en risiko for bivirkninger. Hvis et depotpræparat med lægemiddelstoffet i stedet injiceres direkte i det gigtramte led – her knæet – kan man opnå en bedre smertelindring med mindre doser, og samtidig reduceres bivirkningerne markant, fordi lægemidlet ikke fordeles i hele kroppen.

Illustration: Henning Dalhoff

tungtopløselige udgaver af lægemiddelstoffer, og derfor ville det være relativt nemt at fremstille et tungtopløseligt prodrug af diclofenac. I stedet for at anvende sådanne præ-formuleringer, hvor prodrugget er opløst ved brug af opløselighedsfremmende

hjelpestoffer, har vi forfulgt en helt ny strategi til dannelse af et depot af prodrugget ved injektionsstedet.

Vi har således syntetiseret en række esterprodrugs af bl.a. diclofenac, som er karakteriseret ved, at transportgruppen indeholder et nitrogenatom, hvilket gør forbindelserne svagt basiske. Sådanne svage baser vil være ioniserede og dermed opløselige i en vandig opløsning ved svag sur pH, men ikke-ioniserede ved fysiologisk pH 7.4. Det indebærer, at prodrugget teoretisk set vil være omkring 5000 gange mere opløseligt i en vandig opløsning ved pH 3.4 end i ledvæsken.

Patentsøgning og firma

Dannelsen af et suspensionsdepot på injektionsstedet kan således opnås ved at bringe en svagt sur opløsning af et diclofenac-prodrug i kontakt en vandig opløsning som fx ledvæske. Det indebærer, at diclofenacs koncentration og opholdstid i ledvæsken nu primært afhænger af prodruggets opløselighed i ledvæsken samt af dets følsomhed for enzymspaltning.

I et pilotforsøg har vi indsprøjet en svagt sur opløsning af et diclofenac prodrug i rotteknæ. Forsøget varede fire dage. Alle blodprøverne, som blev udtaget i løbet af perioden, indeholdt diclofenac, og efter forsøgets afslutning indeholdt de injicerede rotteknæ fortsat analyserbare mængder af det faste prodrug. Det viser, at lægemiddelstoffet som ønsket frigives langsomt fra depotet.

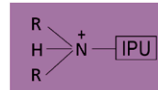
Opfindelsen er dækket af en patentsøgning og har dannet grundlag for etablering af Dep-Xplora ApS, som er et spinout firma fra Københavns Universitet. Seed Capital er medinvestor. ■

Prodrug-princip til dannelse af suspensionsdepot

Transportgruppens funktion:
Introducer en pH-afhængig opløsning

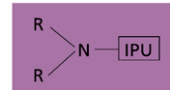


Ladet ved sur pH
Høj opløselighed



Formål: Gør det muligt at injicere en vandig opløsning af prodrugget lokalt i leddet.

Neutral ved fysiologisk pH
Lav opløselighed



Formål: Prodrug fælder ud efter kontakt med ledvæske og dermed dannes suspensionsdepotet.

Illustration: Henning Dalhoff

Prodrugs og præ-formuleringer

Et prodrug dannes ved at binde en såkaldt transportgruppe til lægemiddelstoffet, hvorved der dannes en ny kemisk forbindelse – prodrugget. Bindingen mellem de to molekyler spaltes efter optagelsen i organismen, hvorved det oprindelige lægemiddelstof gendannes. Spaltningen sker typisk ved hjælp af enzymer, som findes i det behandlede væv, i blodet eller i leveren. Ved at vælge transportgrupper med forskellige egenskaber kan man fremstille prodrugs med eksempelvis højere eller lavere vandopløselighed, øget stabilitet eller større evne til at trænge over biologiske membraner, end selve det aktive lægemiddelstof har.

Præ-formuleringer kan fremstilles som opløsninger, der indeholder prodrugget samt de nødvendige hjelpestoffer. Efter injektion af præ-formuleringen dannes det egentlige medicindepot på injektionsstedet. Herfra frigives lægemiddelstoffet gradvist over en periode på en uge eller længere.

Illustration: Henning Dalhoff

Vaccination i slimhinderne skal forhindre sygdomsfremkaldende mikroorganismer at nå ind i kroppen

Mange sygdomsfremkaldende mikroorganismer invaderer kroppen gennem vores slimhinder og sætter derved det naturlige forsvar i slimhinderne ud af spillet. Vaccination kan forebygge infektionerne, men mange eksisterende vacciner inducerer ikke tilstrækkelig immunitet i slimhinderne til at hindre mikroorganismer i at bryde gennem dem. Derfor udvikler vi nye vacciner, som kan øge slimhindeimmuniteten og stoppe indtrængning af patogener.

Forfattere

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

Ph.d. Pall Thor Ingvarsson er akademiker på Statens Serum Institut.

Ph.d. Frank Follmann er akademiker på Statens Serum Institut.

Ph.d. Dennis Christensen er akademiker på Statens Serum Institut.

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

Slimhinder dækker kroppens indre overflader i næsen, lungerne, munden, mavetarmkanalen og kønsorganerne, og her udgør de en stor del af kroppens barriere mod det ydre miljø. Slimhinderne beskytter det underliggende væv mod fremmede stoffer og mikroorganismer ved hjælp af naturlige forsvarsmekanismer, som både består af fysiske barrierer og af immunforsvaret i slimhinderne – det mukosale immunsystem. Nogle mikroorganismer er imidlertid i stand til at bryde igennem barrieren og inficere kroppen. Det gælder eksempelvis for luftvejsinfektioner som tuberkulose og influenza, infektioner i kønsorganerne som klamydia samt infektioner i mavetarmkanalen som salmonella.

Vaccination har igennem de sidste århundreder vist sig at være en effektiv og billig metode til at forebygge en lang række alvorlige infektionssygdomme. Alligevel er der stadig mange infektioner, som ikke kan forebygges ved vaccination. En væsentlig årsag er, at vacciner traditionelt indgives ved injektion i muskler, hvilket ofte ikke inducerer en tilstrækkelig grad af immunitet i slimhinderne. Derfor er vaccinerne ikke i stand til at forhindre, at mikroorganismerne trænger igennem slimhinderne og kommer ind i kroppen. Lokal vaccination direkte på slimhinderne har vist sig at være en lovende metode til at inducere slimhindeimmunitet. At opnå dette er dog en særlig udfordring og stiller mange krav til design af vaccinen.

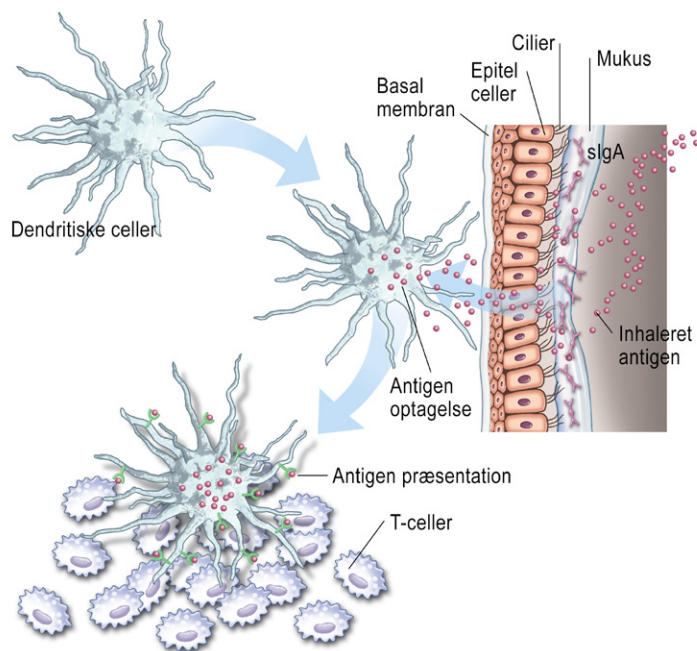
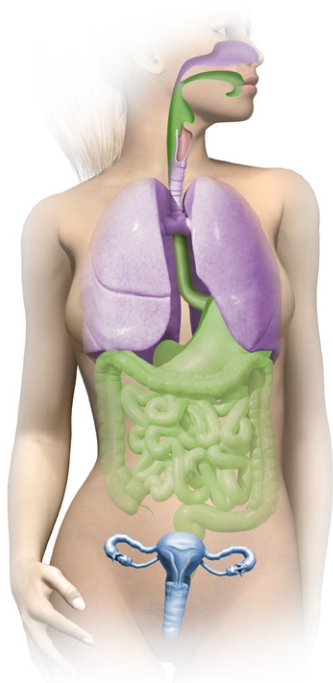
Kroppens naturlige forsvar i slimhinderne

Kroppens barriere i slimhinderne mod indtrængende mikroorganismer udgøres af flere lag, som varierer alt efter deres anatomiske placering og funktion, men den overordnede opbygning er ens for alle slimhinder. En væsentlig bestanddel er et til flere lag af epitelceller, der hviler på en basalmembran understøttet af bindevæv, som udgør forbindelsen mellem slimhinden og de underliggende væv. I nogle områder af kroppen, fx i mundhulen, er der flere lag epitelceller, fordi epitelet skal beskytte det underliggende væv mod den mekaniske påvirkning under tygning. I andre områder, fx i lungerne og i tarmene, består epitelet kun af et enkelt, tyndt celleglag, fordi afstanden til blodbanen skal være kort for at sikre en hurtig optagelse af henholdsvis ilt og næringsstoffer.

Epitelet er i reglen dækket af et slimlag af mere eller mindre tyktflydende karakter. Slimlaget – mukos – består foruden vand hovedsageligt af muciner, som er store og negativt ladede proteiner. Mucinerne danner et meget forgrenet netværk med porestørrelser fra få nanometer til flere mikrometer afhængig af den anatomiske placering. Nogle slimhinder, fx i de øvre luftveje, er dækket af fimrehår, som via mekaniske bevægelser fjerner det materiale, der bliver fanget i slimlaget.

Foruden denne fysiske barrierefunktion er slimhinderne beskyttet af immunologiske forsvarsmekanismer. Det immunologiske forsvar er særligt vigtigt i slimhinder, der konstant udsættes for angreb af mikroorganismer, hvilket fx er tilfældet i tarmene og luftvejene. Det mukosale immunforsvar kan forhindre mange infektioner gennem slimhinderne og fungerer i princippet uafhængigt af det systemiske immunsystem, selv om forsvaret udføres af de samme typer immunceller.

Det mukosale immunforsvar er karakteriseret ved, at immuncellerne udskiller en bestemt type antistoffer, immunoglobulin A, i slimlaget. Her binder antistofferne sig til mikroorganismerne på infektionsstedet og hindrer dem i at sætte sig fast på det underliggende epitel. Denne neutralisering forhindrer infektion, reducerer virulens og hindrer mikroorganismerne i at sprede sig. Desuden spiller rekruttering af T-celler en væsentlig rolle. Med hensyn til vaccination kan slimhindeimmunitet opnås ved at indgive vaccinerne direkte på slimhinderne, og derfor er der behov for at udvikle særlige vacciner til mukosal administration.



