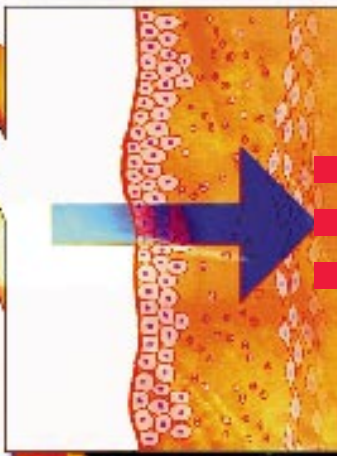


LÆGEMIDDELFORSKNING

1 9 9 8



DANMARKS

FARMACEUTISKE

HØJSKOLE



Indhold

1. Forskningscentre og forskerskole på Danmarks Farmaceutiske Højskole <i>Af Povl Krosgaard-Larsen, Arne Schousboe og Sven Frøkjær</i>	2
2. Fremtidens lægemidler rummer etisk og socialt sprængstof <i>Af Claus Moldrup og Janine Marie Morgall</i>	6
3. Lægemidler vej til nervecellernes gener <i>Af Jens D. Mikkelsen</i>	8
4. Måling af nervecellers lynhurtige signaler <i>Af Tue Banke, John Lambert og Arne Schousboe</i>	10
5. Mulighed for diagnostik af neurodegenerative sygdomme <i>Af Aase Frandsen og Arne Schousboe</i>	12
6. Nyt angrebepunkt for lægemidler mod Alzheimers syge <i>Af Bente Frølund, Bjarke Ebert, Uffe Kristiansen, Erik Falch og Povl Krosgaard-Larsen</i>	14
7. Effektiv syntese af neuroaktive naturstoffer <i>Af Kristian Strømgård, Kim Andersen og Jerzy W. Jaroszewski</i>	16
8. Nitrogenoxid - et lille signalstof med stor betydning <i>Af Martin Lauritzen</i>	18
9. Kan man forudsige biotilgængelighed? <i>Af Betty Lomstein Pedersen, David Ilardia og Henning Gjelstrup Kristensen</i>	20
10. Måling af lægemiddelstoffers opløsning i mave-tarmkanalen <i>Af Lisbet Bønløkke og Henning Gjelstrup Kristensen</i>	22
11. Smarte polymerer fører lægemiddelstoffet mod målet <i>Af Flemming Madsen</i>	24
12. Medicinsk behandling af Føllings sygdom <i>Af Mette Ingemann, Sven Frøkjær, Lars Hovgaard og Helle Brøndsted</i>	26
13. Depoteffekt efter injektion <i>Af Dorrit Høj Larsen, Susan Weng, Karin Fredholt, Gitte Juel Fries og Claus Selch Larsen</i>	28
14. Model for mundslimhinden kan reducere forbruget af forsøgsdyr <i>Af Hanne Mørck Nielsen og Margrethe Rømer Rassing</i>	30
15. Membranbiofysik og målrettede lægemidler <i>Af Kent Jørgensen, Ole G. Mouritsen, Sven Frøkjær og Charlotte Vermehren</i>	32
16. Virus vej ind i cellerne <i>Af Klaus Bahl Andersen, Katharina E. P. Olsen, Stine Willemann og Gitte Schmidt</i>	34
17. Regn med vand! <i>Af Tommy Liljefors, Per-Ola Norrby, Jonas Boström og Peter Aadal Nielsen</i>	36
18. Selektive metoder kan vise effekten af selentilskud <i>Af Bente Gammelgaard, Ole Jøns og Ulrik Sidenius</i>	38
19. Medicinmandens midler mod sneglefeber <i>Af Per Mølgaard og Else Lemmich</i>	40
20. Ingen magisk kugle mod smerter <i>Af Bjarne Fjalland og Bjarke Ebert</i>	42
21. Celletelekomunikation og kræft <i>Af Christina Kasper, Hanne Rasmussen og Ingrid Kjølter Larsen</i>	44
22. Farmaceuter under liberalisering <i>Af Anna Birna Almarsdóttir og Janine Marie Morgall</i>	46

Forskningscentre og forskerskole på Danmarks Farmaceutiske Højskole

Alle forskningsprojekter ved DFH vedrører lægemidler. Spektret spænder fra basale biologiske, biokemiske og kemiske studier til integrerede lægemiddelprojekter med fokus på rationelt design af lægemidler og målrettet transport til virkningsstedet i kroppen. Forskningen gennemføres primært i de tværinstitutionelle centre *PharmaBiotec*, *NeuroScience* og *Drug Design and Transport*. Forskerskolen *Graduate School of Drug Research* fungerer som en integrerende overbygning på de tre forskningscentre.

Af Povl Krosgaard-Larsen, Arne Schousboe og Sven Frøkjær

Udvikling af et nyt lægemiddel er en uhyre kompliceret og omkostningskrævende proces, hvor de samlede udgifter typisk vil være 1-2 milliarder kroner. Dertil kommer, at forskning i nye lægemidler er stærkt risikobetonet, idet forsknings- og udviklingsprojekterne på alle stadier af processen, ikke mindst i de seneste udviklingsfaser, kan bremses eller stoppes af uforudsigelige problemer.

Men der er et stort behov for nye typer af lægemidler. Mange alvorlige sygdomme kan i dag kun behandles symptomatisk, og for adskillige sygdomme med stærkt invaliderende eller dødeligt forløb gælder det, at der ikke findes lægemidler hverken til symptomatisk eller helbredende behandling.

I løbet af det seneste årti er vores viden om de biokemiske og fysiologiske defekter i - og mulige årsag til - en række alvorlige sygdomme imidlertid vokset eksplosivt. Denne udvikling afspejler, at det med molekylærbiologiske teknikker har været muligt at belyse og forstå et væld af komplicerede processer i såvel raske som syge celler. Samtidigt sker der nu i hastigt tempo en kortlægning af arvematerialets samlede struktur og de enkelte geners rolle i både den velfungerende og den sygdomsramte organisme. Muligheder-

ne for at identificere den eller de primære årsager til sygdomme med en endnu ukendt årsag er bedre en nogensinde før.

I mange sygdomme er der afdækket adskillige mekanismer, som ikke fungerer normalt og endnu flere regulerende processer og biomolekyler, som muligvis med held kan påvirkes med henblik på at bringe afsporede processer tilbage på skinne igen. Men hvordan identificerer man nøgleprocesserne blandt disse ofte mange muligheder? Hvordan kan man vurdere mulighederne for at påvirke disse processer på gunstig måde? Og hvordan designer man et lægemiddel, der virker efter hensigten og desuden er i stand til at trænge frem til det sygdomsramte sted i organismen uden at forstyrre processer i den raske del af organismen?

Disse mangfoldige muligheder skaber både håb og frustration blandt lægemiddelforskere. Men der skal vælges og træffes beslutninger. Mulighederne for fejlurdering er mange, og hvert valg af terapeutisk indfaldsvinkel kræver omfattende og kostbar forskning. Det er nødvendigt at mobilisere alle relevante forskningsressourcer, og specielt i et lille land som Danmark er opgaverne ofte uoverkommelige selv for de forskningstunge medicinindustrier. Disse forhold har med bedste voksne styrke aktualiseret behovet for integreret samarbejde mellem de universitære institutioner og medicinindustrien.

DFH har som centrum for den akademiske lægemiddelforskning

her i landet været i frontlinien i denne situation, og forskere ved DFH har på et tidligt tidspunkt taget alvorligt fat på disse store og spændende udfordringer. I dag ser vi de foreløbige resultater af disse initiativer i form af tre lægemiddelorienterede forskningscentre centreret om og ledet fra DFH samt en netop bevilliget forskerskole til samordning og internationalisering af forskeruddannelsen inden for eller i forbindelse med centerforskningen.

Neuro-bioteknologisk lægemiddelforskning

PharmaBiotec centret blev etableret allerede i 1987 med en bevilling fra statens bioteknologiske forskningsprogram. Centret, der omfatter forskningsgrupper fra DFH, og universiteterne i København, Aarhus og Odense, blev opbygget og har siden været ledet af forskere på DFH. Centret har i alt været gennem tre internationale evalueringsprocesser og nærmer sig nu sin 12-års fødselsdag. Fra begyndelsen af 1995 har PharmaBiotec kørt med et budget bestående af basismidler (forskningsgrupperne på DFH) og såkaldt fleksible midler (forskningsgrupperne uden for DFH); men på trods af denne ret komplicerede budgetstruktur fungerer centret meget effektivt og forbereder sig på den fjerde evalueringsrunde sidst i 1998.

PharmaBiotec har været og er fortsat rammen om et netværk af samarbejdsprojekter, som har givet resultater i form af publikationer og patenter, der på flere områder har

sat stærke præg på den internationale forskningsfront, primært på neuroområdet. Centeraktiviteterne har været formidlet bl.a. i DFH's "Lægemiddelforskning" og gennem årlige centersymposier. Centerprojekterne har både direkte og indirekte involveret et betydeligt antal forskningsgrupper på DFH, hvis resultater bl.a. gennem engelsksprogede fremstridsrapporter er bragt ud til forskerkolleger over hele verden. PharmaBiotec er i dag kendt og anerkendt i den internationale forskningsverden.

Selv om PharmaBiotec bevillingerne i hele perioden udelukkende har været givet til akademiske forskningsgrupper, har centrets styringsgruppe fra starten også omfattet forskningsledere fra industrien. Deres medvirken har været af stor betydning for centrets funktion og udvikling og har bidraget til, at langt hovedparten af centerprojekterne i dag har karakter af integrerede institutions-/industriprojekter, som er i konstant udvikling. PharmaBiotec har udviklet sig til en central platform for næste fase i etableringen af danske centre for integrerede akademiske og industrielle forskningsprojekter.

Strategisk forskning

I perioden 1993-1995 blev der i samspil mellem Erhvervsministeriet, Forskningsministeriet og Statens Sundhedsvidenskabelige Forskningsråd gennemført flere moderækker med deltagelse fra industrien og enkelte forskere fra de universitære



Dr. pharm Povl Krosgaard-Larsen er professor ved Institut for Medicinal kemi.

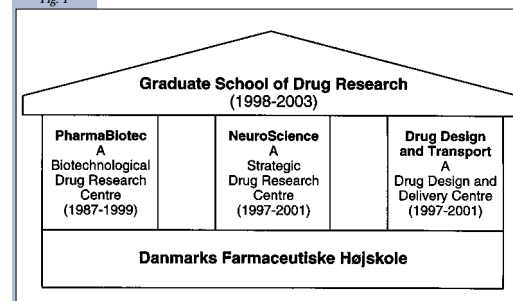


Dr. scient Arne Schousboe er professor ved Institut for Farmakologi.



Cand. pharm., ph.d. Sven Frøkjær er professor ved Institut for Farmaci.

Fig. 1



En skematisk illustration af de tre tværinstitutionelle forskningscentre centreret om og ledet fra DFH. Centrenes forskningsprogrammer fokuserer på forskellige aspekter af lægemiddelforskning. Centerforskningen er komplementær til DFH's øvrige forskning og er på væsentlige områder integreret med denne. Forskeruddannelsen udgør et centralt element i centerforskningen, og aktiviteterne samordnes og internationaliseres inden for forskerskolen, hvortil alle ph.d.-studerende, som opfylder vedtagne kriterier, kan tilknyttes.

institutioner, herunder DFH, med henblik på at kortlægge industriens behov for strategisk forskning. Disse møder behandlede i stigende grad spørgsmål vedrørende forsknings-samarbejde mellem industrien og institutionerne samt et bredt spektrum af relaterede spørgsmål, bl.a. vedrørende patenter.

Resultatet var, at der på finansloven for 1997 blev afsat midler til 3-4 forskningscentre for integreret institutions-/industri-samarbejde inden for strategisk vigtige områder, herunder neuro-medicinindustrien. Dette førte efter international evaluering til etablering af Neuroscience-centret pr. 1. januar 1997, foreløbigt for en 5-års periode. Budgetstrukturen var kompleks med en bevilling fra staten og medfinansiering fra deltagende medicinindustri og institutioner.

NeuroScience-centret er struktureret som tre delcentre, de to med projektkoordinatorer fra henholdsvis H. Lundbeck A/S og NeuroSearch A/S og det tredje udelukkende med deltagelse af akademiske forskningsgrupper, koordineret fra DFH. Hele centret ledes fra DFH. Efter forudsigelige begyndervanskeligheder er projekterne nu i meget frugtbar udvikling, og forskeruddannelsen, som er det centrale element i centret, er nu næsten fuldt ud etableret og udvikler sig tilfredsstillende.

Hvad er det så, der kendetegner de integrerede aktiviteter inden for NeuroScience-centret? Jo, forskningsprojekterne sigter mod at skabe resultater, som vil kunne videreudvikles til lægemidler i medicinindustrien. De akademiske forskere arbejder imidlertid ikke med løsning af

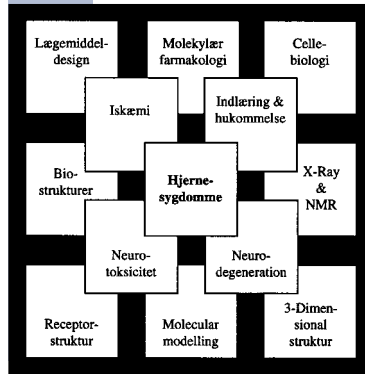
konkrete opgaver for industrien eller med udviklingsprojekter. Der er tale om forskning på højt internationalt niveau. Særligt perspektivrige resultater patenteres og publiceres efterfølgende. Der er hverken fra akademisk eller industriel side interesse i, at universitære forskere løser konkrete opgaver.

Forskere fra institutionerne og industrien deler i de fleste tilfælde vejledningen af ph.d.-studerende, og de fleste ph.d.-studerende får et forskningsophold af kortere eller længere varighed i industrien. Denne næste generation af forskere bliver uddannet til at kunne yde en solid indsats med hensyn til innovativ lægemiddelforskning i samspil med andre grupper af akademikere.

Design og transport af lægemidler

Et andet resultat af diskussionen mellem Erhvervsministeret, Forskningsministeret, Statens Sundhedsvidenskabelige Forskningsråd, repræsentanter fra den danske medicinindustri og DFH blev etableringen af

Fig. 3



NeuroScience-centrets forskningsprogram er stærkt interdisciplinært og integreret. Forskningen er rettet mod de meget alvorlige og samfunds-økonomisk ressourcekrævende sygdomme, som skyldes neurodegenerative processer i hjernen. Et eksempel er Alzheimers syge, som er karakteriseret ved tab af hukommelse og evne til indlæring. Ingen af de neurodegenerative sygdomme kan i dag behandles effektivt; men inden for rammerne af NeuroScience-centret udfoldes der bestrebelse på at designe og udvikle effektive lægemidler på rationel grundlag. De vigtigste forskningsdiscipliner i disse projekter er anført i figuren.

"Centre for Drug Design and Transport" i november 1997.

Centret består af syv projektgrupper med finansiel støtte fra Statens Sundhedsvidenskabelige Forskningsråd, en række medicinvirksomheder og akademiske institutioner. Også dette center ledes fra DFH. Det overordnede mål er at undersøge nye principper for design og transport af lægemiddelforhold. Dette sker ved integreret forskningsindsats indenfor organisk kemi, medicinalkemi, membranbiofysik, membrantransport, farmaci samt farmakologisk, dermatologisk og klinisk forskning. Deltagerne i centret er DFH, Danmarks Tekniske Universitet, PET Center ved Århus Kommunehospital, Center for Billeddiagnostik og Medikoteknik ved Rigshospitalet, Dermatologisk afdeling på Gentofte Amtssygehus og Dumex-Alpha A/S, H. Lundbeck A/S, Lovens Kemi-ske Fabrik, Novo Nordisk A/S, Nycomed Pharma A/S og NeuroSearch A/S.