Slimhinder udgør den største grænseflade mellem kroppen og det ydre miljø, bl.a. i luftvejene (lilla), mavetarmkanalen (grøn) og kønsvejene (blå). Slimhindernes forsvar mod indtrængende mikroorganismer udgøres af fysiske barrierer som slimlaget, fimrehårene og epitelcellerne samt af det mukosale immunsystem. Slimhindernes immunforsvar fungerer især via en særlig type antistoffer, sekretorisk immunoglobulin A (sIgA), som udskilles ud i slimlaget. Antistofferne binder sig til mikroorganismer på infektionsstedet, hvilket forhindrer dem i at sætte sig fast på det underliggende lag af epitelceller. Mikroorganismer, der formår at trænge igennem epitelet og ind i kroppen, optages af dendritiske celler, som migrerer til lymfeknuderne, hvor de aktiverer antigen-specifikke T-celler. Disse T-celler migrerer tilbage til slimhinderne, hvor de bekæmper infektionen. Illustration: Henning Dalhoff

Moderne vacciner

Tidligere anvendte man svækkede eller inaktiverede bakterier som vacciner, men moderne vacciner er såkaldte subunitvacciner, som kun består af en eller flere isolerede komponenter – antigener – fra den sygdomsfremkaldende mikroorganisme. Disse vacciner har den store fordel, at de besidder en meget høj renhedsgrad, hvorfor brugen af dem ikke udgør nogen sikkerhedsrisiko for mennesker.

Prisen for den høje sikkerhed er, at man har fjernet de såkaldte patogen-associerede molekulære mønstre, som immunsystemet er tilpasset til at genkende og reagere på. Derfor er det nødvendigt at tilsætte hjælpestoffer til vaccinerne. Hjælpestofferne består ofte af drug delivery systemer som nanopartikler, der afleverer antigenet til immunsystemet på den rette måde, samt af immunpotensatorer, som stimulerer eller modulerer aktiveringen af et beskyttende immunrespons.

I et samarbejde mellem Københavns Universitet og Statens Serum Institut arbejder vi på at udvikle effektive hjælpestoffer til subunitvacciner baseret på positivt ladede nanopartikler af lipider, som kaldes liposomer. Disse liposomer indeholder det kationiske og overfladeaktive stof dimethyldioctadecylammoniumbromid (DDA) og immunpotensatoren trehalosedibehenat (TDB).

Systemet, som kaldes CAF01, har vist sig at være meget effektivt og sikkert i dyreforsøg, og det er allerede testet i mennesker. I et nyligt afsluttet Ph.d. projekt under Centre for Nanovaccine finansieret af det Strategiske Forskningsråd har vi udviklet tørre mikropartikler baseret på systemet, som er skræddersyet til indgivelse i luftvejene.

Design af vacciner til lungerne

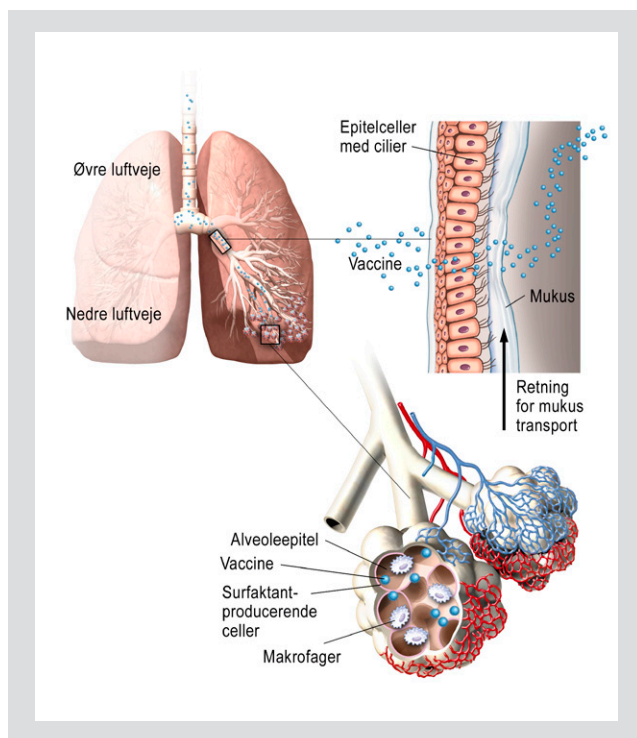
Administration af vacciner direkte på lungernes slimhinder stiller særlige krav til vaccinedesignet, fordi man skal sikre, at vaccinen rent faktisk når hen til det ønskede sted efter inhalation. Samtidig

skal man undgå, at vaccinen fanges og inaktiveres af de selvsamme forsvarsmekanismer, der beskytter slimhinderne. Inhalation af vacciner er en ikke-invasiv metode, hvor patienterne undgår brug af nål og sprøjte, hvilket de fleste helst er fri for.

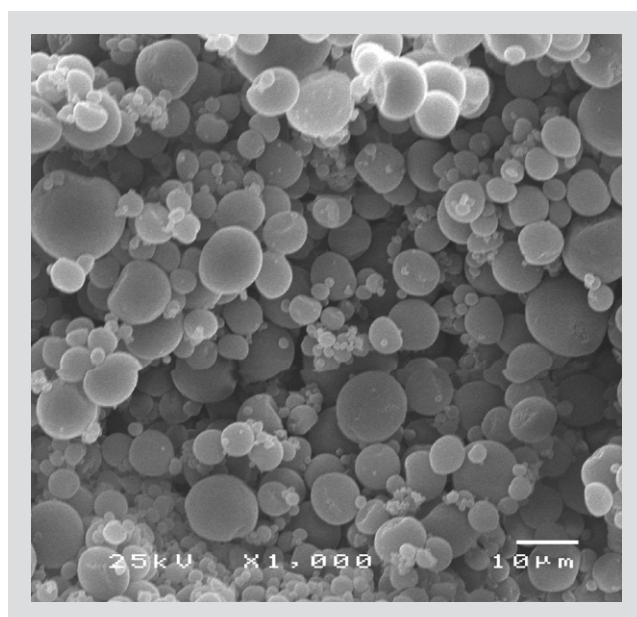
Imidlertid er der mange faktorer at tage i betragtning ved design af en pulverbaseret luftvejsvaccine. Deponering af partikler i lungerne afhænger nemlig af den såkaldte aerodynamiske diameter af partiklerne, som er et mål for partiklernes geometriske størrelse og deres densitet. Partikler i størrelsesordenen 1-5 μm deponeres i de mindste luftsække, alveolerne, mens større partikler med diameter på 5-10 μm deponeres i de øvre luftveje. Meget små partikler deponeres ikke og udskilles for det meste med udåndingsluften. Ved at designe partikler med specifikke karakteristika kan man derfor meget præcist ramme det sted i lungerne, hvor vaccinen skal virke.

Flere metoder kan anvendes til at fremstille pulverpartikler med vaccinen til inhalation. Vi har anvendt spraytørring og sprayfrysning, som giver god mulighed for at skræddersy de tørre partikler til at have egenskaber, så de deponeres præcist på det sted i lungerne, hvor de virker bedst. Ved indbygning af vaccinen i et tørt pulver opnår man, at vaccinerne bliver varmestabile, hvilket er en stor praktisk fordel, da det ikke er nødvendigt at opbevare vaccinerne køligt. Tørring af vacciner rummer dog særlige udfordringer, fordi de indeholder antigener og nanopartikler, som let ødelægges ved tørring. Derfor tilsættes en stor mængde hjælpestoffer, som kan beskytte de skrøbelige strukturer under tørring, fx kulhydrater som trehalose og inulin.

Vores foreløbige resultater tyder på, at vi ved spraytørring af CAF01 nanopartiklerne sammen med et tuberkuloseantigen og et beskyttende kulhydrathjælpestof fuldstændig kan bevare vaccins aktivitet. På den måde har vi designet en varmestabil tuberkulosevaccine, hvis aktivitet er intakt uden køling i modsætning til en flydende vaccine. Vi har endvidere anvendt en avance-



En vaccine til indånding i luftvejene består af mikropartikler. Partikler med størrelser på 5-10 μm deponeres øverst i luftvejene og fanges i slimlaget, hvorefter de transporteres mod svælget og synkes. Partikler med størrelser på 1-5 μm deponeres i de fint forgrenende respiratoriske afsnit af lungerne – alveolerne – som ikke er dækket af slim. Ved at designe partikler med specifikke karakteristika kan man derfor ramme det sted i lungerne, hvor vaccinen skal virke. Illustration: Henning Dalhoff



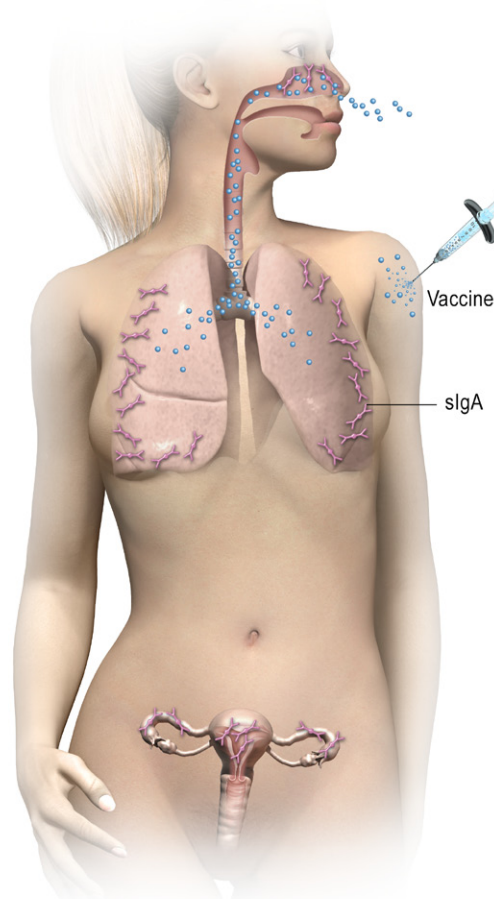
Scanningelektronmikroskopibillede af en tuberkulosevaccine baseret på tørre mikropartikler, som er fremstillet ved spraytørring af CAF01 nanopartikler sammen med hjælpestoffet trehalose. En tør vaccine i pulverform behøver ikke at blive opbevaret i et køleskab, som det er tilfældet for en flydende vaccine. Foto: Forfatterne

ret forsøgsopstilling, hvor man med et minimalt antal forsøg kan variere mange designparametre for formuleringen af vaccinen og processen simultant. På den måde er det lykkedes at optimere tørringen af CAF01 systemet, så vaccinen er stabil, og så det færdige pulvers partikelstørrelse er optimal for deponering i lungerne. ■

Et nyt koncept: Slimhindeimmunitet i luftvejene overføres til kønsvejene

En særlig fascinerende og unik egenskab ved det mukosale immunsystem er, at den mukosale immunitet i fysisk adskilte væv er forbundet via et mukosalt netværk. Fx kan induktion af mukosal immunitet i luftvejene beskytte mod infektion gennem slimhinderne i kønsorganerne. Dette fænomen udnytter vi til vaccination mod kønssygdommen klamydia ved at designe en vaccine til anvendelse i luftvejene.

Ideen er at kombinere en almindelig injektion af vaccinen i en muskel med en slimhindevaccination i luftvejene, således at der både induceres systemisk immunitet og lokal immunitet i slimhinderne. Resultatet er et immunsvar, der bliver dirigeret fra luftvejene til slimhinden i kønsorganerne, hvor der opnås høje niveauer af sekretorisk immunoglobulin A og af T-celler. Forskningen udføres i samarbejde med Institut for Produktionsdyr og Heste på Københavns Universitet i et projekt sponsoreret af Højteknologifonden.



GeniVac konceptet: Ideen er at kombinere injektion af en klamydia-vaccine i en muskel med en slimhindevaccination i luftvejene, så der både induceres systemisk immunitet og lokal immunitet i slimhinderne – markeret på tegningen med de røde antistoffer. Resultatet er et immunsvar, der bliver dirigeret fra slimhinden i luftvejene til slimhinden i kønsorganerne, hvor der opnås høje niveauer af sekretorisk immunoglobulin A (slgA) og af T-celler, som kan beskytte imod en eventuel klamydiainfektion. Illustration: Henning Dalhoff

Depression: Bedre dyremodeller – bedre medicin

Ifølge Verdenssundhedsorganisationen, WHO, er depression verdens mest belastende sygdom baseret på antallet af år, hvor patienterne må leve med lidelsen. Knap en tredjedel af patienterne har ikke gavn af de nuværende lægemidler. Udvikling af bedre medicinsk behandling kræver adgang til realistiske dyremodeller, som tager højde for de medfødte og miljømæssige faktorer, der kan udløse depression, og som fører til en bedre forståelse af de underliggende biologiske sygdomsprocesser.

Forfattere

Ph.d. Helle M. Sickmann er postdoc på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Cand. Pharm. Tina S. Arentzen

Ph.d. Tim B. Dyrby er gruppeleder for The Diffusion Imaging Group, MR-Forskningssektion, Funktions- og Billeddiagnostisk Enhed, Hvidovre Hospital.

Ph.d. Niels Plath er Head of Department, Synaptic Transmission 1, Lundbeck AIS

Ph.d. Morten P. Kristensen er lektor på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Omkring 17 procent af verdens befolkning rammes i løbet af livet af depression, hvilket har alvorlige konsekvenser for livskvaliteten – ikke blot for patienterne – men også for deres pårørende. Desværre er det kun omkring 70 procent af de diagnosticerede patienter, som har gavn af de nuværende antidepressive lægemidler på markedet, og hele 65 procent af dem, der får depression, vil lide af sygdommen resten af livet.

Depression belaster ikke blot personen mentalt. Sygdommen medfører også store økonomiske konsekvenser, fordi depression kan gøre det svært eller umuligt at passe et arbejde, og når medicinen ikke hjælper, må patienterne ofte indlægges på psykiatriske hospitaler. Derfor er depressive lidelser ligeledes en økonomisk belastning for samfundet som helhed. Hvis det lykkes at forbedre den antidepressive behandling, vil det udover at forbedre livskvali-

teten for en stor gruppe patienter også spare enorme ressourcer.

Udvikling af bedre behandlinger for sindslidelser er kritisk afhængig af, at der findes gode dyremodeller for lidelsen. Det er i disse modeller, vi kan undersøge de underliggende sygdomsmekanismer, identificere nye muligheder for at udvikle bedre behandlingsmetoder og evaluere effektiviteten og sikkerheden af nye lægemidler til sygdomsterapi.

Årsager og sygdomsprocesser

I dag eksisterer der et væld af dyremodeller for forskellige aspekter af depression med hver med deres fordele og begrænsninger. Men generelt er det et problem, at modellerne ikke afspejler en ætiologisk relevant udvikling af symptomerne blandt depressive patienter. Ætiologi betyder årsagslære, og i farmakologisk sammenhæng betegner begrebet summen af de genetiske og miljømæssige faktorer, som kan medvirke til at udløse symptomer.

For at udvikle en ætiologisk relevant dyremodel er det mest hensigtsmæssigt at tage afsæt i de kendte elementer af sygdommens årsager og de biologiske sygdomsprocesser. Depression er et sæt af lidelser, der er kendetegnet ved ændringer i centralnervesystemets funktion, som kan lede til en række fysiologiske og adfærdsmæssige forandringer. Listen af symptomer inkluderer manglende lystfølelse, søvnforstyrrelser, angst, døgnrytmeændringer, reduceret fysisk aktivitet, sløvhed, afvigende stressreaktioner, nedsat libido, vægtforandringer samt følelser af hjælpeløshed og manglende selvværd. De forandringer i hjernefunktionen, som fører til disse diagnostiske symptomer og øvrige karakteristika for depression er imidlertid kun kendt i begrænset omfang. Derfor er det kritisk at opnå en dybere forståelse af de underliggende biologiske sygdomsmekanismer for at kunne udvikle bedre medicin mod depressive lidelser.

Udfordringen for dyremodeller er ikke mindst at inkludere artsrelevante versioner af de forandringer i hjernen, der opstår hos depressive patienter. For at opnå en så realistisk model som muligt har vi valgt at anvende en gnavermodel, som i højest mulig grad afspejler den måde, lidelsen kan udvikle sig på blandt mennesker.

Prænatal stress som dyremodel for depression

Depression betegnes som en stress-relateret lidelse, fordi belastende hændelser, der medfører stress, fx et dødsfald blandt de nærmeste, en alvorlig sygdom eller at blive udsat for vold kan udløse en depressionsepisode. Stress over længere tid, fx pga. jobbet, er imidlertid også en af de faktorer, der kan prædisponere for depression. Samtidig har flere undersøgelser vist, at gravide kvinder, som oplever ekstrem stress, har større risiko for at føde børn, der senere i livet vil udvikle psykiske lidelser såsom depression.

Derfor har vi i forskningssektionen for System Farmakologi indledt et samarbejde med Lundbeck A/S og Hvidovre Hospital med henblik på at undersøge forandringer i adfærd og hjernefunktion i en naturlig dyremodel for depression, der udnytter denne sammenhæng med stress. Det ultimative mål er at blive i stand til at udvikle bedre og mere specifikke lægemidler mod depression. Vi betegner dyremodellen som en naturlig model, fordi den inkluderer nogle af de faktorer, som kan øge risikoen for at udvikle depression blandt mennesker. Den valgte model for depression er en prænatal stressmodel i rotter.

I modellen udsættes gravide rotter for forskellige typer af stressudløsende påvirkninger, stressorer, i den sidste del af graviditeten. Denne periode af graviditeten er valgt, fordi flere af de hjerneregioner, som menes at være påvirkede hos depressive patienter, udvikles i fosteret i den tilsvarende periode i mennesker. De gravide rotter udsættes gennem to uger for en blandet serie af stressorer af kortere eller længere varighed. Nogle eksempler er 15 minutters svømning i et bassin, hvor rotten ikke kan bunde, placering på en forhøjet platform 1 m over jorden, placering i bur med fremmede rotter, eller døgnrytmeændringer via konstant rumbelysning gennem 24 timer.

Stressede rotter har tendens til at tabe sig, og de gravide rotter vejes under graviditetsforløbet for at få et indirekte mål for, om stresspåvirkningen har haft en effekt på dem. Desuden tages der blodprøver på dyrene for at teste, hvorvidt de har forhøjede koncentrationer af kortikosteron, som er det centrale hormon, der medierer organismens stressreaktioner. Kortikosteron svarer til

stresshormonet kortisol i mennesker. Efter rotterne har født, belastes de ikke længere, og ungerne får lov at vokse op til voksenalderen, inden vi undersøger deres adfærd ved hjælp af forskellige metoder til at teste depression.

Stress rammer især hunner

Vi har undersøgt, hvordan unge rotter, som havde været udsat for prænatal stress i fostertilstanden og for akut stress som ungdyr, reagerer i en række standardtests for depressionslignende adfærd i rotter. De adfærdsforandringer, som undersøges gennem disse tests, er generelt aktivitetsniveau, angst og tendens til at give op overfor en udfordring, hvilket er nogle af de almindelige karakteristika for depression. Testen inkluderer desuden en undersøgelse af, hvor villige rotterne er til at bevæge sig ind i et mindre trygt område – rotter foretrækker i uvante situationer at befinde sig i mørke områder og nær vægge – samt en undersøgelse af, hvor aktivt rotterne forsøger at undslippe en uønsket situation i sammenligning med kontrol dyr, der ikke har været udsat for prænatal stress.

Resultaterne af modelforsøgene indikerer, at dyr, der har været udsat for prænatal stress og akut stress, udviser mere angstlignende og opgivende adfærd end rotterne i kontrolgruppen. Af særlig interesse er det, at disse forandringer forekommer i et køns-specifikt mønster. Det er således i højere grad hunrotterne blandt de stresspåvirkede dyr, som udviser depressionslignende adfærdsforandringer. Denne observation er utroligt relevant eftersom depressive lidelser oftere synes at ramme kvinder end mænd. Der er således dobbelt så mange kvinder som mænd, der bliver diagnosticeret med depression.

Den prænatale stress-model tegner dermed til at kunne opfylde forventningerne om at fungere som en god dyremodel for depression, fordi den producerer sammenlignelige adfærdsforandringer i forsøgsdyrene og gør det på kvalitativt samme køns-specifikke måde som hos mennesker.