En væsentlig del af PharmaBiotec-centrets forskning er rettet mod hjernens signal-systemer og især mod de overordnede signalstoffer, der stimulerer og hæmmer nervecellernes aktivitet. Ubalance mellem stimulerende og hæmmende signaler i hjernen medfører en række alvorlige sygdomme. Et grundlæggende kendskab til nervecellernes kommunikation i såvel raske som syge hjerner, kan gøre det muligt at udvikle specifikt virkende lægemidler til sygdomme i hjernen.

Fig. 2



Foto: Aksel Oye/Bioloto.

Ligesom i NeuroScience-centret lægges der her stor vægt på forsker-uddannelsen samt på, at projekterne er interdisciplinære og involverer både de deltagende akademiske institutioner og medicinindustrien.

Nyetableret forskerskole

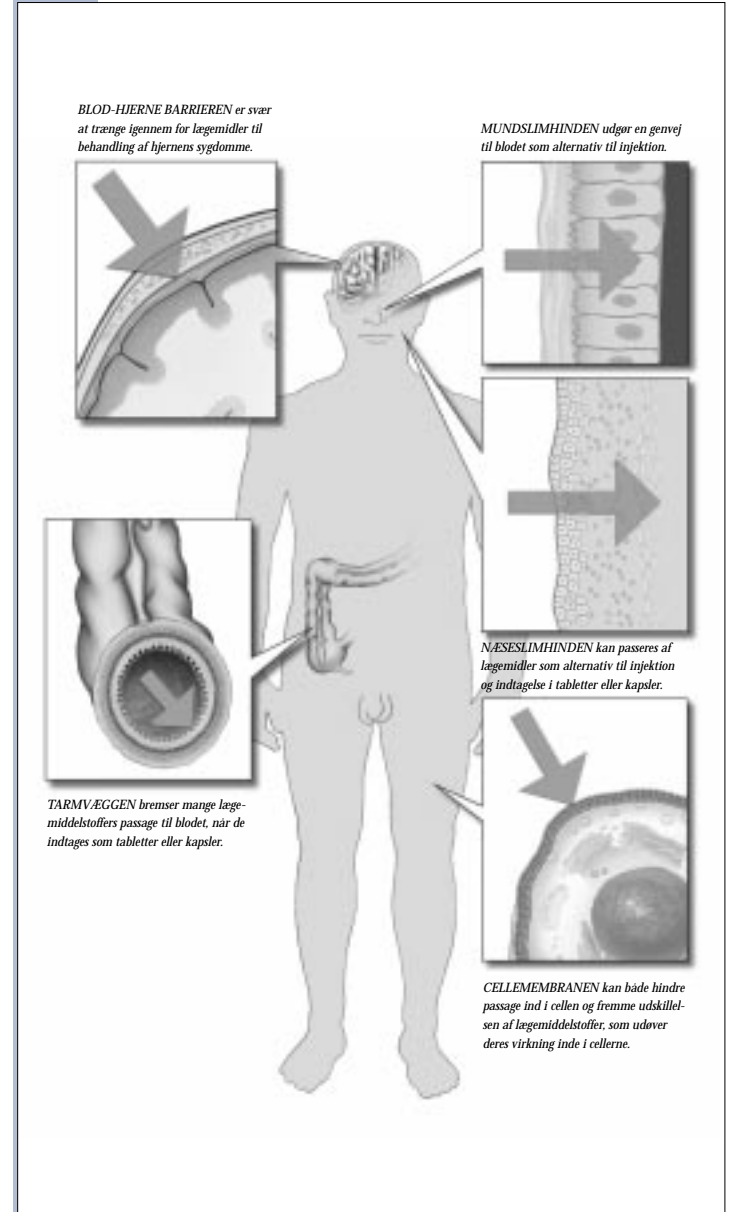
Som nævnt i det foregående, lægges der afgørende vægt på integreret forskeruddannelse ved de tre forskningscentre. Det indebærer, at ph.d.-projekterne bliver væsentlige brikker i centrenes forskningsprogrammer, og i hele forskningsstrukturen udgør disse projekter dynamiske og fleksible delelementer. Som led i forskeruddannelsen følger de ph.d.-studerende som bekendt et antal teoretiske og eksperimentelle kurser, udvalgt således at de både styrker forskeruddannelsens dybde og bredde.

I 1998 besluttede Forskerakademiet at imødekomme en ansøgning fra DFH om oprettelse af en forskerskole, Graduate School of Drug Research, i tæt tilknytning til forskningscentrene. Skolens overordnede mål er at styrke det internationale aspekt af forskerkurserne og generelt at hæve det videnskabelige niveau af disse kurser i en sådan grad, at forskerskolen får karakter af "School of Excellence". Forskerskolen, som officielt startede 1. september 1998 med en formaliseret ledelsesstruktur, modtager økonomisk støtte til invitation af udenlandske videnskabelige personligheder som foredragsholdere i forbindelse med ph.d.-kurserne og som inspirerende diskussionspartnere for de ph.d.-studerende.

Ph.d.-studerende under centrene vil normalt være tilknyttet forskerskolen. Endvidere vil forskerskolen være åben for andre ph.d.-studerende ved DFH eller andre institutioner eller virksomheder, forudsat at de opfylder vedtagne kriterier. Forskerskolens ph.d.-studerende har normalt både akademiske og industrielle vejledere og skal følge tre ph.d.-kurser, som er centrale for moderne lægemiddelforskning og udvikling, og de skal så vidt muligt opholde sig ved et forskningslaboratorium i medicinindustrien i en periode af normalt 3-6 måneder. Der vil blive etableret overgangsordninger for ph.d.-studerende, som er langt fremme i deres ph.d.-studium.

Efter tildeling af ph.d.-graden vil disse juniorforskere få tildelt et certifikat udstedt af forskerskolen, bl.a. som vidnesbyrd om, at de i forbindelse med forskeruddannelsen har fået indsigt i og erfaring med integreret akademisk/industriell lægemiddelforskning.

Fig. 4



En væsentlig del af forskningen inden for Centre for Drug Design and Transport er koncentreret om undersøgelser med henblik på at forbedre lægemiddelforsknings transport over biologiske barrierer som tarmvæggen, blod-hjernebarrieren, mundslimhinden eller næseslimhinden. Desuden er det i mange tilfælde nødvendigt med særlige tiltag for at opnå, at lægemiddelforholdene krydser cellemembranerne og trænger ind i cellerne, hvor de skal virke.

Fremtidens lægemidler rummer etisk og socialt sprængstof

Nye lægemidler kan udover at helbrede eller lindre også have sociale, samfundsøkonomiske og etiske konsekvenser. Grænserne for behandling udvides, og brugergruppen vokser tilsvarende. Tænk blot på medicin mod depression, impotens og rykker. I de kommende år bliver det muligt at optimere normale menneskers evner, f.eks. hukommelsen. Men hvor går grænsen? Og hvad bliver de sociale, samfundsøkonomiske og etiske konsekvenser?

Af Claus Moldrup og Janine Marie Morgall

Ved Institute for Alternative Futures i Washington DC, hvor Claus Moldrup netop har afsluttet et to måneders forskningsophold, inddeles fremtidens sygdomme i tre hovedgrupper: akutte, kroniske og kontekstuelle. Det er sygdomme, som manifesterer sig fysisk, men som rummer psykologiske eller sociale aspekter. Typiske eksempler er depression, impotens og nervøs spisevægring. Kontekstuelle sygdomme forventes at blive den største medicinske udfordring i det 21. århundrede, og der er allerede flere illustrative eksempler på nye lægemidler til behandling af dem: Fontex® mod depression, Viagra® mod impotens, Ritalin® til behandling af hyperaktivitet og manglende koncentrations-evne samt Letigen®, der anvendes til at afhjælpe svær overvægt.

Studier viser, at de sociale, samfundsøkonomiske og etiske konsekvenser ved anvendelse af lægemidler især udspilles i forbindelse med kontekstuelle sygdomme. Da der fokuseres mere og mere på disse sygdomme, vil andelen af etiske og samfundsøkonomiske konsekvenser øges tilsvarende. Samtidig må man forvente, at kriterierne for, hvem der bør behandles, vil blive udvidet. I USA ser

man allerede tendensen. F.eks. anvendes Viagra® af mænd, som ikke er decideret impotente, ja sågar af kvinder. Fontex® bruges af mennesker, som ikke lider af en egentlig depression, og Ritalin® anvendes til 40% af skolebørnene i Boston.

På den baggrund bør Lægemiddelstyrelsen, Institut for Medicinsk Teknologivurdering, universiteterne og lægemiddelindustrien nødvendigvis fokusere yderligere på disse problemstillinger i de kommende år.

Risici ved de nye lægemidler

Hypotesen om, at nye behandlinger af kontekstuelle sygdomme vil have øgede samfundsøkonomiske og etiske

konsekvenser, støttes af flere nye undersøgelser. På Institut for Samfundsfarmaci er vi i gang med en ny undersøgelse, der søger at identificere risici ved fremtidens lægemidler. Her bliver den såkaldte Delphi-metode anvendt. Metoden gør brug af to runder af spørgeskemaer. Det essentielle i metoden er, at deltagerne som et led i anden runde får udleveret svarene fra første runde. Det endelige svar er således et resultat af deltagerens refleksion over egne og andres svar. I den afsluttende del af undersøgelsen deltog 30 nationale eksperter indenfor et meget bredt spektrum af lægemiddelforskning og -udvik-

ling i undersøgelsen. Såvel universiteterne, medicinalindustrien, universitetshospitalerne og sektorforskningsinstitutionerne var repræsenteret. Resultaterne publiceres senere på året.

Risici fra individniveau til samfunds niveau

De nyere undersøgelser, herunder Delphistudiet, viser, at lægemiddelrelaterede risici i nogen udstrækning vil blive ændret fra det individuelle niveau til et samfunds niveau. Hidtil har bivirkninger hos de enkelte brugere været den vigtigste risiko. I fremtiden vil sociale problemer, samfundsøkonomi og etiske spørgsmål veje tungere.

Det kan ses som en konsekvens af moderne lægemidlers evne til at vekselvirke dybere med den menneskelige organisme end tidligere. Fremtiden vil tilbyde individuelle lægemidler baseret på den enkelte patients personlige biokemi. Lægemidlerne vil i større udstrækning kunne helbrede frem for at lindre, og de vil medføre færre eller mindre alvorlige bivirkninger. Sidst, men ikke mindst, vil fremtidens lægemidler i videre udstrækning end nu kunne ændre normale menneskelige conditioner.

Studierne berører også bagsiden af medaljen. Fremtidens lægemidler bliver dyrere og vil således ikke nødvendigvis være tilgængelige for alle samfundsgrupper. Lægemidler, der er designet til det enkelte individ, kan fjerne fokus fra hele patientgrupper. Andre lægemidler vil kunne anvendes - eller misbruges - til optimering af raske mennesker. Det vil skabe etiske kontroverser, ikke mindst i forbindelse af normalitetsbegrebet.

Vi vurderer, at de sociale, samfundsøkonomiske og etiske konsekvenser vil ændre lægemiddelforsknings- og udviklingsprocessen. Skal man tro samfundsanalytikerne, bliver netop etiske og sociale aspekter centrale evalueringsparametre i fremtiden. Erkendelsen af denne tendens ses allerede i medicinalindustrien med introduktionen af "grønne regnskaber" og "social ansvarlighed".

Delphistudiet understreger, at det er producenterne og forskerne, som er ansvarlige for lægemiddelforskningen. Den medicinske verden har en klar forpligtelse til at stille spørgsmål af social, økonomisk og etisk herkomst - systematisk og metodisk som et led i udviklingsprocessen. Negligeres dette, opstår der risiko for negative sociale, samfundsøkonomiske og etiske konsekvenser. Den medicinske udvikling i forhold til det tidligt fødte barn illustrerer dette dilemma. Teknologien kan i dag redde børn ned til 600 gram. Den medicinske etik taler for at redde, hvad reddes kan, selvom de pårørendes og/eller behandlerens fornuft taler imod. Ingen blev, ved teknologiens tilblivelse, spurgt om teknologien var ønskelig, hvis den indeholdt disse konsekvenser.

Den medicinske udvikling i forhold til det tidligt fødte barn illustrerer dette dilemma. Teknologien kan i dag redde børn ned til 600 gram. Den medicinske etik taler for at redde, hvad reddes kan, selvom de pårørendes og/eller behandlerens fornuft taler imod. Ingen blev, ved teknologiens tilblivelse, spurgt om teknologien var ønskelig, hvis den indeholdt disse konsekvenser.

Alarm inden det bliver for sent

For at undgå parallelle situationer på lægemiddelområdet må vi oprette et tidligt varslingsystem med sociale og etiske indikatorer. På miljøområdet fokuserer man på borgerinddragelse i beslutninger, der kan have sociale, samfundsøkonomiske og etiske konsekvenser. Brugen af såkaldte borgerjuryer er et af miljørådets tiltag, som vi nu vil afprøve og eventuelt foreslå anvendt i forbindelse med udviklingen af nye lægemidler.

Et sådant tidligt varslingsystem vil minimere risikoen for udvikling af lægemidler, der ultimativt ikke vil blive accepteret af omverdenen, eller hvis anvendelse uligt bliver en social, samfundsøkonomisk eller etisk byrde.



Cand.pharm. Claus Moldrup er ph.d.-studerende ved Institut for Samfundsfarmaci.



Ph.d. Janine Marie Morgall er lektor ved Institut for Samfundsfarmaci.

Medicinsk forstærket normalitet

Cykellytter Alex Zülle, som har indrømmet brug af EPO og væksthormoner, satte for nylig tingene på spidsen: "Enhver ved, at han ikke kan vinde Tour de France uden doping". Almindelige mennesker kan komme i en lignende situation, hvis det bliver muligt at forbedre hukommelsen medicinsk.

Det vil i givet fald sætte det enkelte individ i stand til at overskue flere problemstillinger og at være mere effektiv på arbejdspladsen.

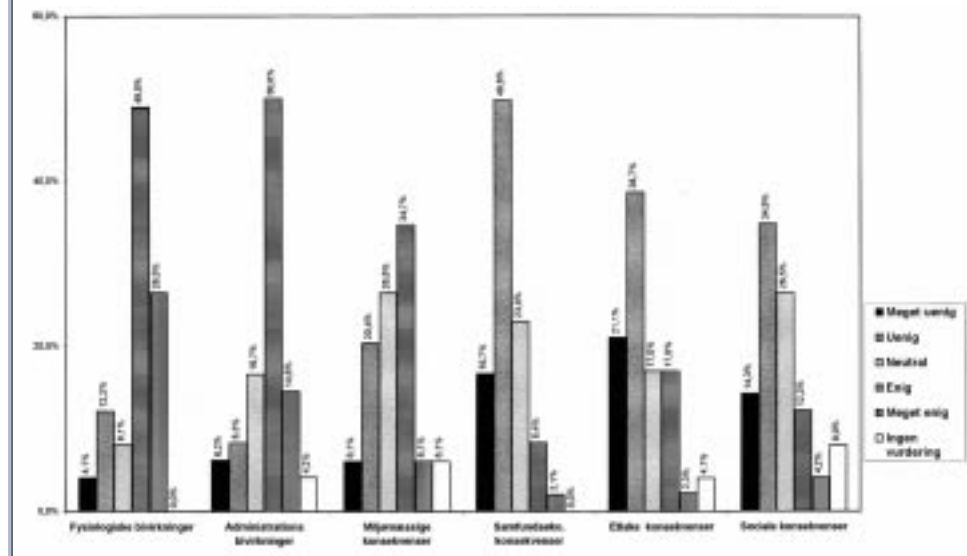
Et omfattende og eskalerende forbrug af hukommelsesfremmende lægemidler initierer sociale, samfundsøkonomiske og etiske konsekvenser. Vil det blive nødvendigt at tage et hukommelsesfremmende lægemiddel for at komme i betragtning til bestemte jobprofiler? Vil kravet om gode karakterer betyde, at studerende begynder at tage hukommelsesfremmende lægemidler? Vil det blive nødvendigt med dopingtest i folkeskolen? Hvem skal betale disse udgifter i et allerede økonomisk belastet sundhedssystem? Og vigtigst, er befolkningen etisk afklaret i forhold til mulighederne og konsekvenserne af "medicinsk forstærket normalitet"? Hermed menes, at raske individer legalt anvender lægemidler for at forbedre deres normale evner, i dette tilfælde hukommelsen.