Vi er derfor i færd med at gennemføre yderligere serier af forsøg i den prænatale stressmodel for depression. Disse inkluderer



Rotteungerne vokser op under normale forhold frem til forsøgene, hvor de som ungdyr udsættes for akut stress. De rotteunger, som blev udsat for stress i fostertilstanden, har større tendens til at udvikle depressionslignende adfærd ved akut stress end rotterne i kontrolgruppen, som ikke har været udsat for prænatal stress. Disse ændringer kan inkludere angst-lignende adfærd, som i rotter kan måles i tests som den, der er vist på billedet. Her kan rotten på den forhøjede platform vælge at opholde sig i de dækkede mørke grene, som opfattes som mest trygge, eller i de åbne og lyse grene af den simple krydsformede labyrint. Hvis forsøgsdyrene i højere grad end kontroldyrene fortrækker de lukkede grene frem for at udforske de åbne grene, anser vi dem for at være mere angst. Illustration: Henning Dalhoff

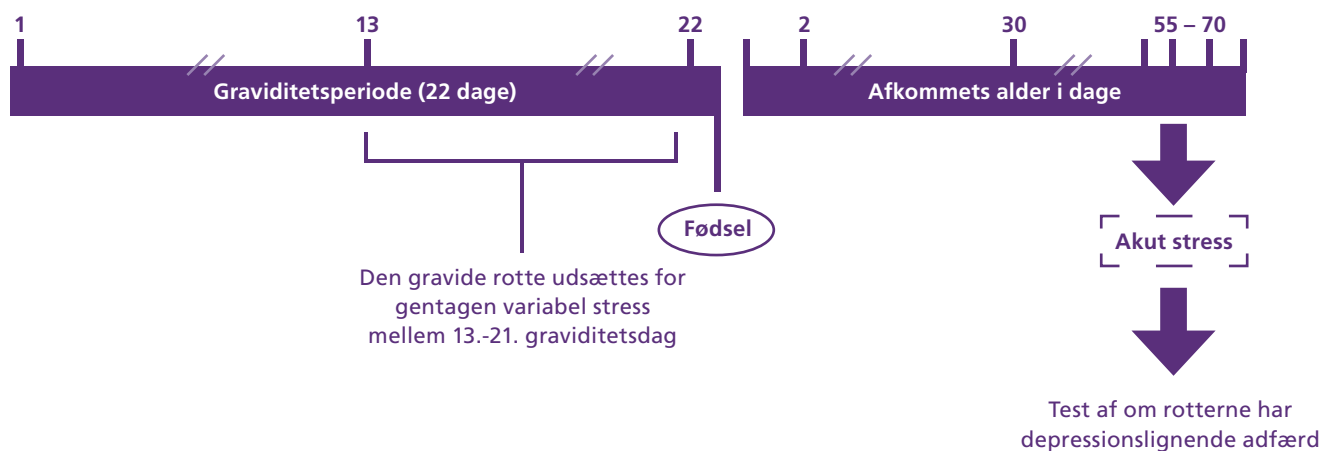


en analyse af søvnmønstre samt undersøgelser af forandringer i hjernens struktur og funktion ved hjælp af magnetisk resonans (MR) billeddannelse, mikroskopi og elektrofysiske målinger af de relevante hjerneområder.

Evaluering af det terapeutiske potentiale

Sammen med vore samarbejdspartnere planlægger vi at udvide vore aktiviteter indenfor dette område i de kommende år på baggrund af de indhøstede resultater. De næste skridt vil inkludere evaluering af det terapeutiske potentiale af nye lægemiddelkandidater i sammenligning med klassiske antidepressive lægemidler i den prænatale stress model.

Desuden vil vi udføre yderligere undersøgelser af konsekvenserne af prænatale påvirkninger for patologien, som ligger til grund for udvikling af depression og andre sindslidelser med henblik på at identificere nye mål for farmakoterapi. Samtidig vil vi udvikle flere ætiologibaserede dyremodeller for underbehandlede sygdomme og lidelser i centralnervesystemet. Ultimativt er det vores ambition at etablere et center for undersøgelse af stressrelaterede lidelser i centralnervesystemet samt udvikling af lægemidler til behandling af sygdommene med udgangspunkt i naturlige dyremodeller. ■



I den prænatale stressmodel udsættes gravide rotter for forskellige typer stressudløsende påvirkninger i den sidste del af graviditeten. Perioden er valgt, fordi de hjernedele, som er påvirkede hos depressive patienter, udvikles hos fosteret i tiden op til fødslen. Figur: Sune Kliborg

Cellemodel af blodhjernebarrieren kan mindske brugen af forsøgsdyr

Blodhjernebarrieren beskytter hjernen mod påvirkninger udefra, men hindrer også lægemiddelstoffer i at komme ind i hjernen. Barrieren er meget tæt, og den indeholder transportproteiner, som aktivt pumper indtrængende stoffer tilbage til blodet. En ny cellemodel af blodhjernebarrieren er næsten lige så tæt som den rigtige barriere og har de samme typer af transportproteiner. Med modellen kan vi, uden brug af forsøgsdyr, undersøge om nye lægemiddelstoffer kan komme ind i hjernen.

Forfattere

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

Ph.d. Hans Christian Cederberg Helms er forskningsassistent på Institut for Farmaci

Cand.scient. Maria Selch Hersom er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci

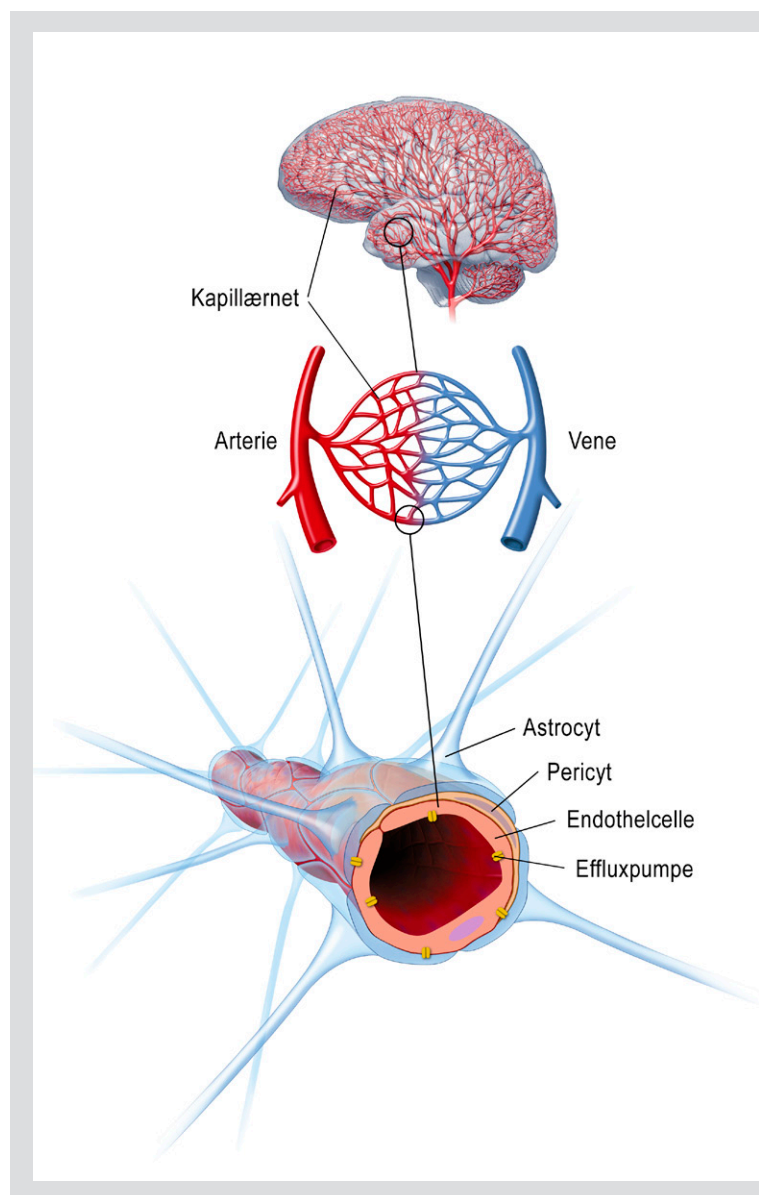
Ph.d. Carsten Uhd Nielsen er lektor på Institut for Farmaci.

Ph.d. Helle Waagepetersen er professor MSO på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Hjernen er kroppens måske vigtigste organ og kan rammes af en lang række sygdomme som kræft, Alzheimers sygdom, Parkinsons sygdom, multipel sklerose og forskellige sindslidelser. Det er i øjeblikket meget svært at behandle disse hjernesygdomme med medicin, fordi de fleste lægemiddelstoffer ikke kan komme ind i hjernen, hvor de skal virke.

Hjernen er nemlig rigtig godt beskyttet mod udefrakommende stoffer. Den er omgivet af kraniet, og derfor kan vi ikke sprøjte lægemidler direkte ind i hjernen uden store gener for patienten. Lægemiddelstoffer skal derfor transporteres ind i hjernevævet via blodet. Men det er heller ikke let. De små blodårer i hjernen er meget tætte og tillader kun, at ganske få stoffer trænger ind i hjernen fra blodet. Ydermere har de små blodårer en masse transportproteiner i deres cellemembraner, hvis rolle er at pumpe stoffer ud af hjernen, de såkaldte effluxpumper. De små blodårer i hjernen kaldes for blodhjernebarrieren, og denne barriere er hovedårsagen til, at det er så svært at behandle hjernesygdomme med lægemidler.

Transport af lægemiddelstoffer over blodhjernebarrieren er et meget stort problem for medicinalindustrien, og det anslås, at op til 95 procent af alle lægemiddelstoffer, som testes til behandling af hjernesygdomme, kasseres på grund af deres manglende evne til at trænge ind i hjernen. Dette gælder i særlig grad for en ny klasse af lovende biologiske lægemiddelstoffer, som er baseret på peptider og proteiner. Disse molekyler er meget store og meget vandopløselige, og det er to egenskaber, som gør passage af blodhjernebarrieren endnu mere vanskelig.

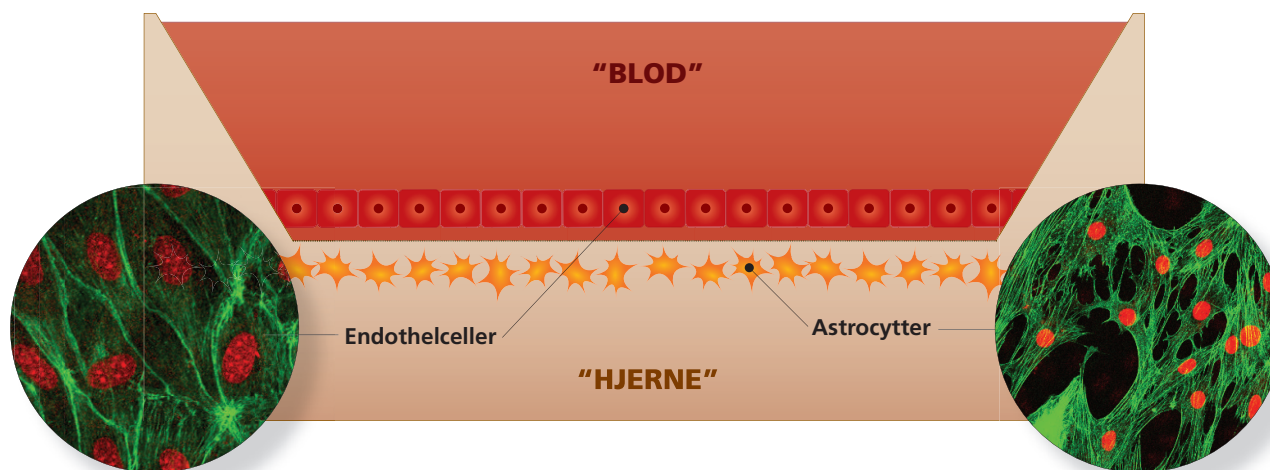


Blodhjernebarrieren udgøres af de mindste blodkar i hjernen; kapillærerne. På blodsiden er kapillærerne foret med endotelceller, som danner selve barrieren. Endothelcellerne er hæftet tæt sammen med proteiner. Barrieren er lukket for de fleste lægemiddelstoffer, og desuden forsynet med effluxpumper i endothelcellernes membraner, som pumper indtrængende stoffer tilbage til blodet.