Scenariet er ikke grebet ud af luften. Kontrollerede kliniske undersøgelser, udført på raske unge og ældre ved The National Institute of Health i USA, viser, at Ampakine forbindelsen CX516 (Cortex Pharmaceuticals Inc.) har signifikant positiv effekt på hukommelsen. Et kommende lægemiddel baseret på CX516 vil naturligvis have sin berettigelse til behandling af Alzheimers syge. Men at dømme efter salget af naturproduktet Gingko biloba, der ligeledes tilskrives en hukommelsesfremmende effekt, vil efterspørgslen på CX516 blive meget bredere.

Et argument imod, at denne udvikling vil finde sted, er samfundets afstandtagen til doping indenfor sporten. Her må man dog have for øje, at doping ikke kun foregår hos eliten, men også på amatørplan. Derfor er det vanskeligt at sige, hvordan den almene borger vil reagere, når muligheden for at optimere arbejdsevnen pludselig er indenfor rækkevidde. Vil det blive betragtet som doping? Eller vil pillen glide lettere ned med argumentet om det bedre liv? Det er sandsynligt, at medicinsk forbedret normalitet vil blive accepteret på lige fod med plastiske operationer og psykologisk rådgivning.

Fig. 1

Svar på spørgsmålet: "I forhold til nutidens lægemidler vil fremtidens lægemidler generelt karakteriseres ved færre...?"



Skemaet viser en række eksperters svar på et af Delphiundersøgelsens spørgsmål.

Lægemidlers vej til nervecellens gener

Den nye generation af lægemidler mod psykiske sygdomme aktiverer bestemte gener i hjernens nerveceller. Ved at kortlægge de involverede signalprocesser i nervecellerne, håber vi på at kunne udvikle bedre lægemidler, som virker hurtigere end de nuværende.

Projektet spiller en afgørende rolle i Neuroscience Centrets integrerede forsknings- og forskeruddannelse, som ledes på Danmarks Farmaceutiske Højskole.

Af Jens D. Mikkelsen

Lægemidler mod psykiske lidelser som depression og skizofreni virker ved at påvirke receptorer på hjernens nerveceller. Herved startes en reaktionskaskade inde i cellerne, som fører til, at bestemte gener aktiveres. Først en tid efter, at dette er sket, begynder behandlingen at virke.

For at kunne udvikle bedre lægemidler til behandling af psyki-

ske sygdomme er det vigtigt at opklare, hvordan medicinen påvirker nervecellernes interne maskineri. Nøglen til en sådan forståelse ligger i studier af signaloverføring.

Signaloverføring er viderebringeren af information, hvilket sker i cellemembranen og cellevæsken samt mellem cellevæsken og cellerkernen. Denne biokemiske kommunikationsproces sørger for, at information fra cellens overflade kan transporteres hele vejen ind til cellerkernens DNA. På den måde kan et ydre signal - f.eks. påvirkningen fra et lægemiddel - ændre, hvilke gener, der er aktive i nervecellen.

Nogle vigtige regulatoriske elementer i disse signalprocesser er de såkaldte proteinkinaser A, B og C. Kinaser er intracellulære enzymer, som aktiverer andre proteiner, herunder de såkaldte transkriptionsfaktorer. Transkriptionsfaktorer er fællesbetegnelsen for en række proteiner, som udgør det sidste led i signalkæden. De kan nemlig binde sig til DNA og derved tænde eller slukke for gener i cellen.

I et samarbejde med forskere fra Hovedstadens Sygehusfællesskab,

Københavns Universitet samt Danmarks Farmaceutiske Højskole og med støtte fra The Drug Research Centre ønsker H. Lundbeck A/S at intensivere forskningen i de transkriptionsfaktorer, som er aktive i hjernens nerveceller.

Langsom ændring inde i cellerne

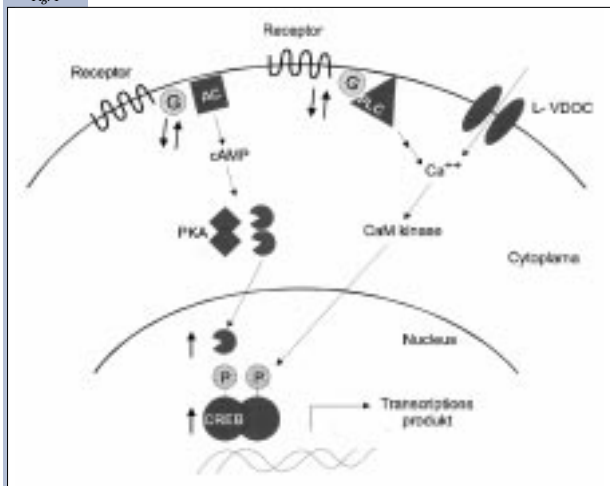
Lægemidler mod sygdomme i hjernen virker ofte ved at binde sig til en såkaldt G-proteinkoblet receptor på nervecellernes overflademembran. Disse receptorer aktiverer først et G-protein, som er koblet til membranen. G-proteinerne er omstillingsberedte mellem omgivelserne og cellens indre miljø. Via G-proteinet aktiveres kinaserne, som starter en kaskade af signalprocesser.

Mange tusinde potentielle lægemiddelstoffer kan screenes relativt hurtigt for deres evne til at binde sig til en given G-protein koblet receptor. Derefter kan man opklare, om bindingen af et givet stof medfører en blokering eller en stimulation af den pågældende receptor, udtrykt ved effekten på G-proteinet.

Det er imidlertid langt sværere at undersøge, hvilke betydende effekter lægemidler har på signaloverføringen inde i den enkelte nervecelle, fordi flere af disse processer går i gang på samme tid i cellen. Derudover sker de cellulære ændringer ikke pludseligt, men over relativt lang tid, endda op til flere dage. Endelig gentages indgivelsen af et lægemiddel ofte, således at den

Behandling med lægemidler mod depression gennem nogle uger aktiverer bestemte gener i nervecellerne, hvilket kan være årsag til behandlingens gunstige effekt. Figuren viser to signalkaskader, som begge kan aktivere målgenet.

Fig. 1



daglige ændring af cellens signaloverføring kan medføre yderligere aktivering inde i cellen, men som ikke sker ved en enkelt behandling.

Man skal derfor have en klar viden om, hvilke processer, som sættes i gang på forskellige tidspunkter. Desuden skal man vide, hvornår og hvor i hjernen processerne finder sted for mere præcist at studere de effekter, som er afgørende for lægemidlets virkning. Alt i alt er dette genstand for en intens forskningsindsats.

Forståelse af tilvænnning

Forandringerne inde i nervecellerne er vigtige for at forstå, hvordan lægemidler egentlig virker. Specielt er de tilvænningsmekanismer, som optræder, når lægemidler indgives over længere tid. Et eksempel på tilvænnning er, at cellerne bliver mindre og mindre følsomme for det samme lægemiddel. Ved at forstå disse cellulære ændringer vil man kunne fjerne den væsentlige bivirkning ved mange lægemidler, som tilvænnningen er.

Et andet mål med forskningen er at korrelere momentant receptoraktivering med den effekt, som udøves gennem transkriptionsfaktorerne, for at forstå hvilke gener, som i sidste ende påvirkes, og som måske er ansvarlige for lægemidlets terapeutiske effekt. Dette er særligt relevant for forståelsen af antidepressiva og antipsykotika, fordi virkningen indtræder lang tid efter, at behandlingen er begyndt, og lægemidlerne har bundet sig til receptorerne.

Lægemidler mod depression

Forskergruppen har lagt særlig vægt på at forstå de mekanismer, som udløser en antidepressiv effekt efter længere tids behandling med lægemidler som Prozac, Fontex og Cipramil. Det er velkendt at behandling med disse lægemidler skal foretages i flere uger, før den gunstige effekt opnås.

Vi har derfor undersøgt i dyreforsøg, om de dybere processer i hjernen ændres ved behandlingen. Gentagen behandling øger de signalprocesser i hjernedelen hippocampus, som sættes i gang af protein kinase A. Selv aktiveres protein kinase via stimulation af receptorer, som er koblet til et stimulatorisk G-protein.

Protein kinase A aktiverer andre proteiner ved at anbringe fosforgrupper på dem. Et interessant protein, som aktiveres på denne måde er transkriptionsfaktoren cAMP response element binding protein (CREB). Hvis CREB fosforyleres på position serin-133, øges transkriptionsfaktorens evne til at koble sig sammen med et andet protein. Dette protein-kompleks binder sig tæt til bestemte dele af DNA og tænder for det pågældende gen. På den måde er der direkte forbindelse mellem en receptor og et målgen.

En anden mulighed for at starte denne proces er, når der flyder positivt ladede calciumioner ind igennem cellemembranen. Ionerne aktiverer proteinet calmodulin-kinase, som også er i stand til at fosforylere CREB på position serin-133. Det er uvist,

hvilke af disse kinaser, som er af betydning for de antidepressive lægemidlers effekt, men under alle omstændigheder sker en række cellulære begivenheder, som forbinde korttidseffekter med mere længerevarende effekter.

Målgener for lægemidler

Det er vigtigt at bestemme de målgener, som forårsager den længerevarende effekt. Disse genes aktivitet undersøges vi ved at måle, hvilke og hvor store mængder budbringer-RNA (mRNA), de danner. mRNA er en strengede kopier af genet, som indeholder opskriften på de proteiner, det pågældende gen koder for. Opskriften aflæses i cellernes proteinfabrikker, som producerer proteinerne.

Ved hjælp af kvantitative mRNA målinger har vi for nyligt vist, at genet, som koder for proteinet adenylylase type 1 (AC-1) var aktiveret, og at niveauet af mRNA øgedes efter længere tids behandling med antidepressiv medicin. En anden forskergruppe har vist, at også genet for vækstfaktoren brain derived nerve growth factor (BDNF) var påvirket, og at mængden af mRNA for denne vækstfaktor ligeledes stiger efter længere tids behandling med forskellige lægemidler mod depression.

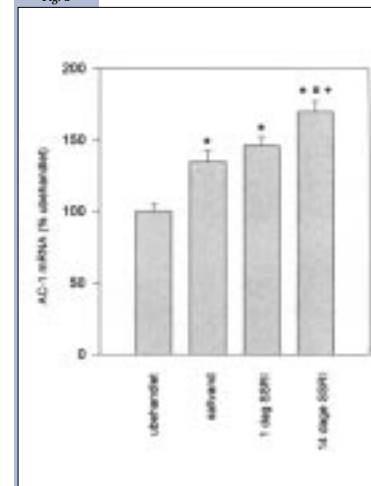
Det interessante ved disse to gener er, at de begge aktiveres af CREB, og at de påvirkes lang tid efter, at behandlingen er startet, og hvor den terapeutiske effekt indtræder.

Nye perspektiver for behandling

Lægemidler mod flere sygdomme i hjernen binder sig til receptorer og starter en række langtidseffekter i de enkelte nerveceller. Transkriptionsfaktorer er vigtige budbringere mellem nervecellens overflade og dybereliggende effekter på cellens DNA. Derfor er det vigtigt at kende de involverede transkriptionsfaktorer og forstå deres virkning for derved at udvikle nye lægemidler med ønskede langtidseffekter.

Sådanne studier kan skabe muligheder for at finde nye stoffer, som virker bedre end de nuværende. En vej at gå er at udvikle lægemidler, som ikke binder sig til selve receptoren, men som påvirker den specifikke signaloverførselsvej, som er påvirket i en given sygdom, og som vi ved påvirkes af kendte stoffer. En måde at gøre dette på er at udnytte den krystallografiske struktur af de unikke regulatoriske områder på enten kinaserne eller på transkriptionsfaktorerne som et udgangspunkt for design af nye lægemidler.

Fig. 2



Når et gen aktiveres, udsender det en strengt kopi af sig selv. mRNA, som sørger for dannelsen af et protein. Når rotter behandles med antidepressiv medicin, stiger mængden af mRNA for proteinet adenylylase type 1 (AC-1) med tiden. Efter en periode er mængden af AC-1 i nervecellerne øget, og samtidig begynder behandlingen at virke.



Dr. med. Jens D. Mikkelsen er afdelingsleder ved Neurobiologisk afdeling, H. Lundbeck A/S og forskningskoordinator i Drug Research Centre.

Måling af nervecellers lynhurtige signaler

Signaloverførsel mellem nerveceller foregår på millisekunder. Nye måleteknikker kan følge disse lynhurtige processer. Målingerne giver vigtig ny viden, som kan gøre det muligt at designe specifikt virkende lægemidler til bestemte dele af hjernen.

Af Tue Banke, John Lambert og Arne Schousboe

Hjernens celler kommunikerer med hinanden ved hjælp af synapsen. En synapse er et lille stykke cellemembran, der er i meget tæt kontakt med en anden nervecelles membran. Disse to stykker membran danner selve synapsekløften, hvor de to celler kan udveksle information. Signaloverførslen sker ved, at den ene celle frigiver et signalstof til den anden. På overfladen af modtagercellen sidder der receptorer, hvortil signalstofferne bindes.

Når det er sket, aktiveres receptorerne og åbner en ionkanal, som medvirker til at sende signalet fra afsendercellen videre. Ionkanalen danner et ganske lille hul, hvori ioner kan trænge igennem. Hjerne-

cellen vil, idet der trænger ioner ind gennem cellemembranen, tolke dette som et signal. Nervecellen kan herefter videregende signalet til andre hjerneceller.

Vi arbejder med at karakterisere en gruppe af receptorer, der kaldes glutaminsyreceptorer, fordi de aktiveres af hjernens vigtigste stimulerende signalstof glutaminsyre. Glutaminsyreceptorer er vidt udbredt i hjernen og er involveret i vigtige funktioner, såsom indlæring og hukommelse. Imidlertid kan fejlfunktioner i disse receptorer føre til en række af hjernesygdomme, bl.a. Alzheimers syge. Derfor er der stor interesse for at opklare strukturen af glutaminsyreceptorerne, fordi de er potentielle angrebepunkter for lægemidler.

Glutaminsyreceptorer

Der findes forskellige receptorer for glutaminsyre, og de inddeles i undertyper alt efter deres farmakologiske egenskaber. Inddelingen er baseret på, at receptortyperne reagerer forskelligt på forskellige analoger af glutaminsyre.

Der er tre hovedklasser: NMDA-receptorer, AMPA-receptorer og kainisyreceptorer. Vi har i en række år arbejdet med AMPA-receptorerne. Deres karakteristiske egenskaber er,

at de meget hurtigt kan aktiveres af AMPA eller glutaminsyre, samt at den ionstrøm, der trænger gennem hver enkelt ionkanal er ganske lille.