Astrocyterne, der omgiver blodkarret ind i mod hjernen, frigiver hele tiden signalstoffer, som holder endothelcellerne tætte og udrustede med pumper.

Pericytternes funktion er endnu ikke fuldt forstået.

Illustration: Henning Dalhoff



Grafikken viser cellemodellen af blodhjernebarrieren. Endothelceller og astrocytter dyrkes sammen på et porøst filter. Endothelcellerne dyrkes på oversiden af filtret, hvor de danner en tæt barriere, mens astrocytterne dyrkes under filtret, hvorfra de kan sende signaler til endothelcellerne. Det øverste kammer repræsenterer blodbanen, mens det nederste kammer repræsenterer hjernen. Endothelcellerne (tv.) vokser i et ordnet og tæt monolag, mens astrocytterne (th.) ikke udviser samme orden. Illustration: Jens Raadal

Medicinalindustrien har derfor et stort behov for at kunne afgøre på et tidligt tidspunkt i udviklingsforløbet, om et nyt potentielt lægemiddelstof kan passere gennem barrieren eller ej. Det spørgsmål bliver typisk undersøgt i dyreforsøg. Men både i industrien og i universitetsverdenen har man gennem de sidste to årtier forsøgt at lave mere simple testsystemer til at afklare, om nye lægemiddelstoffer kan trænge ind i hjernen.

Udvikling af kunstige barrierer

Vores forskningsgruppe arbejder med at udvikle blodhjernebarrierevæv i laboratoriet med udgangspunkt i celler isoleret fra dyrehjerner. Vævet kaldes en cellemodel, fordi det modellerer blodhjernebarrieren. Vi bruger cellemodellen til at undersøge, hvordan lægemiddelstoffer trænger ind gennem blodhjernebarrieren samt til fundamentale undersøgelser af, hvordan barrieren fungerer.

Mange forskningsgrupper verden over har forsøgt at fremstille sådanne cellemodeller, men generelt er det ikke lykkedes at få gjort modellerne lige så tætte som den rigtige blodhjernebarriere. Samtidig har det været svært at få modellerne til at danne de effluxpumper som pumper lægemiddelstoffer ud af hjernen. Vi har derfor lagt vægt på at udvikle tætte cellemodeller med høj pumpeaktivitet.

For at kunne forstå, hvordan en cellemodel af blodhjernebarrieren fungerer, er det nødvendigt først at forstå opbygningen af de små blodkar i den intakte hjerne. Her udgør de små blodkar og de celler, som omgiver dem, en kompleks struktur. Væggene i blodkarret består af meget tynde endothelceller, der giver blodkarret dets barrierefunktion. Disse endotelceller er hæftet sammen med proteiner, som danner en uigennemtrængelig zone mellem cellerne. Rundt om endotelcellerne sidder der pericytter, en celletype, hvis funktion endnu ikke er helt klarlagt. Det menes dog, at pericytterne spiller en rolle under dannelsen af blodkarrene og medvirker til reguleringen af endotelcellerne. Endotelceller og pericytter er fuldstændig indkapslet af astrocytter, som er hjælpeceller for nervecellerne i hjernen. Astrocytterne sender udløbere hen til blodkarret og dækker dets overflade ind mod hjernen. Astrocytterne frigiver konstant signalstoffer, som får endotelcellerne til at

forblive helt tætte og udvikle de nødvendige effluxpumper.

Hjernevæv fra dyr

Vi fremstiller cellemodellerne af blodhjernebarrieren ud fra hjernevæv fra dyr. I vores cellemodel dyrker vi endotelceller fra blodkarrenes vægge sammen med astrocytter, som påvirker endotelcellernes vækst. Endotelcellerne får vi fra hjerner fra slagtekvæg. De små blodkar isoleres gennem en oprensningssprocedure, hvor hjernevævet først findeles, derefter filtreres de små blodkar fra, og til sidst behandles blodkarrene med enzymer, der adskiller endotelcellerne fra de øvrige celler, som omgiver blodkarrene. De små stykker af blodkar kan derefter opbevares i flydende nitrogen ved -196°C , indtil de skal bruges. Astrocytterne isoleres fra rottehjerner, hvorpå de dyrkes i store mængder og opbevares -196°C , indtil de skal anvendes.

Cellemodellerne fremstilles ved at udså astrocytter og endotelceller på hver sin side af et permeabelt filter og placere filteret i dyrkningsmedie. Efter seks dages dyrkning med en række næringsstoffer har endotelcellerne lavet et tæt lag af celler under påvirkning af astrocytternes signalstoffer.

Tætsiddende blodkarceller

Vi har udført en række forsøg for at undersøge, om cellemodellen ligner den rigtige blodhjernebarriere i den intakte hjerne. Cellemodellens tæthed har vi bestemt ved at måle den elektriske modstand gennem cellelaget; jo højere modstand, jo større tæthed. Den humane blodhjernebarriere har en elektrisk modstand på $1500\text{--}5000\text{ ohm}\cdot\text{cm}^2$, mens vores modeller har modstande på $600\text{--}2500\text{ ohm}\cdot\text{cm}^2$. Vi har altså ikke opnået helt samme høje modstand som i det intakte hjernevæv, men de værdier, vi har målt for cellemodellen, er blandt de højeste, der er publiceret i den videnskabelige litteratur på feltet.

Vores cellemodeller har også store mængder af proteinet Claudin-5 siddende mellem endotelcellerne. Dette protein, som fungerer som en slags molekylær lynlås mellem cellerne, er ansvarligt for at give blodhjernebarrieren dens ekstreme tæthed og medvirker til at holde små vandopløselige stoffer ude af hjernen.

Fakta om lægemiddelstoffer til hjernen

Lægemiddelstoffer, der kan passere ind i hjernen, er som regel små molekyler med en molekylvægt på under 400 Dalton. Det gælder fx for lægemiddelstoffer som aspirin og cipamil. Også andre biologisk aktive stoffer som nikotin, koffein og tetrahydrocannabinol fra hash trænger ind i hjernen uden problemer. Som regel er de stoffer, som kan trænge ind i hjernen, kendetegnet ved at være lipofile og ved ikke at blive opdaget og pumpet ud af blodhjernebarrierens effluxpumper.

Der findes imidlertid også stoffer, som lukkes ind i hjernen, fordi de ligner næringsstoffer, og som derfor bliver transporteret ind i endotelcellerne af næringsstoftransportører. Dette gælder fx for lægemiddelstoffet L-DOPA, som bruges til behandling af Parkinsons sygdom.

Cellemodel med effluxpumper

Et problem med tidligere cellemodeller har været, at de dyrkede modelvæv ikke har fået indbygget de samme transportproteiner, som findes i den rigtige blodhjernebarriere. Dette gælder i særlig grad for effluxpumperne, som pumper lægemiddelstoffer ud af hjernen.

Vi har nu påvist, at to af de vigtigste effluxpumper i den naturlige blodhjernebarriere, P-glycoprotein og Breast Cancer Resistance Protein, er til stede i vores cellemodel, hvor vi kan undersøge deres transport af lægemiddelstoffer fra hjernen tilbage til blodet. Det er første gang, at man har påvist en aktiv transport af lægemiddelstoffer fra hjerne til blod i en cellemodel fra oksehjerner, og resultaterne er ved at blive færdiggjort og indsendt til publicering.

Ydermere er det lykkedes os at påvise et fænomen i modellen, som tidligere kun er observeret i intakt hjernevæv. Cellemodellen indeholder nemlig transportproteiner, som pumper neurotransmitteren glutamat fra hjernen til blodet. Glutamat er hjernens vigtigste signalstof, men hvis koncentrationen stiger ukontrolleret i hjernevæsken, bliver stoffet farligt for nervecellerne og kan forårsage celledød. Ved hjælp af vores cellemodel har vi kunnet vise, at blodhjernebarrieren aktivt pumper glutamat fra hjernen til blodet, og på den måde er med til at holde koncentrationen af glutamat i hjernevævet lav.

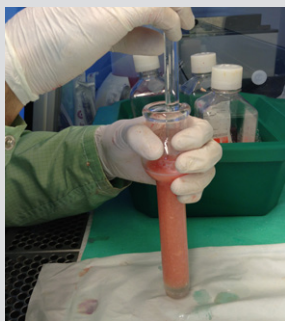
Udvikling af nye lægemidler til hjernen

Vores cellemodel af blodhjernebarrieren afspejler tilsyneladende mange af den rigtige blodhjernebarrieres egenskaber. Derfor har vi nu startet flere mindre projekter, hvor vi anvender modellen til at prøve at forudsige, om lægemiddelkandidater kan komme ind i hjernen. Indtil videre er der dog den begrænsning, at det kræver rigtig meget arbejde at fremstille den kunstige blodhjernebarriere, fordi isoleringen af endotelceller er tidskrævende og kun giver få celler til rådighed. Derfor er det en fremtidig udfordring at udvikle dyrkningsmetoden, så vi kan få store mængder celler at arbejde med.

Når det er sket, vil cellemodellen kunne bruges til screening af nye lægemiddelstofkandidater og til undersøgelser af de mekanismer, som transporterer lægemiddelstoffer ind i hjernen. Det er således vort håb, at den laboratoriedyrkede cellemodel af blodhjernebarrieren vil gøre det nemmere at udvikle ny medicin til behandling af sygdomme i hjernen og centralnervesystemet og begrænse brugen af forsøgsdyr. ■



A



B

Endotelceller til brug i cellemodellen af blodhjernebarrieren udvindes fra oksehjerner **A**. Derefter isoleres og oprenses endotelcellerne **B**. Fotos: forfatterne

Fakta om blodhjernebarrieren

Blodhjernebarrieren er et videnskabeligt slangudtryk for hjernens kapillærer, de mindste blodkar i hjernen. Kapillærerne er cylindriske kar med en diameter på 5-8 μm . Hvis man lægger alle hjernens kapillærer i forlængelse af hinanden vil de have en længde på omkring 650 km, og deres overfladeareal på blodsiden er blevet estimeret til at være mellem 12 og 18 m^2 . Hjernens kapillærer udgør kun 1-2 procent af hjernens totale vægt.

På jagt efter et virkningssted i hjernen

Vore japanske partnere på Yokohama City Universitet har syntetiseret et nyt stof, der kan blokere en gruppe vigtige receptorer i hjernen. Det er de ionotrope glutamat receptorer, som overfører stimulerende nervesignaler til hovedparten af alle nerveceller i hjernen, og som er involveret i alvorlige neurologiske sygdomme. Der var dog usikkerhed om, hvor stoffet binder på receptoren. Derfor kom vi på banen.

Forfattere

Ph.d. Karla Frydenvang er lektor på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

M.Sc. Lina Juknaite er ph.d.-studerende på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Ph.d. Jette S. Kastrup er professor på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Langt de fleste af kroppens signalstoffer og mange lægemidler virker ved at binde sig til receptorer i cellemembraner. En af de vigtigste og mest udbredte grupper af receptorer i hjernen er ionotrope glutamat receptorer. Det er ionkanaler, som åbnes, når signalstoffet glutamat binder sig til dem, hvorpå en strøm af ioner bevæger sig ind i nervecellen.

Receptorerne er interessante, fordi hurtig signalering mellem neuroner via glutamat spiller en vigtig rolle i 80 procent af alle stimulerende synapser i hjernen. Synapserne er det sted, hvor information overføres fra nervecelle til nervecelle. De ionotrope glutamat receptorerers betydningsfulde rolle afspejles også af, at de er involveret i flere alvorlige neurologiske sygdomme, fx Alzheimers sygdom, skizofreni og epilepsi.

Derfor er udvikling af lægemidler, som påvirker receptorerne, et centralt fokusområde for mange universiteter og farmaceutiske virksomheder verden over. På centret GluTarget ved Københavns Universitet er vi omkring 60 forskere, som forsker i ionotrope glutamat receptorer. Det er utroligt givtigt at indgå i et så omfattende forskningsmiljø, og centret har da også banet vej for mange interessante nationale og internationale samarbejder.

Internationalt samarbejde

Den forskning, som vi omtaler her, er et eksempel på et projekt mellem et japansk, et amerikansk og et dansk universitet. I et sådant forskningssamarbejde er det vigtigt med komplementære ekspertiser. Vores partnere på Yokohama City Universitet er spe-

cialister i syntetisk fremstilling af komplicerede stoffer. Disse nye stoffer skal testes for biologisk aktivitet, hvilket vores amerikanske samarbejdspartner har stor ekspertise i. Vi kommer på banen, når man skal finde ud af, hvordan det nye stof binder til receptoren og udøver sin biologiske effekt.

Vores metode går ud på at bestemme den tredimensionelle struktur af receptoren med det nye stof bundet. Hertil anvender vi røntgenkrystallografi, som i bedste fald kan vise kompleksets rumlige form med atomar opløsning, så man kan fastslå arten og placeringen af hvert eneste atom. Denne viden er vigtig for at forstå virkningsmekanismen af det nye stof og åbner samtidig nye muligheder for rationelt design af forbedrede varianter af stoffet.

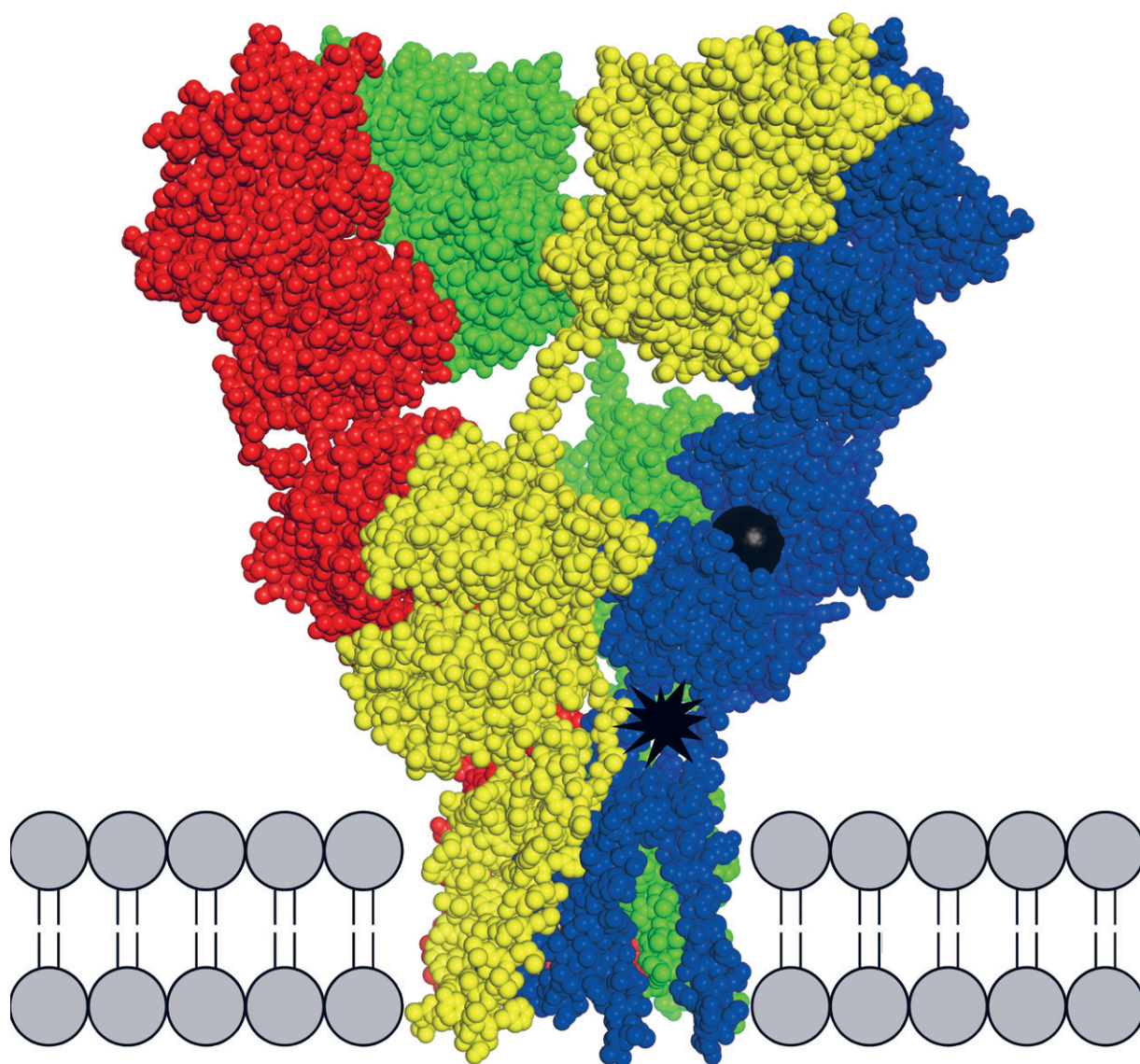
Det stof, som vore japanske kolleger syntetiserede, kaldes IKM159. Stoffet er en antagonist, som har en blokerende effekt på ionotrope glutamat receptorer. Det var dog uklart fra studierne i celler og dyr, om der var tale om en kompetitiv antagonist, som konkurrerer med glutamat om det samme bindingssted på receptorerne, eller en non-kompetitiv antagonist, som binder sig til et andet sted på receptorerne. I dette tilfælde vidste vi altså ikke, hvor stoffet binder på receptoren, og derfor kunne vi ikke helt forstå den biologiske virkning.

Kompetitiv og non-kompetitiv binding

At et stof er en antagonist betyder, at det blokerer for en receptors funktion. En kompetitiv antagonist binder til samme bindingssted på receptoren som det naturlige signalstof; i dette tilfælde glutamat. Stoffet konkurrerer med andre ord med glutamat om pladsen – heraf ordet kompetitiv.

En anden type af stoffer, der også blokerer for receptorens funktion, kaldes non-kompetitive antagonister. Som ordet angiver, at der ikke er tale om konkurrence. Det er karakteristisk for non-kompetitive antagonister, at de ikke binder til det samme bindingssted som det naturlige signalstof.

Derfor gik vi i gang med at bestemme strukturen af den ionotrope glutamat receptor GluA2 med IKM159 bundet. Udfordringen blev ikke mindre af, at det nye stof findes i to spejlbilledformer,



Figuren illustrerer den ionotrope glutamat receptor GluA2. Receptoren er opbygget af fire underenheder vist i forskellige farver. Ionkanalen, som åbnes ved aktivering af receptoren, er placeret i cellemembranen. Bindingsstedet for kompetitive antagonister er vist med en sort kugle. Non-kompetitive antagonister formodes at binde nær cellemembranen, hvilket er angivet med en sort stjerne. Illustration: Forfatterne

som er kemisk ens, men rumligt forskellige som højre og venstre hånd. Da vi startede på projektet, havde vi kun adgang til en lige blanding af de to spejlbilledformer. Vi vidste derfor ikke, om stoffet i det hele taget kunne binde sig til det glutamat-bindende sted på receptoren og heller ikke, hvilken af de to spejlbilledformer, som i givet fald ville binde i bindingsstedet.

Stoffet har to spejlbilledformer

Hvis et stof som IKM159 indeholder et stereogent center, betyder det, at stoffet findes i to spejlbilledformer. Den højrehåndede form kaldes (*R*)-konfigurationen og den venstrehåndede form af stoffet kaldes (*S*)-konfigurationen. Som regel genkender en receptor kun den ene af de to spejlbilledformer. I så fald er receptoren stereospecifik, og det er kun den genkendte spejlbilledform, som er biologisk aktiv.

Da vi krystalliserede den glutamat-bindende del af receptoren med IKM159 bundet, havde vi kun en blanding af de to spejlbilledformer til rådighed. Vores data viste imidlertid tydeligt, at kun

den ene form bandt til receptoren. På basis af strukturen kunne vi konkludere, at den højrehåndede spejlbilledform (*R*)-IKM159 kan binde sig til den glutamat-bindende del af receptoren og at stoffet er en kompetitiv antagonist. Dette står interessant nok i modsætning til signalstoffet glutamat, der binder til receptoren i sin venstrehåndede form.

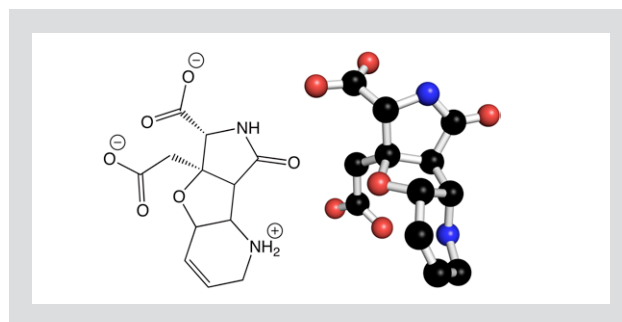
I løbet af projektet lykkedes det for vores japanske samarbejdspartner at syntetisere de to spejlbilledformer af det nye stof hver for sig. Dette var en meget kompliceret syntese, som krævede ikke mindre end 18 syntesetrin. Det er nu også ved studier i celler og dyr vist, at det er (*R*)-IKM159, som er biologisk aktiv.