Hver AMPA-receptor er bygget op af 4 eller 5 underenheder; hvor mange helt præcist vides ikke. Underenhederne består af proteiner. Der er klonet fire forskellige underenheder, som kaldes GluR1-4. Hvis vi antager, at der skal fire underenheder til at bygge en ionkanal op, er der et stort antal mulige sammensætninger. En kan f.eks. været bygget op af kun GluR1-enheder, eller måske af 2 GluR1-enheder og 2 GluR2-enheder o.s.v.

Der er indici for, at specielle typer AMPA-receptorer findes i specielle områder af hjernen. Et endeligt mål er at kunne designe lægemidler, som specifikt er rettet mod en ønsket undergruppe af disse receptorer i et specifikt område af hjernen.

Receptorerne tændes og slukkes hurtigt

Som omtalt aktiveres og ikke mindst inaktiveres AMPA-receptorer meget hurtigt. Inaktiveringen kaldes for desensibilisering og indtræffer umiddelbart efter, at AMPA eller glutaminsyre har bundet sig til receptoren, og den sker uanset, om signalstoffet stadig er tilgængeligt for

receptoren. For AMPA-receptorens vedkommende sker desensibiliseringen på under 50 millisekunder. Normalt vil signalstoffet være diffunderet væk fra synapsekløften indenfor få millisekunder. Men skulle det ske, at signalstoffet er tilstede i længere tid, kan desensibilisering opfattes som en slags "overophedningsventil". Det vil sige, at kanalen og dermed den videre respons automatisk stoppes efter ganske kort tid.

Da hver enkelt kanal kun tillader en meget lille ionstrøm at passere igennem, er det vanskeligt at måle den strøm af ioner, der passerer en enkelt ionkanal. Derfor plejer man at studere flere kanaler samtidigt.

Måling i et lille stykke membran

Netop desensibilisering og den lille ionstrøm udgør hovedproblemerne i forbindelse med eksperimentelle studier af AMPA-receptorernes ionkanaler. For at kunne undersøge disse kanaler anvendes et system, der tilføjer glutaminsyre lige så hurtigt, som det sker i synapsen under normale forhold.

Dette har hidtil været vanskeligt at opnå. Traditionelt har man tilsat glutaminsyre eller syntetiske analoger meget langsomt i forhold til synaptisk frisætning af glutaminsyre. Derved studeres disse kanaler i en desensibiliseret tilstand, som ikke har noget med informationsoverførsel at gøre.

For bedre at kunne undersøge receptorernes ionkanaler anvender vi nu en metode, som kaldes for patch-clamp teknik. Metoden går ud på, at man med en lille pipette river et

ganske lille stykke membran ud af cellens overflade. Flere receptorer er indlejret i membranstykket. Disse kan stimuleres ved at tilsætte en høj koncentration af enten AMPA eller glutaminsyre. Strømmen, der løber igennem ionkanalerne, måles med en meget følsom forstærker.

Et piezoelektrisk system anvendes til at tilføre AMPA eller glutaminsyre i under et millisekund. Systemet er baseret på en piezoelektrisk krystal, som har den egenskab, at krystallen bevæger sig ganske lidt, men meget hurtigt, når man sætter en spænding over den. Denne egenskab udnyttes til at flytte en pipette, der består af to rør. Ved forsøgene sendes en kontrolopløsning gennem et rør og en opløsning med signalstof gennem et andet. Pipetten med det lille stykke membran anbringes først under røret med kontrolopløsningen. Så aktiveres krystallen, som så flytter sig således, at membranstykket nu placeres under det andet rør med signalstoffet. Herved stimuleres receptormolekylerne, som forårsager en ionstrøm igennem membranen. Strømmen måles ved hjælp af patch-clamp forstærkeren.

Vi kan udskifte opløsningen omkring cellemembranstykket med receptorerne på under ét millisekund og dermed simulere, hvad der foregår i synapsekløften under normale forhold.

Frøæg og kulturer af hjerneceller

AMPA-receptorer består som nævnt af forskellige underenheder, GluR1-4. Da der findes mange mulige kombi-

nationer, er det en fordel at kunne studere disse enheder en for en, f.eks. ved at måle på AMPA-kanaler, der kun består af GluR1-enheder.

Forsøgene er baseret på, at man kunstigt kan fremstille forskellige AMPA-receptorer. Her udnyttes frøen *Xenopus laevis*'s store æg. Når man sprøjter de gener, der koder for de forskellige underenheder af receptorerne ind i ægget, begynder ægget at producere de pågældende AMPA-receptorer i dets ydre membran.

På den måde har vi fremstillet æg med AMPA-receptorer, der kun består af GluR1-underenheder. Disse receptorers samspil med glutaminsyre blev herefter undersøgt ved hjælp af det piezoelektriske udstyr. Herved kunne vi måle, hvor hurtigt responsen forsvinder, fordi receptorerne desensibiliseres.

Vi har også forsøgt at benytte dette system på hjernecellekulturer. Her er AMPA-receptorerne sammensat på en måde, som man ikke kender nøjagtigt. Ved at gentage de ovenfor beskrevne forsøg på hjerne-kulturer, kan man opnå farmakologisk information om, hvordan en naturlig forekommende AMPA-receptorkanal opfører sig. Metoden går ud på at sammenligne med resultaterne fra frøæggene, hvor vi kender sammensætningen af AMPA-receptorerne. Hensigten er, at kunne opklare, hvilke underenheder der indgår i receptorerne i hjernen. Der-ved får vi vigtig viden, som kan bruges i forsøg på design af nye specifikt virkende lægemidler, der kun påvirker de ønskede receptorer i netop den del af hjernen, hvor de forekommer.



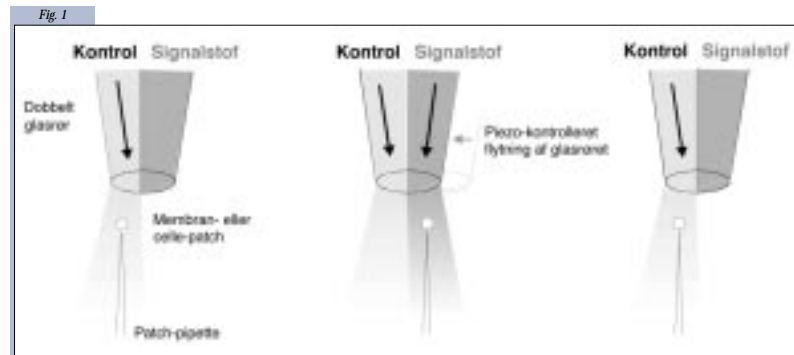
Cand.scient. Tue Banke er ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi.



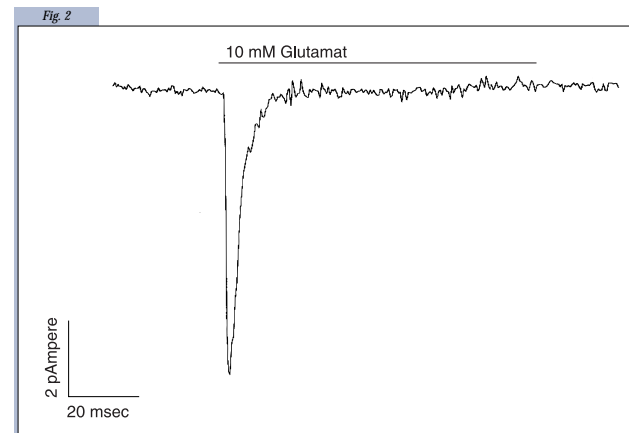
Ph.d. John Lambert er forskningsprofessor ved Institut for Fysiologi, Århus Universitet.



Dr.scient. Arne Schousboe er professor ved Institut for Farmakologi.



Med et nyt udstyr er det muligt at simulere de lynhurtige signalprocesser i synapsen mellem nerveceller. Åbningen på en mikropipette forsegles med en lille lap af modtagercellens cellemembran. Pipetten placeres under et dobbelt rør med henholdsvis en kontrolopløsning og en opløsning med det signalstof, der aktiverer modtagercellens receptorer. Ved hjælp af en piezoelektrisk krystal kan pipetten flyttes, så man kan skifte mellem de to opløsninger på under et millisekund. Herved er det muligt at måle, hvor hurtigt receptorerne aktiveres og desensibiliseres.



Figuren viser en måling på et stykke membran fra frøæg, som indeholder GluR1 AMPA-receptorkanaler. Den sorte streg i toppen af figuren illustrerer tidsrummet, hvor glutaminsyre var appliceret. Desensibiliseringen ses ved, at responsen forsvinder, selvom glutaminsyre fortsat er tilstede.

Mulighed for diagnostik af neurodegenerative sygdomme

En række sygdomme i hjernen skyldes, at nervecellerne henfalder og dør. Studier af tidlig-respons-gener, som er involveret i celledøden, kan måske føre til udvikling af en diagnostisk metode, der kan påvise sygdommene i et tidligt stadium.

Af Aase Frandsen og Arne Schousboe

Glutaminsyre er et tvæagget sværd. På den ene side er glutaminsyre hjernens vigtigste stimulerende signalstof i kommunikationen mellem nervecellerne, og det spiller en afgørende rolle for f.eks. hukommelsen, evnen til indlæring og bevidstheden. Men glutaminsyre kan også under visse omstændigheder være årsag til, at nerveceller skades eller dør. Dette menes at medvirke til de skader, der opstår i forbindelse med epilepsi, hjerneblødninger, Alzheimers syge og neuropsykiatriske tilstande.

Endnu kan sygdommene ikke behandles. Det skyldes blandt andet, at det ikke er muligt udelukkende at ramme de sygdomsfremkaldende processer uden samtidigt at forhindre de normale, fysiologiske funktioner, hvilket vil medføre uacceptabelt alvorlige bivirkninger. Et større kendskab til de cellebiologiske pro-

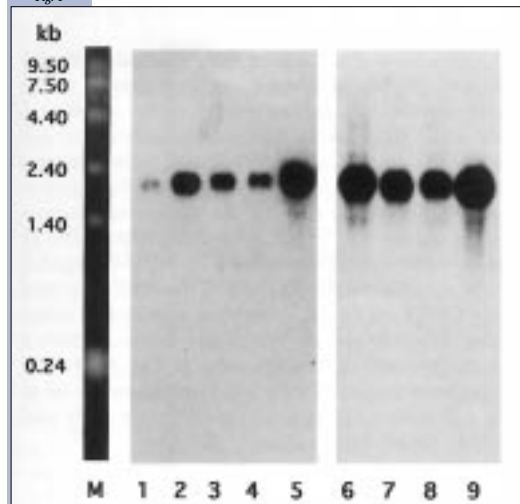
c-fos er et af de tidlig-respons-gener, der udtrykkes, når signalstoffet glutaminsyre stimulerer en nervecelle. Ved normale koncentrationer af glutaminsyre i hjernen udtrykkes *c-fos* kun i nogle minutter, men når mængden af glutaminsyre øges ved flere sygdomme i hjernen, udtrykkes *c-fos* i meget længere tid. Tidsmønstret for mængden af *c-fos*-mRNA i nervecellerne kan derfor bruges som en indikator for, om øgede niveauer af glutaminsyre er i færd med at skade cellerne. Sajlediagrammet viser mængden af *c-fos*-mRNA efter stimulering med lave, ikke-toxiske glutaminsyrekoncentrationer (0, 1 og 10 μ M) og efter stimulering med toksiske glutaminsyrekoncentrationer (50 og 100 μ M).

cesser, der startes af glutaminsyre, kan gøre det muligt at skelne mellem de processer, som er normale, og de processer, der fører til celledød.

Det er sandsynligt, at en meget tidlig genetisk reaktion på glutaminsyres skadelige påvirkning af nervecellerne kan bruges diagnostisk ved disse sygdomme. Al cellens arvemateriale består af DNA og indeholder information, der bl.a. oversættes til budbringer RNA (mRNA). mRNA er en enkeltstrengt kopi af et gen og indeholder opskriften på det protein, som genet koder for. Opskriften aflæses nu af cellens proteinfabriker, som producerer det pågældende protein. Proteinerne er cellens redskaber, som udøver de livsnødvendige funktioner.

Nogle af cellens gener danner hele tiden proteiner og kaldes "hus-holdningsgener", mens andre kun transkriberes på bestemte signaler. Dette udgør en meget vigtig reguleringsmekanisme for cellens aktivitet og funktion.

Fig. 1



Tidlig reaktion i nervecellerne

Det er for nyligt opdaget, at en af de første cellulære reaktioner på glutaminsyre påvirkning er aktivering af de tidlig-respons-gener, der er nødvendige for at sætte gang i cellens øvrige reaktionsmaskineri.

Tidlig-respons-generne koder bl.a. for proteiner, der fungerer som transkriptionsfaktorer. Disse er nødvendige for, at cellens gener bliver oversat til de proteiner, som udgør cellens signaleringsmaskineri, og som udfører de intracellulære processer, der fører til nervecellens reaktion på den ydre påvirkning; i dette tilfælde glutaminsyre.

Et af medlemmerne i denne genfamilie er *c-fos*. Under en normal fysiologisk reaktion vil mængden af *c-fos*-mRNA i cellen stige midlertidigt i nogle minutter for hurtigt at falde ned på det basale niveau, når transkriptionen af de relevante gener er sket. Ved en påvirkning, der senere

vil føre til, at nerveceller skades eller dør, bliver *c-fos*-mRNA-ekspressionen ved med at være forhøjet i flere timer eller sågar dage efter stimuleringen af cellen. Samtidig er mængden af mRNA for *c-fos* meget højere end i normale situationer.

Starter interne signaler i celler

Hjernen består af mange forskellige nervecelletyper, der reagerer forskelligt på glutaminsyres påvirkning, hvorfor det kan være meget vanskeligt at tolke forsøg, der er udført i den intakte hjerne, ligesom der kan være etiske aspekter forbundet med sådanne undersøgelser. Derfor er det en fordel at anvende dyrkede nerveceller af forskellig art fra musehjerner til studiet af glutaminsyres funktioner.

Man ved, at glutaminsyre udøver sin effekt ved at binde sig til receptorer, der sidder udenpå nervecellerne og modtager glutaminsyresignalet fra andre nerveceller. Efter bindingen oversættes signalet til cellens eget interne signaleringssystem, hvilket i sidste ende fører til cellens reaktion. Under normale fysiologiske forhold sendes glutaminsyresignalet videre, men i neurodegenerative sygdomstilstande kan signalet føre til cellens destruktion.

Glutaminsyres receptorer kan inddeles i forskellige undergrupper med forskellige farmakologiske egenskaber. Alle receptorundergrupperne kan formidle glutaminsyres giftvirkninger, selvom det foregår via forskellige, endnu ikke fuldt opklarede, ruter inde i cellen. Desuden formidles også de normale fysiologiske funktioner af samtlige receptorundergrupper. Dette betyder, at man ikke som terapeutisk strategi kan anvende stoffer, der forhindrer modtagelse af glutaminsyresignalet. Disse stoffer bruges hovedsagligt i det eksperimentelle arbejde med at opklare de intracellulære signaleringsveje for glutaminsyres funktioner.

Da glutaminsyres giftvirkninger ofte tænkes at opstå som følge af en forlænget eller forstærket stimulation af receptorerne, kunne man tænke sig en terapeutisk anvendelse af stoffer, der delvist hæmmer cellens modtagelse af signalet, således at styrken af nervecellens påvirkning med glutaminsyre ville blive normaliseret. En sådan behandling ville være specielt lovende, hvis den kunne kombineres med et stof, der ikke påvirker cellens signalmotagelse udefra, men som specifikt blokerer det eller de trin i cellens signaleringsveje, der fører til celledøden.

Et eksempel på et sådant stof er

dantrolene, som kan forhindre frisættningen af calciumioner fra bestemte depoter inde i cellen og derved forhindre cellen i at dø som følge af en under normale omstændigheder toksisk glutaminsyre påvirkning. Imidlertid er calciumfrisættning ikke involveret ved celledød forårsaget af samtlige receptorundergrupper, og idet glutaminsyre aktiverer alle receptorundergrupperne i hjernen, kan dantrolene heller ikke anvendes som monoterapeutisk middel i forbindelse med de sygdomme, hvori glutaminsyre spiller en rolle. Dantrolenes rolle er derfor også fortrinvis som redskab for det videre arbejde med opklaring af de involverede signaleringsveje.

Behandling og diagnostik

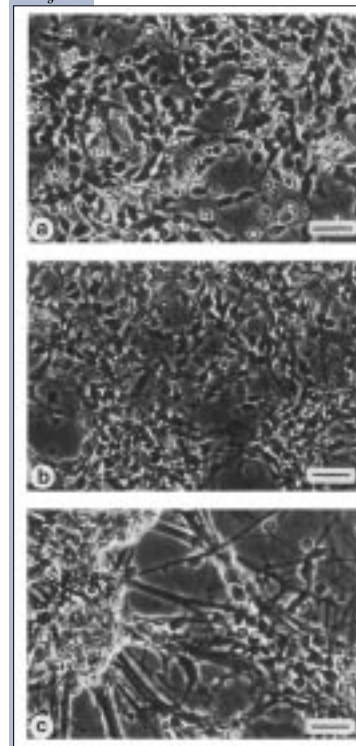
Den tidlige placering af *c-fos*-responsen i den interne kommunikationsproces i nervecellerne er et vigtigt element i forsøget på at udvikle en effektiv behandling af neurodegenerative sygdomme. Dette skyldes, at *c-*

fos-responsen ligger meget tidligt i rækkefølgen af de processer i cellens indre, der aktiveres af glutaminsyre. Derfor kan man opdaget reaktionen så tidligt, at man muligvis kan nå at forhindre aktiveringen af de efterfølgende processer og dermed også forhindre celledød.

Glutaminsyre aktiverer samtidigt flere forskellige kommunikations-systemer i cellens indre, hvilket ikke kan undersøges på en gang. Desuden er undersøgelserne af en sådan karakter, at det ikke kan lade sig gøre at foretage dem i en større skala. Derimod egner de analyse, vi har brugt til at påvise det ændrede tidsmønster for mængden af *c-fos*-mRNA sig af tekniske årsager fortrinligt til screening i større skala, hvilket er vigtigt, hvis testen skal kunne bruges diagnostisk.

Resultatet har ført til en bevilling fra EU til et demonstrationsprojekt med henblik på at udvikle nye strategier og teknikker til diagnostisering uden eller med begrænset brug af forsøgsdyr.

Fig. 2



Fase-contrast-lysmikroskopisk billede af nervecellekulturer fra musehjerne dyrket i plasticpetriskåle i 10 dage. Stregen indikerer 25 mikrometer.



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



Dr. scient. Arne Schousboe er professor ved Institut for Farmakologi.

Nyt angrebepunkt for lægemidler mod Alzheimers syge

Lægemidler, der øger signalstoffets GABA's aktivitet i hjernen, anvendes i dag til behandling af epilepsi, angst og søvnløshed. Ny forskning tyder på, at demens og måske også sindslidelser, herunder skizofreni, vil kunne behandles gennem en kontrolleret blokering af GABA-systemet.

Af Bente Frølund, Bjarke Ebert, Uffe Kristiansen, Erik Falch og Povl Krosgaard-Larsen

Den menneskelige hjerne rummer omkring 10 milliarder nerveceller, som vekselvirker med hinanden i et yderst kompliceret netværk. Nervecellerne betjener sig af et stort antal signalstoffer, som overfører signaler mellem dem, og som regulerer og modificerer ikke alene signalstrømmene, men også de enkelte signalers intensitet. Hvert enkelt signalstofs funktioner udøves normalt via et stort antal receptorer på nervecellerne, som modtager signalerne. Man skønner, at en nervecelle i sin celle-

membran har indbygget omkring 1000 receptorer af forskellig art. Hos de fleste mennesker fungerer disse ufatteligt komplicerede hjernemekanismer problemfrit, men der kan opstå fejl i signalmaskineriet, som kan udvikle sig til alvorlige og ofte dødelige hjernesygdomme. Hjernens overordnede hæmmende signalstof, som dæmper nervecellerens aktivitet, er GABA (gamma-aminosmørsyre). Det vigtigste stimulerende signalstof er glutaminsyre, som øger aktiviteten i nervecellerne. Længst de fleste af hjernens nerveceller indeholder receptorer for disse to signalstoffer, som billedlig talt fungerer som henholdsvis håndbremse og speeder i hjernen. Nerveceller, der danner henholdsvis GABA og glutaminsyre, spiller sammen med andre centrale neurotransmittersystemer, bl.a. acetylcholin- og dopaminsystemerne. Fejlfunktioner i de sidstnævnte signalsystemer spiller en væsentlig rolle i henholdsvis Alzheimers syge og skizofreni.

Degeneration og ubalance
Vor viden om mekanismerne bag en række hjernesygdomme vokser, men er i alle tilfælde ufuldstændig. Der

har i de seneste år været forsket intensivt i demenssygdommen Alzheimers syge. Det er en neurodegenerativ sygdom, som er karakteriseret ved et ubønhørligt fremadskridende henfald af især de nerveceller, som udsender signalstoffet acetylcholin, hvilket fører til tab af hukommelse og evne til indlæring. Overstimulation af glutaminsyre-receptorerne på disse nerveceller er efter al sandsynlighed en medvirkende årsag til, at de går til grunde, men mange andre processer spiller også en rolle.

Der har i flere år været udfoldet store bestræbelser på udvikling af lægemiddelstoffer, der påvirker nervecellerne og speeder op acetylcholin på samme måde som signalstoffet selv. Målet har været at anvende stofferne som lægemidler mod Alzheimers syge ved at kompensere for faldet i mængden af acetylcholin i hjernen på grund af det fremadskridende henfald af acetylcholin-nervecellerne. Selv om denne terapeutiske strategi må siges at være logisk og velbegrunder, har resultatet af flere kliniske studier været skuffende.

Hvorfor? Ja, det er svært at forklare: men fænomenet kan muligvis afspejle, at receptorerne for acetylcholin, selv om de sidder på modtagernervecellerne og altså ikke på de degenererende acetylcholin-nerveceller, alligevel mister evnen til at kunne aktiveres, når afsenderne er døde.

Der har verden over, ikke mindst i Danmark, været anvendt formidable ressourcer på denne forskning, som ser ud til kun i begrænset omfang at have indfriet forventningerne. Sådant er betingelserne for lægemiddelforskning. Der er behov for nytænkning, og en mulig nøgle ligger i GABA-systemet.

GABA-systemet, en ny nøgle?
GABA's rolle som overordnet hæmmende signalstof i hjernen har været klarlagt i mere end tre årtier. Som resultat af intens forskningsaktivitet

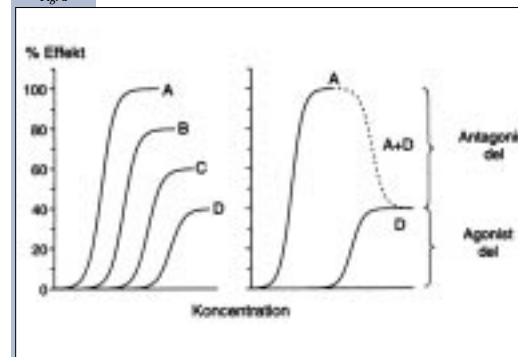
er der udviklet flere lægemidler med GABA-stimulerende effekt. Disse lægemidler anvendes til behandling af epilepsi og tilstande, som er karakteriseret ved angst og søvnløshed.

I dag er forskningen i GABA udvidet til at omfatte adskillige psykiatriske og neurologiske sygdomme, og meget tyder på, at afsporede processer i flere af disse hjernesygdomme kan bringes i balance gennem påvirkning og regulering af GABA-systemet. Der tegner sig stedse tydeligere et billede af, at det i flere tilfælde vil være muligt at bedre sygdomsbilledet eller dæmpe symptomerne gennem kontrolleret blokering af GABA-systemet.

DFH-gruppen fokuserer nu kraftigt på GABA-receptorerne som mulige terapeutiske angrebepunkter, specielt i Alzheimers syge, men også i skizofreni. Der sidder GABA_A-receptorer på acetylcholin-nervecellerne, og aktivering af disse receptorer nedsætter frigørelsen af acetylcholin. Dette er absolut ikke ønskeligt i Alzheimers syge, og på grundlag af dyreforsøg er der al mulig grund til at forvente, at behandling af Alzheimer-patienter med stoffer, der stimulerer GABA_A-receptorerne, ville forvære det fremadskridende tab af hukommelse og evne til indlæring.

Behandling med stoffer, som blokerer GABA_A-receptorerne, kunne i princippet lette symptomerne hos disse patienter, men med sådanne stoffer ville man blokere GABA-håndbremsen på stort set alle hjernens nerveceller, hvilket øjeblikkeligt ville få hjernen til at løbe løbsk. Men kunne man dæmpe aktiveringen af GABA_A-receptorerne delvist, åbner der sig måske nye terapeutiske muligheder. For GABA_A-receptorernes vedkommende er der således fokus på såkaldte partielle agonister.

Fig. 2



2) En partiel agonist aktiverer kun en receptor til et begrænset niveau. Mens muscimol (A) er en fuld agonist med 100% aktiverende effekt på GABA_A-receptorer, aktiverer analogen THIP (B) GABA_A-receptorerne til ca. 80% af maksimalresponsen, mens Thio-4-PIOL (C) og 4-PIOL (D) aktiverer receptorerne til henholdsvis 60% og 40% af maksimalresponsen. En partiel agonist (i figuren til højre stof D) besidder såvel agonisme som antagonisme. Den agonistiske del kan aktivere receptorerne til et 40% niveau, mens den antagonistiske del kan tvinge effekten af en fuld agonist (i figuren stof A) ned på 40% niveauet i forsøg, hvor D tilføres i stigende koncentration. Denne mekanisme kan formentlig udnyttes terapeutisk til en fleksibel og skånsom regulering af funktionen af hjernens GABA_A-receptorer.

I modsætning til en fuld agonist, der stimulerer GABA_A-receptorerne på samme måde som signalstoffet GABA selv, er en partiel agonist kun i stand til at aktivere receptoren til et niveau, der er lavere end 100%. Tre eksempler på partielle agonister er stofferne THIP, Thio-4-PIOL og 4-PIOL. THIP er en effektiv partiel agonist, mens Thio-4-PIOL og især 4-PIOL stimulerer GABA_A-receptorerne i mindre grad.

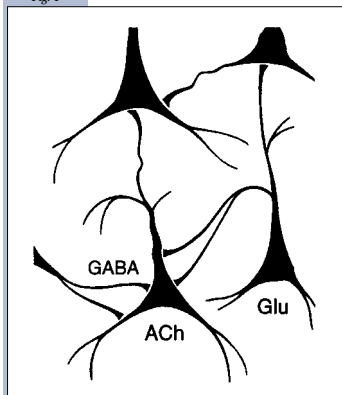
Stoffer af denne kategori er potentielle lægemidler til behandling af symptomerne hos Alzheimer-patienter. Det skyldes, at partielle agonister har evnen til både at aktivere og blokere receptorerne, men for begge effekters vedkommende

kun delvist. I princippet ville anvendelse af 4-PIOL som lægemiddel føre til ca. 60 procent blokering af GABA_A-receptorerne, men den stimulerende komponent på 40 procent af 4-PIOL's effekt ville kunne holde receptoren i funktion, men på lavt blus. GABA_A-receptorernes naturlige hæmning af acetylcholin-nervecellerens frigørelse af deres signalstof ville blive væsentligt reduceret, efter al sandsynlighed til gavn for patienten.

4-PIOL er imidlertid stadig kun et modelstof, og der er endnu langt til et lægemiddel på dette felt. Vi kender ikke det optimale effektivitetsniveau for denne kategori af stoffer. Måske er 4-PIOL's 40% agonistniveau for højt - eller for lavt. Hverken 4-PIOL eller Thio-4-PIOL synes at være aktive i tilstrækkeligt lave koncentrationer, og især 4-PIOL har svært ved at trænge gennem blod-hjerne-barrieren. Der er behov for omfattende forskning på dette felt; men DFH-gruppen har på det seneste udviklet kemiske forbindelser, som ser meget lovende ud.

Strukturen af hjernens overordnede hæmmende signalstof GABA samt af stoffet muscimol (A), som er en fuld GABA_A-receptor agonist. Strukturere af de partielle GABA_A-agonister THIP (B), Thio-4-PIOL (C) og 4-PIOL (D) med forskellige grader af effektivitet er ligeledes vist.

Fig. 1



En skematisk illustration af samspillet mellem hjerneceller, der udnytter acetylcholin (ACh), GABA og glutaminsyre (Glu) som signalstoffer. ACh-nerver, som spiller en central rolle i forbindelse med hukommelse og indlæring, stimuleres gennem aktivering af deres receptorer for Glu, mens aktivering af deres GABA-receptorer nedsætter nervecellerens frigørelse af ACh. I Alzheimers syge er det primært disse ACh-nerver, der henfalder og dør.



Bente Frølund er forskningslektor ved Institut for Medicinalkemi.



Cand.pharm., ph.d. Bjarke Ebert er lektor ved Institut for Farmakologi.



Cand.pharm., ph.d. Uffe Kristiansen er lektor ved Institut for Farmakologi.



Akademiingeniør Erik Falch er docent ved Institut for Medicinalkemi.



Dr.pharm. Povl Krosgaard-Larsen er professor ved Institut for Medicinalkemi.

Effektiv syntese af neuroaktive naturstoffer

Hvepsegiften, philanthotoxin, påvirker nerveceller og bruges som modelstof for udvikling af lægemidler mod bl.a. Alzheimers syge. Hidtil har det været besværligt at fremstille denne syne stoffer. En ny metode klarer syntesen hurtigt og effektivt. Samtidig åbner metoden mulighed for at anvende computerstyrede systemer, så fremstillingen kan automatiseres.

Af Kristian Strømggaard, Kim Andersen og Jerzy W. Jaroszewski

Ved udvikling af nye lægemidler tager man ofte udgangspunkt i naturstoffer, ikke blot fra planter, men også fra dyr. Naturstofkemikere interesserer sig oprindeligt for giften fra edderkopper og hvepse, fordi de kan dræbe eller paralisere insekter, og dermed kan danne udgangspunkt for nye insektbekæmpelsesmidler. I de senere år er interessen blevet skærpet, fordi visse af gifterne ikke blot virker på insekternes centralnervesystem, men også på menneskets. Derfor er disse gifte interessante som udgangspunkt for

udvikling af nye lægemidler mod sygdomme i hjernen, der skyldes nervecellers henfald og død; f.eks. Alzheimers og Parkinsons syge.

Et insekt, der har påkaldt sig særlig opmærksomhed, er hvepsen *Philanthus triangulum* også kaldet biulven, da den udelukkende fodrer sine larver med bier. Når bierne indfanges, sker det ved, at hvepsen stikker bierne og injicerer en giftcocktail, der paralyserer dem. I 1988 lykkedes det at isolere og bestemme strukturen af det aktive stof i giften. Stoffet blev kaldt philanthotoxin-433.