En stopklods i receptoren

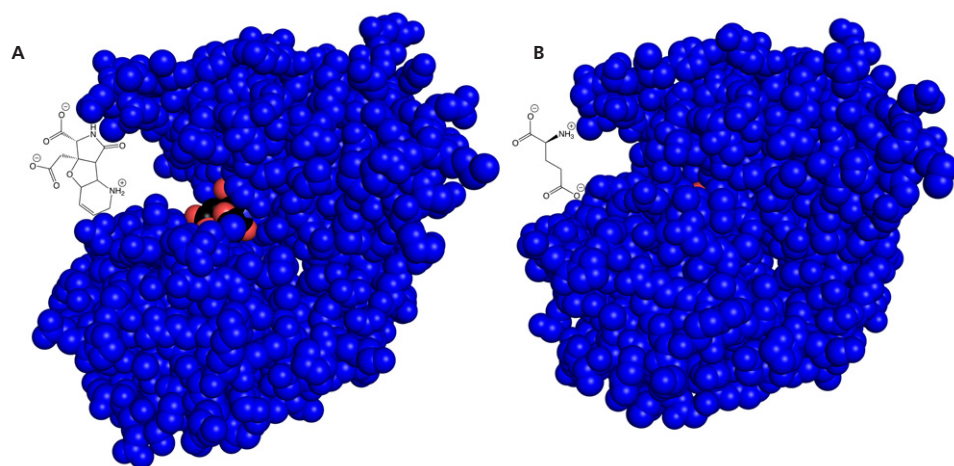
Den højrehåndede form af IKM159 virker i lighed med andre antagonister som en klods i bindingsstedet på receptoren. Når glutamat binder til receptoren, lukker den sig helt sammen om signalstoffet, så man ikke længere kan se det udefra. Man mener, at det er denne bevægelse, der aktiverer receptoren og får

ionkanalen til at åbne. Da (*R*)-IKM159 fungerer som en stopklods for bindingsstedets bevægelse, kommer stoffet til at virke som en antagonist, som blokerer aktiveringen af receptoren.

Strukturen danner nu baggrund for udvikling af ideer til nye stoffer. IKM159 tilhører en strukturelt ny klasse af antagonister, der er selektive for en type af ionotrope glutamat receptorer, som kaldes for AMPA receptorer, og som er medicinsk interessante i forbindelse med behandling af neurologiske sygdomme. IKM159 kan derfor anvendes som grundstruktur for udviklingen af mere potente lægemiddelstoffer, som selektivt blokerer AMPA receptorer. Sådanne selektive antagonister vil have et større terapeutisk potentiale end de i dag kendte stoffer. ■



Stregtegning og tredimensionel model af stoffet IKM159, som blokerer ionotrope glutamat receptorer på nervecellerne. Illustration: Forfatterne



(A) Her ses strukturen af den glutamat-bindende del af GluA2 med IKM159 bundet. Strukturen viser, at det er den højrehåndede spejlbilledform (*R*)-IKM159, som kan binde til receptoren. Stoffet, som er vist i rødt og sort inde i receptoren, sætter en prop i receptoren, hvilket hindrer binding af signalstoffet glutamat. (B) Når glutamat selv er bundet til GluA2 lukker receptoren yderligere sammen, så glutamat kun svagt kan skimtes. Ved binding af glutamat aktiveres receptoren.

Røntgenkrystallografi med synkrotronstråling

En amerikansk gruppe har bestemt strukturen af hele glutamat receptoren GluA2 ved hjælp af røntgenkrystallografi, hvilket tog mere end ti år. Men desværre er detaljeringsgraden lav, hvilket ofte er tilfældet, når der er tale om et membranbundet protein som receptoren. Derfor arbejder vi med en mindre del af receptoren, når vi ønsker at bestemme, hvordan et nyt stof binder til den glutamat-bindende del.

Bindingslomme fremstillet i bakterier

Bindingslommen på receptoren kan fremstilles i kolibakterier ved at indføre et stykke ringformet DNA – et plasmid – i bakterien. Plasmidet indeholder den gen, som koder for den glutamat-bindende del af receptoren. Når bakterierne har produceret denne del af receptoren, er næste skridt at oprense proteinet, hvilket vil sige at fjerne alle andre proteiner og stoffer, som vi ikke er interesseret i. Til sidst krystalliseres receptorens bindingslomme sammen med det nye stof.

Bittesmå krystaller

Krystaller af salt kender vi alle, og dem kan man se med det blotte øje. Krystaller af proteiner måler ofte kun 0,1 mm i diameter, og derfor kan man kun se dem i et mikroskop.

Krystal dyrkning af proteiner er en vanskelig proces, og det gælder især for membranbundne proteiner som de ionotrope glutamat receptorer, fordi disse proteiner har tendens til at ændre deres facon, når de fjernes fra deres naturlige miljø i den fedtholdige cellemembran.

Spredningsmønster viser strukturen

Når det lykkes at fremstille brugbare krystaller, tager vi til et synkrotronstrålingscenter for at samle diffraktionsdata på dem. Synkrotroner er store ringformede accelerators, som fremstiller ekstremt intens røntgenstråling. Når proteinkrystallen belyses med røntgen, spredes strålen i et mønster, som afhænger af atomernes art og placering i proteinet. Ud fra spredningsmønsteret er det muligt at bestemme den detaljerede atomare struktur af proteinet ved hjælp af computerberegninger.

Med denne metode undersøgte vi den glutamat-bindende del af receptoren med det nye stof bundet, og på den måde lykkedes det at se placeringen af de mange tusinder af atomer, som komplekset er opbygget af.



Glutamatdehydrogenase – et nøgleenzym i hjernens energiomsætning

Glutamat er den vigtigste stimulerende neurotransmitter i hjernen, og signalstoffet spiller samtidig en central rolle i hjernens energiomsætning. Enzymet glutamatdehydrogenase, som omsætter glutamat til råstoffer for energiproduktionen, er afgørende for en normal energiomsætning i hjernen, og derfor har vi kortlagt enzymets funktion. Undersøgelserne viser, at enzymet er et interessant mål for udvikling af nye lægemidler, som via påvirkning af glutamatmedierede processer i hjernen kan få gavnlig effekt i alvorlige neurologiske sygdomme.

Forfattere

Ph.d. Malin H. Stridh er postdoc og Marie Curie Fellow på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Ph.d. Kamilla Pajacka er postdoc på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Cand.pharm. Jakob Dahl Nissen er ph.d.-studerende på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Cand.pharm. Camilla Wendel Nielsen er tidligere specialestuderende på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

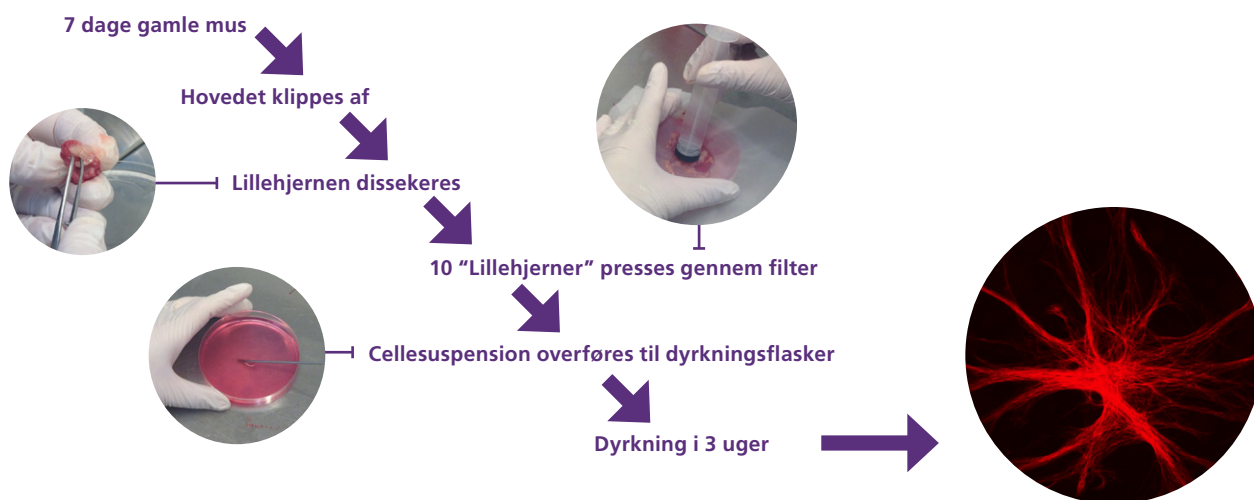
Dr.scient. Arne Schousboe er professor på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Ph.d. Helle S. Waagepetersen er professor MSO på Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi.

Signalstoffet glutamat aktiverer nerveceller, og stoffet er hjernens kvantitativt vigtigste stimulerende neurotransmitter. Men glutamat kan samtidig være et farligt stof. Hvis mængden af glutamat i hjernen bliver for høj, er signalstoffet giftigt for nervecellerne og kan slå dem ihjel. Fejl i glutamat-systemet er involveret i alvorlige neurologiske sygdomme som Alzheimers sygdom, skizofreni og epilepsi, og hvis nervecellerne udsættes for høje koncentrationer af signalstoffet gennem længere tid, kan det medføre irreversibel nervedød.

Som andre neurotransmittere frisættes glutamat fra nerveender, og efter signaleringen inaktiveres signalstoffet i vid udstrækning ved aktiv transport ind i de omkringliggende astrocytter, som er nervecellernes støtteceller i hjernen. Denne mekanisme for inaktivering er unik for glutamat, idet de fleste andre signalstoffer genoptages i nervecellerne. Astrocytterne har en enorm kapacitet til at fjerne glutamat fra synapsen, som er det område mellem nervecellerne, hvor signaloverførsel sker. Derfor kan astrocytterne ofte forhindre, at forhøjede koncentrationer af glutamat forårsager nervedød, fx efter en blodprop i hjernen.

Fjernelsen af signalstoffet fra synapserne via optaget i astrocytterne medfører et konstant behov for, at glutamat gendannes i nerveenderne, hvilket foregår ud fra stoffet glutamin. Astrocytterne omdanner glutamat til glutamin, som derpå føres tilbage til nerveenderne, så signalstoffet kan blive genbrugt i nye signalprocesser. Men dette er ikke astrocytternes eneste anvendelse af



Figuren viser trin for trin, hvordan vi fremstiller cellekulturer af astrocytter, som er nervecellernes støtteceller i hjernen. Figur: Sune Klíborg

glutamat. Astrocytterne benytter nemlig også glutamat som en essentiel brik i hjernens energiomsætning.

Stimulerende signalstoffer kan dræbe nerveceller

Excitatoriske – dvs. stimulerende – nervesignaler fører til depolarisering af den nervecelle, som modtager signalstoffet, hvorpå cellen frisætter sit eget signalstof. Glutamat er hjernens vigtigste stimulerende neurotransmitter.

Excitotoksicitet defineres som overstimulering af neuroner, som fører til nervecellernes død. Glutamat har denne virkning, hvis den extracellulære koncentration i synapsen bliver for høj gennem for lang tid. Det kan fx ske efter hjertestop, en blodprop i hjernen eller på grund af en hjerneskade som følge af en ulykke.