Philanthotoxin-433 var ingen succes som udgangspunkt for et nyt insektbekæmpelsesmiddel, dels fordi stoffet kun virker ved injektion, dels fordi stoffet kun bedøver insekterne. Farmakologisk set er giftstoffet langt mere interessant. En karakterisering af philanthotoxin-433 afslørede nemlig, at stoffet blokerer en klasse af ionkanaler, der fungerer som receptorer for nogle af de signalstoffer i hjernen, som sørger for nervecellerens indbyrdes kommunikation. Ionkanalerne aktiveres bl.a. af glutaminsyre, som er et af hjernens vigtigste stimulerende signalstoffer. En overstimulering af disse ionkanaler menes at føre til nervedød i hjernen og dermed til udvikling af neurodegenerative lidelser som Alzheimers

og Parkinsons sygdom.

Philanthotoxin-433 har i teststemer vist en beskyttende effekt på nerveceller, hvilket sammen med blokeringen af ionkanalerne tyder på, at denne stofklasse har et potentiale i behandlingen af neurodegenerative sygdomme. Derudover er philanthotoxin-433 yderligere interessant, fordi stoffet blokerer ionkanalerne ved at binde til et andet område i kanalerne end andre kendte blokerende stoffer.

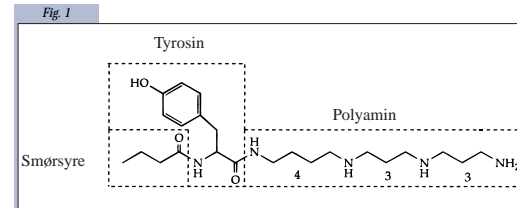
Blokade af ionkanaler

Forskningen omkring philanthotoxin-433 handler således om at undersøge, hvordan stoffet blokerer ionkanalerne, og her er det vigtigt at kigge på stoffets kemiske struktur. Philanthotoxin-433 består af aminosyren tyrosin, hvortil der er bundet henholdsvis smørsyre og en polyamin. Numrene i philanthotoxin-433, angiver strukturen af polyaminen, hvor der findes henholdsvis 4, 3 og 3 kulstofatomer mellem aminogrupperne.

Det har vist sig, at placeringen af aminogrupperne i polyaminen spiller en afgørende rolle. En simplificeret forklaring er, at aminogrupperne er positivt ladede under fysiologiske betingelser, og at de binder til negativt ladede aminosyrer i det indre af ionkanalen, hvorved kanalen blokeres. Afstanden mellem aminogrupperne i polyaminen skal passe med afstanden mellem de sure aminosyrer i ionkanalen for at opnå den bedste blokering. Dette er sandsynligvis ikke den fulde forklaring, idet det må formodes, at også andre faktorer, såsom graden af protonering af aminogrupperne, har betydning. Denne kan netop påvirkes ved at ændre afstanden mellem aminogrupperne.

Fastfase-syntese

I et forsøg på at belyse disse interaktioner og om muligt at bestemme den optimale placering af aminogrupperne i polyaminen, valgte vi at fokusere på fremstilling af analoger af philanthotoxin-433, hvor polyamindelen varieres systematisk. Målet blev derfor at fremstille de otte analoger af philanthotoxin-433, der er mulige ved at kombinere



Den kemiske struktur af hvepsegiften philanthotoxin-433. Numrene angiver antallet af kulstofatomer mellem aminogrupperne i polyamindelen.

afstandene 3 og 4 kulstofatomer mellem aminogrupperne. For at muliggøre dette er det essentielt at udvikle en effektiv syntesemetode.

Litteraturen og siden egne erfaringer indikerede, at fremstilling af disse otte stoffer ved brug af "traditionel" kemi ville blive en særdeles omfattende opgave, specielt fordi fremstilling af polyamindelen er en vanskelig proces, hvor en udtrakt brug af beskyttelsesgrupper er påkrævet, og hvor oprensningen af polyaminerne er meget kompliceret.

I stedet blev det besluttet at udvikle en metode, som er baseret på fastfase-syntese. Princippet i fastfase syntese er, at man opbygger det ønskede stof trin for trin, mens stoffet er koblet til overfladen af mikroskopiske plastkugler af polystyren, som er uopløselige i de anvendte opløsningsmidler. Efter hver reaktion filtreres overskydende reagenser fra. Først når samtlige trin i syntesen er udført, frigøres stoffet fra kuglerne.

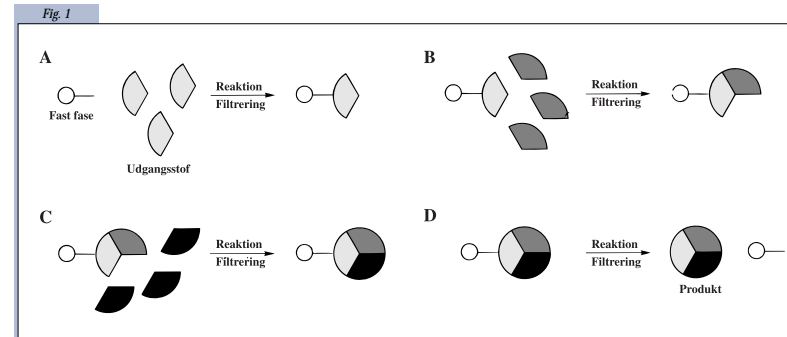
Fordele ved fastfase-syntese er, at oparbejdning efter hver reaktion foregår ved en simpel filtrering, samt at reagenser kan bruges i stort overskud, hvorved reaktionstiden reduceres.

Udfordringen var således at udvikle en metode til fremstilling af polyaminerne ved fastfase-syntese. Vi tog udgangspunkt i en ny metode

kaldet Fukuyama-aminering, hvor kommercielt tilgængelige aminoalkoholer med henholdsvis 3 og 4 kulstofatomer mellem alkoholen og aminen blev anvendt som byggeklodser. Ved at bruge Fukuyama-aminering lykkedes det at udvikle en metode, hvorved de otte analoger af philanthotoxin-433 kan fremstilles ved fastfase-syntese.

Fordele ved den nye metode kan illustreres ved at sammenligne den "traditionel" syntese af en analog af philanthotoxin-433. Syntesen kan tage flere uger, endda måneder, hvorimod det ved fastfase-syntese er muligt at fremstille de otte stoffer på mindre end en uge.

Udover at være hurtigt og effektiv er det lige så vigtigt, at metoden er generel for fremstilling af polyaminer. Det betyder, at det i princippet er muligt at fremstille hvilken som helst polyamin, blot ved at vælge de rette byggeklodser. Ydermere begrænser den udviklede metode sig ikke til at udføre variationer af polyaminen, men kan med fordel anvendes til at udføre et utal af variationer i både tyrosindelen og smørsyre delen af philanthotoxin-433. Dette er et eksempel på kombinatorisk kemi, hvor man ved at kombinere byggeklodser på en systematisk måde kan fremstille en lang række nye stoffer hurtigt og effektivt.



I fastfase-syntese opbygges den ønskede forbindelse trin for trin på overfladen af små kugler af polystyren.



Cand.pharm. Kristian Strømggaard er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi og H. Lundbeck A/S.

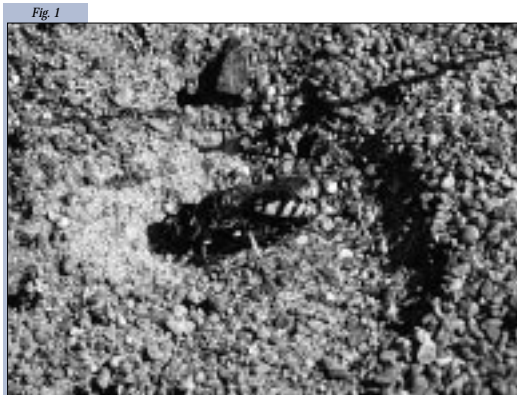


Cand.pharm. ph.d. Kim Andersen er afdelingsleder for Kombinatorisk Kemi, H. Lundbeck A/S



Lic.scient. Jerzy W. Jaroszewski er professor ved Institut for Medicinalkemi.

Foto: Jens Meisinger/PhotoBionics



Hvepsen *Philanthus triangulum* kaldes biulven, fordi den udelukkende fodrer sine larver med bier. Når den stikker bierne, lammes de af dens gift.

Nitrogenoxid - et lille signalstof med stor betydning

Nitrogenoxid har betydning ved en række funktioner i centralnervesystemet; fra hjernens blodgennemstrømning til hukommelsen. Ved sygdom kan overdreven produktion af signalstoffet medføre celledød. Udviklingen af lægemidler, som regulerer produktionen af nitrogenoxid ved neurologiske sygdomme er et lovende område for lægemiddelforskere.

Projektet beskriver en ny teknik inden for hjerneforskningen, som vil få stor betydning for flere forskere tilknyttet NeuroScience Centret, herunder forskere på Danmarks Farmaceutiske Højskole.

Af Martin Lauritzen

O pdagelsen af, at nitrogenoxid (NO) fungerer som signalstof i centralnervesystemet har åbnet op for helt nye forskningsfelter. Nitrogenoxid er et usædvanligt signalstof ved at være en gas, som i høje koncentrationer er giftig for nerveceller. Frigørelsen af gassen i vævet reguleres af enzymer, der kaldes NO syntaser (NOS). Disse enzymer er mål for udviklingen af nye lægemidler mod en række sygdomme herunder migræne, blodprop i hjernen og dissemineret sklerose.

Der er nu identificeret tre sådanne enzymer: endothellialt NOS (eNOS), som produceres af cellerne i blodkarens vægge, neuronalt NOS (nNOS), som dannes i nerveceller og det inducerbare enzym (iNOS). eNOS og nNOS er vigtige i både normale og sygelige tilstande, hvorimod iNOS fortrinsvis eller udelukkende spiller en rolle under sygdom.

Den basale produktion af nitrogenoxid i hjernen og blodkarrene varetages af nNOS og eNOS. Signalet for syntese af gassen er en strøm af

calciumioner over cellemembranen, som medfører, at enzymets produktionshastighed øges fra 5 til 95 procent af maksimum. Nitrogenoxid oplagres ikke, men diffunderer gennem cellemembranen og hen til celler, som er op til 600 µm væk. Den biologiske halveringstid er 10-30 sekunder. Efter stimulation er enzymet aktivt i få minutter.

Funktioner i hjernen

Nitrogenoxid er af afgørende betydning for blodtryksregulationen og blodgennemstrømningen i organerne. Opdagelsen af signalstoffets funktion i den sammenhæng indbragte i år Nobelprisen i Medicin til de amerikanske forskere Robert Furchgott, Luis Ignarro og Ferid Murad.

Senere er det blevet klart, at gassen også er et signalstof i nervesystemet. I hjernen findes nNOS i den højeste koncentration i hjernebarken, men enzymet er også aktivt i andre hjernedele. eNOS findes i hjernen ikke blot i blodkarrene, men også i visse nerveceller.

Nitrogenoxid regulerer nervecellernes frigørelse af en række signalstoffer i hjernen. Generelt fremmer nitrogenoxid frigørelse af signalstoffer, mens NOS-inhibitorer hæmmer frigørelsen af signalstoffer.

Denne effekt er forenelig med, at nitrogenoxid medvirker ved tilpasningen af nervecellernes aktivitet til ændrede funktionskrav. Et eksempel er dannelse af hukommelsesspor ved en proces, der kaldes "long term potentiation" (LTP), hvor forbindelserne mellem de involverede nerveceller styrkes. Dyreforsøg har vist, at NOS-inhibitorer blokerer LTP, mens NO forstærker eller inducerer disse funktionsændringer.

Celledød og sygdomme

Hvorfor dør nervecellerne ved for eksempel iskæmi og degenerative neurologiske lidelser? Overdreven frigørelse af stimulerende signalstoffer, først og fremmest glutaminsyre, spiller en afgørende rolle, fordi glutaminsyre i for høje koncentrationer

slår nerveceller ihjel på få minutter. Da produktionen af glutaminsyre fremmer dannelsen af nitrogenoxid, kan NOS-hæmmere beskytte nervecellerne. Desuden virker enzymet superoxid dismutase (SOD) beskyttende på nerveceller, som udsættes for forhøjede koncentrationer af glutaminsyre. Enzymet fjerner frie radikaler i nervecellerne.

Man har for nylig opdaget en mutation i familier med amyotrofisk lateral sklerose (ALS), en dødelig muskelsvindsygdom hos voksne. Denne mutation medfører defekter i genet for superoxid dismutase. Dette er foreneligt med den hypotese, at frie radikaler og muligvis nitrogenoxid er involveret i sygdommen.

I hjerner fra patienter, der er døde af Huntingtons chorea, finder man i bestemte områder et meget stort tab af nerveceller. Det er de celler, der udsender signalstoffer, som hæmmer andre neuroners aktivitet. De overlevende celler indeholder NOS, hvilket er interessant eftersom nNOS-holdige nerveceller er resistente for glutaminsyres giftvirkninger. Man forestiller sig, at NOS-holdige neuroner indeholder beskyttende faktorer herunder høje koncentrationer af superoxid dismutase.

NOS-hæmmere som mulige lægemidler

Ved iskæmi i hjernen dør nervecellerne som følge af iltmangel på grund af svigtende blodforsyning. I dyremodeller for sygdommen beskytter NOS-inhibitorer mod celledød. NOS-inhibitorer givet i hjernevæsken reducerer størrelsen af vævsdøden. Intravenøs indgift af NOS-inhibitorer hæmmer eNOS og reducerer dermed hjernens blodgennemstrømning i randområderne af infarkt, hvorved størrelsen øges.

Sammenfattende er den høje nNOS aktivitet i de tidlige faser af iskæmi skadelig på grund af de celletoksiske effekter, medens eNOS aktiviteten er gavnlig på grund den kompenserende udvidelse af blodkarrene i randområderne. Det er for-

venteligt, at infarkt vil blive mindre ved anvendelse af lægemidler, der selektivt hæmmer nNOS i de tidlige faser, medens non-specifikke NOS-hæmmere vil være skadelige på grund af en hæmning af eNOS. I de sene faser af infarktdannelsen invaderes hjernen af immunforsvarets makrofager, der indeholder iNOS. iNOS aktiviteten medvirker til den sene infarktdannelse, og det er forventeligt, at specifikke hæmmere af iNOS på dette tidspunkt vil kunne hæmme vævsdøden.

Dissemineret sklerose er en immunmediert sygdom i centralnervesystemet af inflammatorisk karakter, som fører til destruktion af myelinet omkring de lange nervebaner. I dyremodeller af sklerose findes øget indhold af iNOS i hjernen, og koncentrationerne af iNOS er sammenfaldende med dyrenes neurologiske udfald. Udviklingen af symptomer begrænses af NOS-inhibitorer i nogle dyremodeller.

Vore egne endnu upublicerede data tyder på, at iNOS-aktiviteten i hjernen hos sklerosepatienter udtrykkes i reaktive astroglaceller, en gruppe af nervecellernes støtteceller. Der er meget der taler for NO som sygdomsfremkaldende faktor ved sklerose.

Dyr uden gener for NOS-enzymet

Ved at odelægge genet for et af de tre NOS-enzymet i såkaldte "knock

out"-mus kan man studere effekten af fravær af aktivitet af et af de tre enzymer uden at berøre aktiviteten i de to andre.

Hjerner fra mus, der mangler nNOS-genet, ser normale ud. Dyrene virker vitale og fertile, og der er ingen forandringer at se i nervesystemet. Hunmusene udviser normal adfærd, men hanmusene er aggressive og hyperseksuelle. Studier af adfærdsforandringerne hos nNOS "knock out"-mus kan muligvis give vigtig ny viden om unormal adfærd hos både dyr og mennesker. nNOS "knock out" mus udvikler mindre områder med vævsdød efter lukning af blodårer til hjernen end normale dyr. Hæmmes den tilbageværende eNOS-aktivitet, øges infarktvolume. Resultatet støtter den hypotese, at nNOS-aktivitet ved iskæmi bidrager til udvikling af vævsskade. eNOS-aktivitet beskytter nervecellerne ved at opretholde gennemblodningen i randområderne. eNOS "knock out"-mus har forhøjet blodtryk, men ingen adfærdsforstyrrelser.

Klinisk forskning

i sklerose og kræft

I gruppen, som har deltaget fra NeuroSearch A/S, har vi især studeret betydningen af nitrogenoxid for blodgennemstrømningen i hjernen og de perifere nerver.

Nervecellerne og endothelcellerne i blodkarrene syntetiserer konti-

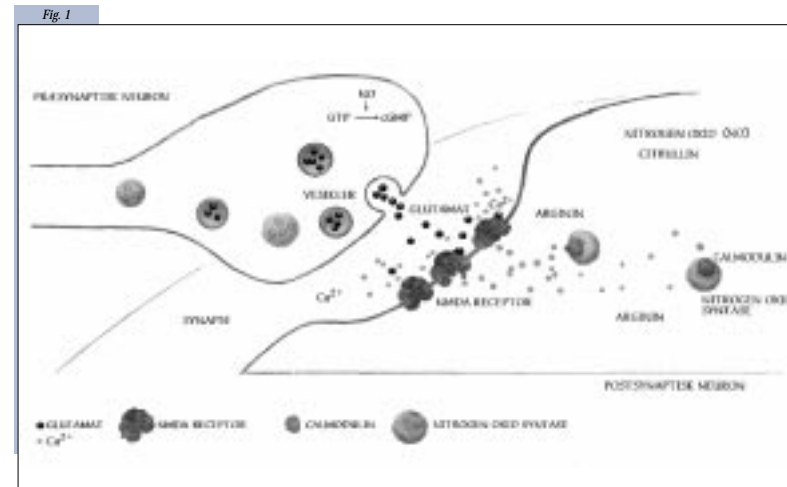
nuerligt nitrogenoxid, som opretholder blodgennemstrømningen på normalt niveau. Hæmmes dannelsen af signalstoffet, falder blodgennemstrømningen både i hjernen og de perifere nerver. Nitrogenoxid medvirker også ved de øgninger i hjernens blodgennemstrømning, der ledsager ændringer i nervecellernes aktivitet. Lokal produktion af nitrogenoxid i hjerne og nerver er essentiel for opretholdelsen af normal funktion.

Vores kliniske forskning har dels drejet sig om sygdomsmekanismen ved dissemineret sklerose som refereret ovenfor, dels om hjernesvulster. Nogle hjernesvulster har en meget høj blodgennemstrømning og et højt NOS-indhold, og kirurgisk behandling er forbundet med risiko for blødning. Det er muligt, at hæmning af dannelsen af nitrogenoxid vil medføre, at blodgennemstrømningen i svulsten falder. Det vil i givet fald reducere risikoen for blødning under operationer. Det begrænsende i den kliniske anvendelse af NOS-hæmmere er vanskeligheder med hæmmerens evne til kun at påvirke én af de tre udgaver af enzymet.

Behandlerne imødeser med spænding resultaterne af den moderne lægemiddelforskning. De rigtige NOS-hæmmere vil utvivlsomt kunne lindre, måske helbrede gruppen af patienter med sygdomme i nervesystemet og alvorlige handicaps.



Overlæge dr.med. Martin Lauritzen er professor ved Klinisk Neurofysiologisk Afdeling på Amtssygehuset i Glostrup.



Nitrogenoxid (NO) fungerer som et signalstof i nervesystemet, der er med til at fremme frigørelsen af en række neurotransmittere, herunder glutaminsyre. I det viste eksempel fremmes produktionen af NO, når glutaminsyre binder sig til NMDA-receptoren på en nervecelle, og calcium går ind i cellen. Herved aktiveres enzymet NOS, som producerer NO. NO påvirker nu de præsynaptiske neuroner, som herved får øget deres evne til at frigøre glutaminsyre. Overdreven frisættning af glutaminsyre spiller sandsynligvis en rolle i en række sygdomme som f.eks. blodprop i hjernen, hvorfor stoffer der hæmmer det NO producerende enzym NOS, er potentielle lægemiddelforberedninger til behandling heraf.

Kan man forudsige biotilgængelighed?

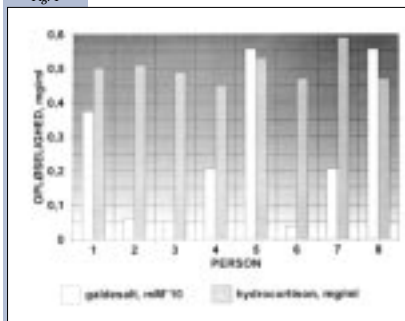
Virkningen af et lægemiddel, f.eks. en tablet, afhænger først og fremmest af lægemiddelstoffets virkning på den levende organisms funktioner. Det er imidlertid afgørende for at opnå den ønskede effekt, at lægemiddelstoffet kan bringes frem til virkningsstedet i organismen i en passende koncentration og over en vis tid.

Af Betty Lomstein Pedersen, David Ilardia og Henning Gjelstrup Kristensen

De fleste brugere af lægemidler har oplevet den situation, at lægen eller apotekeren anbefaler et skift fra et lægemiddel til et andet, måske fordi det nye lægemiddel er billigere, eller fordi det gamle ikke virkede helt som forventet. Men kan man frit skifte mellem f.eks. tabletter, som indeholder det samme lægemiddelstof i samme mængde?

I denne artikel diskuteres ét aspekt af denne problemstilling, nemlig om man kan forvente, at lægemiddelstoffet i en tablet optages i blodkredsløbet på samme måde og med samme virkning fra gang til gang. De to størrelser - optagelseshastigheden og mængden af optaget lægemiddelstof - kaldes under ét biotilgængeligheden.

Fig. 1



Opløselighed af hydrocortison i human tarmsaft og tarmsaftens indhold af galdesalte.

Tabletter og kapsler, der indtages gennem munden, skal frigives deres indhold af lægemiddelstof til væske i mave-tarmkanalen, hvorefter det opløste lægemiddelstof skal passere over i det cirkulerende blod med en passende hastighed og så fuldstændigt som muligt.

Biotilgængeligheden af lægemiddelstof vil altid variere lidt fra dag til dag og fra bruger til bruger. Det er imidlertid en vigtig opgave for den, der udvikler lægemidler, at mindske denne variation og dermed at gøre lægemidlets virkning så forudsigelig som muligt: man tilstræber reproducerbarhed i biotilgængeligheden.

Tungtopløselige lægemiddelstoffer

Problemerne med varierende lægemiddeffekt på grund af varierende biotilgængelighed er blevet forstærket i de senere år, fordi mange nye lægemiddelstoffer er meget tungtopløselige. Sådanne stoffer opløses ikke umiddelbart i mave-tarmvæske. Optagelsen i blodkredsløbet er betinget af en række meget komplekse processer i mave-tarmkanalen, som påvirker lægemiddelstoffets frigivelse fra tabletten og dets opløsning i mave-tarmkanalen.

Vi studerer disse opløsningsprocesser for tungtopløselige lægemiddelstoffer for at opnå en bedre forståelse af mekanismerne bag optagelsen i blodkredsløbet. Formålet er især at udvikle laboratoriemetoder,

der kan forudsige, hvordan et lægemiddel vil opføre sig, når det indgives gennem munden. Med sådanne metoder vil man have et værktøj, der kan bruges til at screene nye, potentielle lægemidler uden at skulle belaste dyr eller mennesker med nødvendige undersøgelser. Og man vil opnå et værktøj, der er egnet for den rutinemæssige kontrol af lægemidler til at sikre en reproducerbar biotilgængelighed.

Test af to lægemidler

Hydrocortison, som anvendes til behandling af rheumatisme, og danazol, der har anti-hormoneffekt, er to eksempler på lægemiddelstoffer, der er meget tungtopløselige i vand. Begge stoffer diffunderer hurtigt over tarmvæggen, fordi de er fedtopløselige. Biotilgængeligheden af forskellige brugsfærdige lægemidler vil derfor primært være afhængig af stoffernes opløselighed og opløsningshastighed i mave-tarmvæske.

Vi har undersøgt opløseligheden af de to stoffer i human tarmsaft og i vandige medier, som simulerer sammensætningen af human tarmsaft. Tarmsaften indeholder forskellige enzymer og grænsefladeaktive stoffer, som har betydning for fordøjelsen af vores føde. De har også betydning for opløsningsprocessen af de tungtopløselige lægemiddelstoffer, fordi galdesalte sammen med nedbrydningsprodukter fra fedtstoffer danner såkaldte miceller og vesikler, som opløser lægemiddelstoffet. De simulerede opløsningsmedier indeholder sådanne komponenter.

Tarmsaften blev udtaget fra forskellige personer i fastende tilstand. Hvis personer havde fået en fedtrig kost forud for udtagningen af tarmsaft, var indholdet af galdesalte væsentlig højere end hos personer, der havde spist mager kost. Målinger viste, at hydrocortisons opløselighed stort set var ens uanset indholdet af galdesalte.

Hydrocortisons opløselighed blev også målt i forskellige opløsningsmedier med et indhold af miceldannende stoffer i koncentrationer svarende til fastende tilstand og efter indtagelse af en fedtrig diæt. Det frem-

Fig. 2

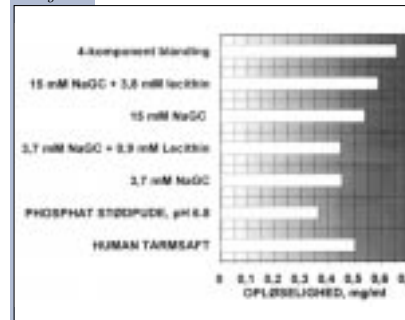
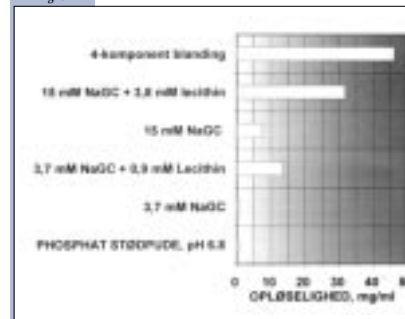


Fig. 3



går, at opløseligheden næsten fordobles, når opløsningsmediet indeholder galdesalte på højt niveau. Den tilsvarende effekt ses ikke ved målinger i tarmsaft. Opløsningshastigheden i de samme medier stiger proportionalt med stigende opløselighed.

For danazols vedkommende viser de tilsvarende undersøgelser, at opløsningsmediets sammensætning har stor betydning for opløseligheden af lægemiddelstoffet. Især til sætning af det grænsefladeaktive stof lecithin til opløsningsmediet har stor effekt på opløseligheden af danazol, men ingen effekt på opløseligheden af hydrocortison.

Vi har desuden undersøgt transporten af danazol over en cellekulturmodel af tarmvæggen. Resultaterne viste, at den hastighed, hvormed danazol passerer over cellelaget og dermed tarmvæggen, er proportional med koncentrationen i opløsningsmediet. Det skyldes, at danazol er meget fedtopløseligt og diffunderer frit gennem tarmvæggen. Biotilgængeligheden af danazolformuleringer er således fuldstændig afhængig af stoffets opløselighed i tarmsaften. Her påvir-

Opløselighed af hydrocortison i human tarmsaft og vandige medier indeholdende natriumglycolat (NaCG) og lecithin. 4-komponent blanding indeholder 12 mM NaCG, 3.8 mM lecithin, 4 mM oleinsyre og 1 mM glycerolmonoleat.

Opløselighed af danazol i vandige medier (samme medier som i figur 2).

bruger har indtaget. For lægemiddelstoffer, der ligner danazol, må man således udvikle lægemidler, som modvirker denne effekt, f.eks. ved anvendelse af galdesalte eller vegetabilsk olie.

Værktøjer til forudsigelser

Hvis det aktuelle lægemiddelstof har en passende vandopløselighed, vil man normalt kunne både forudsige og kontrollere biotilgængeligheden ved hjælp af standardiserede laboratoriemålinger. Det er blandt denne type stoffer, det vil være muligt at skifte mellem synonympræparater, forudsat at præparaterne i laboratoriet udviser ensartede profiler for lægemiddelstoffets opløsning.

En meget stor del - skønsmæssigt over 40 procent - af alle nye lægemiddelstoffer er imidlertid tungtopløselige i vandige medier, og opløseligheden af mange af disse stoffer er stærkt påvirket af mave-tarmvæskernes aktuelle sammensætning. Det kan vi ikke kontrollere i lægemiddel-formuleringen, men vi kan måske kompensere ved passende valg af hjælpestoffer, f.eks. ved at anvende oliebaseerede opløsninger.

Det har stor interesse for den farmaceutiske industri at få udviklet metoder til laboratoriemæssig screening af sådanne lægemiddel-formuleringer. De opløsningsmedier, der er omtalt i denne artikel, vil være værdifulde som grundlag for at opnå viden om samspil mellem lægemiddelstoffet og mave-tarmvæskernes bestanddele. På den baggrund kan man så vælge de mest hensigtsmæssige lægemiddel-formuleringer.

Fig. 4



Forsøgsopstillingen i laboratoriet.



Cand.pharm. Betty Lomstein Pedersen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci.



Cand.pharm. David Ilardia er ph.d.-studerende ved Universitetet i Vittoria i Spanien.



Dr.pharm. Henning Gjelstrup Kristensen er professor ved Institut for Farmaci.

Måling af lægemiddelstoffers opløsning i mave-tarmkanalen

Over en trediedel af alle nye lægemiddelstoffer er tungtopløselige. Mange af disse stoffer tager lang tid om at komme ud i blodet, fordi de først skal opløses i tarmsaften. Derfor er det vigtigt at kunne måle og forudsige nye lægemidlers opløsning i mave-tarmkanalen.

Af Lisbet Baniłkke og Henning Gjelstrup Kristensen

Den terapeutiske effekt af en tablet er afhængig af en lang række processer. Først skal det virksomme lægemiddelstof frigives og opløses i væskerne i mave-tarmkanalen. Derefter skal det opløste stof transporteres frem til tarmvæggen og passere over denne til det cirkulerende blod. Blodet transporterer stoffet rundt i organismen, så det aktive lægemiddelstof når frem til virkningsstedet.

Forløbet af hvert enkelt trin er afhængig af et komplekst samspil mellem lægemiddelstoffets egenskaber, tablettens fremstilling og sammensætning samt de fysiologiske og biokemiske forhold i organismen; først og fremmest i mave-tarmkanalen. Hvis et af trinene forløber anderledes end ventet, kan det have væsentlig betydning for den terapeutiske effekt af lægemiddelstoffet.

Mange nye lægemiddelstoffer er tungtopløselige i vand og opløses derfor langsomt i mave-tarmkanalen. GISOL gruppen ved Institut for Farmaci har netop udviklet en ny metode, som direkte bestemmer opløsningen af sådanne lægemiddelstoffer i tarmsaften hos forsøgspersoner. Formålet er at udvikle laboratoriemetoder, som er bedre end de nuværende til at forudsige nye lægemidlers skæbne i mave-tarmkanalen. Sådanne præcise forudsigelser er af stor betydning for formuleringen, dvs. sammensætningen og fremstillingen, af nye lægemidler indeholdende tungtopløselige lægemiddelstoffer.

Indirekte målinger er ikke gode nok

Man kan ved passende lægemiddel-formulering accelerere eller forsinke opløsningsprocessen og dermed i mange tilfælde styre varighed og tidspunktet for, hvornår lægemidlet begynder at virke. I formuleringen af lægemidler er det derfor helt centralt at have fuld kontrol over frigivelse og opløsning af lægemiddelstoffet i tarmsaften og især at sikre, at opløsningsprocessen sker på en reproducerbar og forudsigelig måde.