Hjernen kræver masser af energi

Hjernen er et uhyre energikrævende organ, som på trods af sin ringe vægt svarende til ca. 2 procent af kropsvægten står for omkring 20 procent af kroppens samlede energiforbrug. Årsagen er, at hjernen forbruger store mængder energi til at opretholde signalprocesserne i centralnervesystemet, hvoraf signalering ved hjælp af glutamat som nævnt udgør en betragtelig andel. Glukose er langt det vigtigste energisubstrat for hjernen, men dertil spiller glutamat som nævnt en central rolle i energiomsætningen.

Dette er bemærkelsesværdigt set i lyset af, at den aktive transport af glutamat ind i astrocytterne i forening med den efterfølgende omdannelse til glutamin er energikrævende. Balancen mellem disse processer, som sikrer genbrug af glutamat som neurotransmitter, og enzymatisk nedbrydning af glutamat, som frigiver råstoffer til energiproduktionen, er således af største betydning for hjernens normale funktion.

Glutamat indgår i hjernens energiomsætning ved, at en del af stoffet først nedbrydes til ammoniak og α -ketoglutarat, som derpå omdannes videre til produktion af biologisk brændstof – kaldet ATP – i cellernes kraftværker. Omsætningen af glutamat er katalyseret af enzymet glutamatdehydrogenase, som i overve-

jende grad er til stede i astrocytterne. Nye studier i knockout mus, som ikke har glutamatdehydrogenase i hjernen, har vist, at enzymet er kritisk for den normale energiomsætning.

Cellekulturer fra knockout mus

I knockout musene er det gen, som koder for glutamatdehydrogenase, blevet inaktiveret ved hjælp af genteknologi. Vi har fået adgang til musene via professor Pierre Maechler fra Universitetet i Geneve, og vi har således fået mulighed for at fremstille primærkulturer af astrocytter fra knockout musenes hjerner. Disse astrocytter danner ikke glutamatdehydrogenase, og vi kan derfor sammenligne deres stofskifte af glukose og glutamat med stofskiftet i tilsvarende celler fra normale mus. Undersøgelserne udføres ved at mærke glukose og glutamat med stabilt kulstof-13 og radioaktivt kulstof-14, hvilket tillader detaljerede studier af stoffernes metaboliske omsætningsveje.

Knockout mus, som ikke danner glutamatdehydrogenase, har en lavere koncentration af glukose i hjernen end de normale kontrolmus. Vores forsøg har desuden vist, at astrocytter fra knockout musene producerer mindre mængder kuldioxid ud fra glukose til brug i hjernens energistofskifte end astrocytter fra kontrolmusene. Den nedsatte produktion ser ud til at blive kompenseret ved at øge omsætningen af glukose til laktat, men denne omsætning af glukose er langt mindre effektiv end den normale omsætningsvej. Derfor er den observerede lavere koncentration af glukose i hjernen fra knockout musene formentlig et udtryk for, at der er behov for et større forbrug af glukose for at producere den nødvendige mængde energi. En mulig forklaring på den nedsatte glukoseomsætning i knockout musene er, at der er mangel på α -ketoglutarat, som i normale dyr dannes gennem den enzymatiske omdannelse af glutamat via glutamatdehydrogenase. α -Ketoglutarat er nødvendigt for, at glukose kan nedbrydes til kuldioxid.

Hjernens produktion af brændstof

Cellernes kraftværker kaldes mitokondrier, og de producerer biologisk brændstof i form af ATP, der fungerer som benzin i en motor og leverer energi til de biologiske processer i cellerne. Den primære generator til ATP-produktionen er en samling af kemiske reaktioner, som kaldes for citronsyrecyklus.

Vi har undersøgt isolerede mitokondrier fra knockout musene og fundet, at deres evne til at producere ATP via denne cyklus er

væsentligt forringet i forhold til mitokondrier isoleret fra kontrolmusene. Et andet vigtigt resultat fra studierne af cellekulturerne med astrocytter fra knockout musene er, at deres indhold af glutamat og aspartat er øget sammenlignet med celler dyrket fra normale mus. Da både glutamat og aspartat er neurotoksiske i for høje mængder, kan en forhøjet koncentration af disse to aminosyrer i astrocytterne få fatale konsekvenser for nervecellerne, hvis iltforsyningen svigter, fx i forbindelse med en blodprop i hjernen.

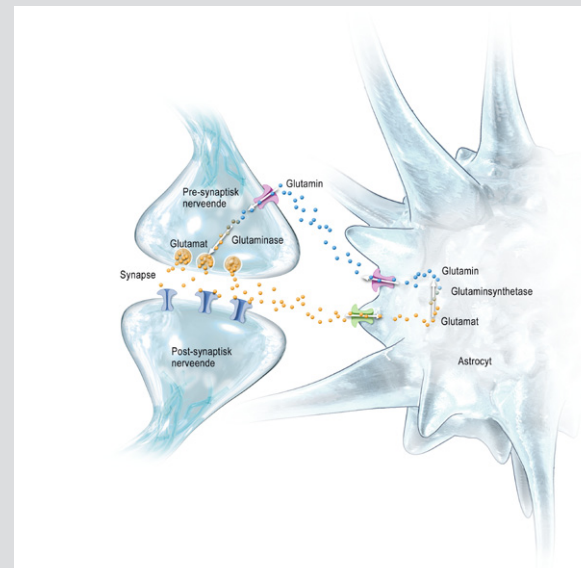
Hvad er så forklaringen på, at knockout musene har forhøjet koncentration af både glutamat og aspartat i hjernen? I normale astrocytter kan glutamat blive metaboliseret fuldstændigt til kuldioxid, vand og ammoniak via enzymet glutamatdehydrogenase og citronsyrecyklus. I cellerne fra knockout musene, som mangler enzymet, omsættes glutamat til aspartat ved anvendelse af kun en del af citronsyrecyklus. Denne omsætning af glutamat producerer kun en tredjedel af den energi, som en fuldstændig cyklus kan præstere ved komplet omsætning af glutamat under medvirken af glutamatdehydrogenase.

Enzymet er vigtigt ved energimangel

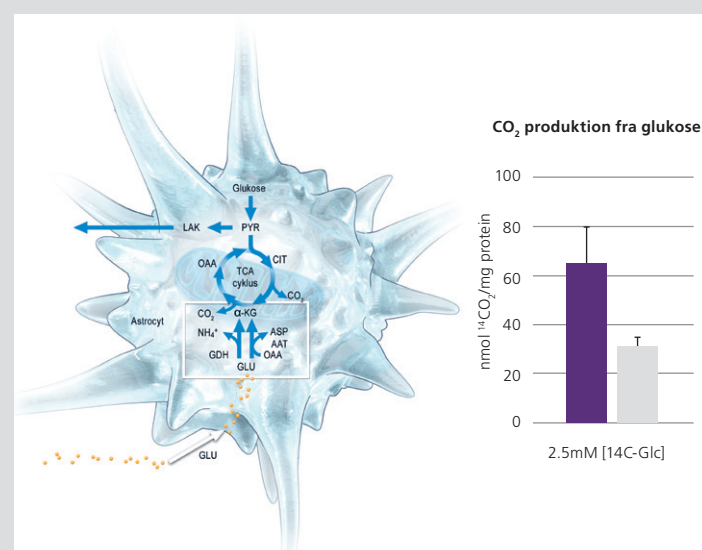
Astrocytter med normal enzymaktivitet kan ved hjælp af glutamatdehydrogenase øge omsætningen af glutamat og producere råstoffer til brug i energistofskiftet i kritiske situationer, hvor niveauet af glukose i hjernen er for lavt. Vore studier har vist, at astrocytter uden glutamatdehydrogenase ikke er i stand til det. Overraskende nok kan de heller ikke opregulere den del af citronsyrecyklus, der fører til produktion af aspartat, ved lave niveauer af glukose. Dette tyder på, at glutamatdehydrogenase er vigtigt for at kunne hæve aktiviteten i citronsyrecyklus, når der opstår mangel på glukose i hjernen.

På baggrund af de eksperimentelle fund fra knockout musene kan vi konkludere, at glutamatdehydrogenase spiller en meget væsentlig rolle for at opretholde en normal metabolisme af glutamat i hjernen. Endvidere er enzymet øjensynligt af betydning for en optimal funktion af mitokondrierne og dermed for glukoseomsætningen og energiproduktionen.

Da glutamat er både en livsnødvendig neurotransmitter og et potentielt neurotoksisk stof, er det oplagt, at kontrol af enzymet glutamatdehydrogenase er vigtigt i medicinske sammenhænge. Derfor er enzymet et interessant mål for lægemidler, som kan få terapeutisk effekt ved påvirkning af den glutamatmedierede neurotransmission, der indgår i mange alvorlige neurologiske sygdomme. ■



Figuren illustrerer glutamat-glutamin cyklus, som er en essentiel proces i glutamats stimulerende nervefunktion: Den præ-synaptiske nervecelle frisætter signalstoffet glutamat (orange kugler), som påvirker receptorerne i den post-synaptiske nervecelle. Efter signaleringen optages glutamat af astrocytten, der omdanner glutamat til glutamin, som frisættes fra astrocytten. Glutamin optages nu af den præ-synaptiske nervecelle, der gendanner glutamat fra glutamin. Glutamat er klar til igen at være neurotransmitter. Illustration: Henning Dalhoff.



Glutamat (GLU) kan efter optagelse i astrocytten indgå som en essentiel brik i cellens energiomsætning via citronsyrecyklus (TCA), som finder sted i cellernes kraftværker, mitokondrierne. Indenfor den hvide ramme illustreres omdannelsen af glutamat til metabolitten α -ketoglutarat (α -KG) i citronsyrecyklus. Omdannelsen katalyseres enten af enzymet glutamatdehydrogenase (GDH) eller af enzymet aspartataminotransferase (AAT). I sidstnævnte tilfælde sker der ligeledes en omdannelse af oxaloacetat (OAA) til aspartat (ASP). Citronsyrecyklus danner samtidig adskillige andre metabolitter, deriblandt oxaloacetat (OAA) og citrat (CIT). Omsætningen af glukose til kuldioxid, der fører til energiproduktion i mitokondrierne, finder ligeledes sted via citronsyrecyklus. Søjlediagrammet illustrerer vores opdagelse af, at produktionen af kuldioxid og energi fra glukose er nedsat i astrocytter fra knockout mus (grå søjle), som ikke indeholder glutamatdehydrogenase, sammenlignet med astrocytter fra normale kontrolmus (lilla søjle).

Illustration: Henning Dalhoff og Sune Kliborg

Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet
Københavns Universitet
Blegdamsvej 3B
2200 København N

Tel. 3532 7900
www.sund.ku.dk

Mød os on/offline

Lægemiddelforskning

Vidste du, at du kan finde alle tidligere årgange af Lægemiddelforskning 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 med 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