I dag vurderes opløsningen fra en tablet ved indirekte metoder, som er baseret på målinger af koncentrationen af lægemidlet i blodet over tid. Målingerne bearbejdes ved hjælp af en kompliceret matematisk model, som beregner tilførslen af lægemiddelstoffet til det cirkulerende blod fra mave-tarmkanalen. Hvis stoffet er i stand til at diffundere frit over tarmvæggen, antager man, at tilførslen afhænger af opløsningsprocessen i mave-tarmkanalen.

Det er især vigtigt at have kendskab til, hvordan formuleringen og forholdene i mave og tarm påvirker opløsningsprocessen. For når det gælder tungtopløselige lægemiddelstoffer, er det nemlig opløsningsprocessen, der begrænser optagelsen i blodet og dermed transporten frem til virkningsstedet.

Antallet af tungtopløselige lægemiddelstoffer er stadig stigende. Udviklingen gennem de senere år viser, at mellem en trediedel og halvdelen af alle nye lægemiddelstoffer er tungtopløselige i vand. Stoffene er ofte fedtopløselige og passerer over tarmvæggen ved passiv diffusion. Det er derfor helt centralt for formuleringen af tungtopløselige lægemiddelstoffer at råde over en metode, som kan karakterisere opløsningsprocessen og afklare, hvordan den påvirkes af de fysiologi-

Sonden Loc-1-Gut, ses her på plads i mave-tarmkanalen. Ved hjælp af sonden måles opløsningen af lægemiddelstoffer i deres naturlige omgivelser.

ske faktorer i mave-tarmkanalen. Især må man vide, hvordan opløsningen påvirkes af naturlige stoffer i tarmene, f.eks. galde salte og enzymer.

Screening af nye lægemiddelstoffer

GISOL gruppen arbejder med flere projekter, hvis langsigtede formål er udvikling af laboratoriemetoder, der kan anvendes til screening af lægemiddelstoffer og formuleringer og dermed tjene til optimering af nye lægemidler.

Da en sikker viden om opløsningsprocessen i mave-tarmkanalen er essentiel, har gruppen i samarbejde med Hans Lennernas, Uppsala Universitet, udviklet en direkte målemetode, som bestemmer lægemiddelstoffets opløsning i tarmene. Metoden er en modificering af en teknik, Hans Lennernas har udviklet og anvendt i et arbejde for den amerikanske Food and Drug Administration som led i etableringen af et biofarmaceutisk klassifikationssystem for lægemiddelstoffer.

Metoden er baseret på en sonde, som indføres gennem munden ned i tyndtarmen på raske frivillige forsøgspersoner. Sonden, Loc-1-Gut, er 175 millimeter lang og ca. 5 millimeter i diameter. Den består af 6 kanaler og er i den nedre ende forsynet med to balloner, der kan pustes op ved hjælp af to af kanalerne. De øvrige kanaler anvendes til at indgive lægemiddelstof og til at tage prøver ud igennem.

Den korrekte placering af sonden er vigtigt, hvilket sikres med

optagelse af et røntgenbillede. Når sonden er på plads, pustes den nederste ballon op, således at der skabes et segment af tarmen, der er lukket af for passage nedad til. I dette segment kan opløsningsprocesserne undersøges i deres naturlige omgivelser. Det er ikke muligt at indgive faste lægemidler gennem sonden. Lægemiddelstoffet indgives derfor i form af en opløsning af partikler. Segmentet skylles konstant igennem med væske i små mængder, og prøver udtages løbende fra segmentet. I de opsamlende prøver skilles uopløste partikler fra, og mængden af uopløst og opløst stof analyseres.

Samtidigt med, at forsøget foregår i tarmen, tages der blodprøver for at bestemme den mængde lægemiddelstof, som er blevet optaget i blodbanen. Vi kan hermed udføre den traditionelle indirekte vurdering af opløsningsprocessen parallelt med den nye direkte måling.

Mere sikre resultater

Der er foreløbig udført to undersøgelser, hvor anti-epileptikumet carbamazepin er anvendt som modelstof. Carbamazepin er tungtopløseligt i vand og vi ved, at opløsningsprocessen er det hastighedsbestemmende trin i absorptionsprocessen.

Vi opnåede en meget fin overensstemmelse mellem den direkte måling af opløsningsprocessen og den indirekte bestemmelse baseret på blodkoncentrationer over tid, som blev beregnet ved hjælp af matematiske modeller. Det er første gang, der foreligger en verificering af den

nye indirekte metode baseret på beregning ud fra blodkoncentrationsdata. Dette resultat ændrer ikke de eksisterende metoder og procedurer for dokumentation for nye lægemidler, men fjerner et væsentligt usikkerhedsmoment.

Derimod var der markant forskel mellem den målte opløsningsproces i mave-tarmkanalen hos mennesker og de resultater, som blev opnået ved målinger i laboratiemodeller. I det ene laboratorieforsøg brugte vi et opløsningsmedium, der er almindeligt anvendt i dag. I det andet anvendte vi et medium indeholdende galde salt, som vi ved influerer på opløsningen af carbamazepin.

Samlet viser forsøgene, at der er en fundamental vanskelighed ved at sammenligne laboratoriedata med data opnået i forsøg med mennesker. Sammenligningen har stor betydning for den farmaceutiske industri, fordi sundhedsmyndighederne som forudsætning for godkendelse af nye lægemidler kræver udvikling af laboratoriemetoder, der kan afsløre variationer i opløsningsprocessen, som har betydning for den terapeutiske effekt.

Den udviklede metode er både vanskelig og økonomisk krævende. Den er derfor ikke egnet for rutinemæssige studier af lægemiddelstoffer og lægemiddelformuleringer. Men de resultater, vi opnår med metoden, vil kunne danne grundlag for udviklingen af laboratiemetoder, som giver en bedre sammenhæng mellem resultater opnået i laboratoriet og i klinikken.

De resultater, vi opnår med denne metode, vil desuden øge vores viden om mave-tarmvæskernes betydning for opløsning og absorption af tungtopløselige lægemiddelstoffer. Det er en viden, der vil kunne udnyttes i rationel lægemiddeludvikling.

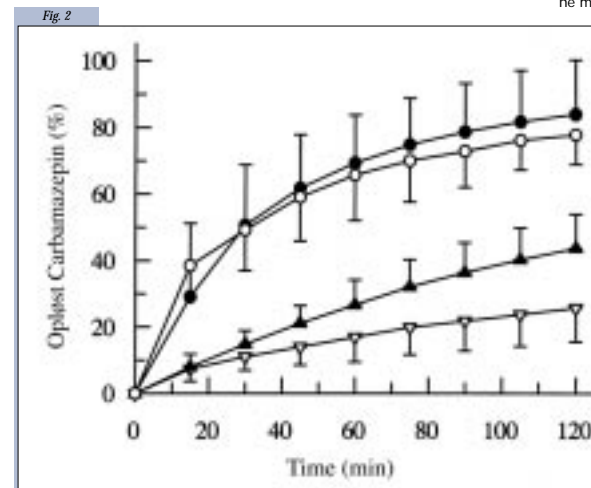
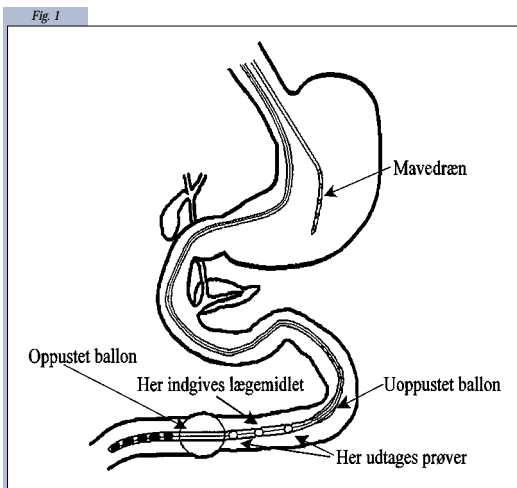
Opløsningsprofiler for lægemidlet carbamazepin, der anvendes til at behandle epilepsi, opnået ved direkte måling (●), matematisk modellering af plasmaprofiler (○), opløsning i en laboratiemodell i fosfatbuffer (▽) og buffer tilsat galde salt (▲).



Cand.pharm. Lisbet Baniłkke er ph.d. studerende ved Institut for Farmaci.



Dr. pharm. Henning Gjelstrup Kristensen er professor ved Institut for Farmaci.



Smarte polymerer fører lægemiddelstoffet mod målet

Lægemiddelstoffer, som proteiner og peptider, er ikke egnede til indgift gennem munden, fordi de nedbrydes i maven eller tyndtarmen. Problemet kan løses ved at indbygge lægemiddelstoffet i polymerer, som beskytter stoffet mod nedbrydning og først frigiver det, hvor det er ønskeligt.

Af Flemming Madsen

I de senere år har der været en markant forskningsmæssig fokusering på brugen af peptider og proteiner til sygdomsbehandling. Mange af disse lægemiddelstoffer er særdeles lovende, men de stiller store krav til sammensætningen og fremstillingen af lægemidlet. I hvert fald hvis man ønsker at indgive medicinen via munden.

Det er oftest ønskeligt at indgive lægemidler i tabletter eller kapsler, da det som regel er den bedste og mest behagelige måde at indtage lægemidler på. Men i dag er dette ikke muligt, når det drejer sig om lægemidler, som indeholder peptider og proteiner.

Fig. 1



Kontrolleret afgift af lægemiddelstoffer
Formålet med at kontrollere frigivelsen af lægemiddelstoffet ved hjælp af smarte polymerer er at opnå en mere effektiv behandling.

Frigivelsen kan være konstant eller cyklisk over en længere periode og kan aktiveres af omgivelserne eller andre eksterne stimuli. Risikoen for en eventuel overdosering eller underdosering kan elimineres ved vedligeholdelse af lægemiddelstoffet indenfor et bestemt niveau i kroppen. En anden fordel er, at sådanne systemer kan føre til færre indtagelser af lægemidlet og dermed forbedret brug hos patienterne.

Der kan imidlertid også være ulemper, som ikke bør negligeres: mulige toksiske effekter, mangel på forlidelighed med kroppen af polymermaterialet, uønskede nedbrydningsprodukter samt mulighed for gener for patienterne. En anden ulempe er, at sådanne sofistikerede lægemidler generelt vil føre til højere produktionsomkostninger sammenlignet med traditionelle lægemidler.

I dag er det muligt at designe en lang række komplekse polymersystemer, der både er ikke-toxiske og kompatible med kroppen, og hvis virkning er bestemt og afhængig af en given ydre faktor. Et lovende system er anvendelsen af smarte polymerer som hydrogeler.

Hydrogeler som lægemiddelsystem

Hydrogeler er krydsbundne polymerer, som danner et tredimensionelt netværk. Gelerne er i sig selv uopløselige i vand eller andre biologiske væsker, men de kan optage store mængder vand. Optagelsen af vand får hydrogelen til at svulme op (kvælde), hvorved et indbygget lægemiddelstof kan diffundere ud

Billedet viser fra venstre den tørrede, ikke kvældede hydrogel, dernæst den samme hydrogel kvældet ved henholdsvis pH 3,6 og 7,4. Bemærk den enorme forskel i vandoptagelse.

gennem netværket og frigøres til omgivelserne.

Hydrogelerne kan oftest optage vand mange gange deres egen vægt og vil ved ligevægt typisk indholde op til 70-90% vand og kun 10-30% polymer. Hydrogeler anvendes i sin tørrede form og kan f.eks. fremstilles som en tablet, en kapsel eller et overtræk.

Et unikt forhold ved disse hydrogeler er, at deres vandindhold kan reguleres af ganske bestemte ændringer i det miljø, der omgiver systemet. Afhængig af polymertypen kan den udløsende faktor f.eks. være pH, temperatur, ionstyrke eller enzymatisk. Hydrogelen kan så enten optage eller afgive væske ved en ændring af en af disse parametre. For de fleste af sådanne polymerer gælder det, at strukturændringerne i hydrogelen er reversible, og den givne ændring kan således vendes eller gentages ved yderligere ændringer i det omgivende miljø.

Ny lovende hydrogel

Under et forskningsophold på Purdue University i USA arbejdede jeg sammen med professor N.A. Peppas om syntesen og karakteriseringen af et nyt polymermateriale til anvendelse i lægemidler. Denne hydrogel er et pH følsomt system, dvs. dets evne

til at optage og afgive vand er bestemt af omgivelsernes surhedsgrad.

Hydrogelen består af et krydsbundet netværk af polymethacrylsyre, hvorpå kæder af ethylenglycol i forskellig længde eller i forskellig mængde påhæftes. Systemet kaldes P(MAA-g-EG). I et surt miljø er netværksstrukturen klappet sammen, og polymerkæderne viklet ind i hinanden. Ved højere pH-værdier brydes komplekset og polymerkæderne foldes ud. Netværksstrukturen udvides nu kraftigt som følge af, at hydrogelen optager vand, hvorved lægemiddelstoffet kan blive frigjort.

Materialet er blevet udviklet til indgift igennem munden, da sådanne hydrogeler vil beskytte lægemiddelstoffet mod det sure miljø i mavesækken, og først frigøre stoffet i tyndtarmen. Derudover er hydrogelerne i stand til at hæfte sig fast på det slimlag eller slimhinder, der udgør overfladen i tarmvæggen. Det kan muligvis udnyttes til at forlænge lægemiddelsystemets transitid i mave-tarmkanalen, hvilket øger chancen for, at lægemiddelstoffet optages gennem tarmvæggen og ud i blodet. Endnu en brugbar egenskab ved disse geler er deres potentielle evne til at hæmme visse proteinnedbrydende enzymer.

Fig. 2



Den essentielle måleenhed på instituttets rheometer, hvor hydrogelernes mekaniske egenskaber testes. Polymermaterialet placeres mellem de to plader, som køres sammen, hvorefter materialets viskoelastiske egenskaber kan bestemmes og relateres til hydrogelens netværksstruktur.

Struktur og egenskaber

En række forskellige P(MAA-g-EG) hydrogeler er blevet syntetiseret og karakteriseret med henblik på at klarlægge sammenhængen mellem gelernes struktur og deres fysisk-kemiske egenskaber. Desuden er det blevet undersøgt, hvorvidt disse polymerer var i stand til at hæmme enzymet trypsin, som findes i mave-tarmkanalen, og som er et af de enzymer, der er med til at nedbryde peptider og proteiner.

Undersøgelserne viste, at hydrogelernes evne til at optage vand var meget afhængig af pH og de tilstedeværende ioner. Ved lav pH danner hydrogelerne polymerkomplekser, og intet eller kun lidt væske optages. Hydrogelerne holdes imidlertid sammen af brintbindinger, og som pH stiger, brydes disse bindinger, og hydrogelerne begynder at svulme voldsomt op. Tilstedeværelsen af ioner har en stor indflydelse på gelernes evne til at optage og afgive vand. Således optager hydrogelerne mindre vand, hvis calcium er tilstede sammenlignet med natrium.

Hydrogelernes egenskaber kan varieres dels med molekylstørrelsen af ethylenglycolkæder og dels med antallet af disse i polymeren. Krydsbindingsgraden er afgørende for gelernes mekaniske styrke. Jo større mekanisk styrke, jo mindre vand kan der optages.

De fremstillede geler var i nogen grad i stand til at hæmme trypsins aktivitet. Enzymhæmningen var ikke signifikant for alle de fremstillede hydrogeler, men det var interessant at konstatere, at hæmningen var direkte relateret til, hvor meget calcium, de enkelte hydrogeler var i stand til at binde. Således opnåedes den største enzymhæmning for de hydrogeler, der bandt mest calcium.

Systemet testes nu i dyreforsøg

Professor N.A. Peppas og hans medarbejdere i USA har nu lavet indledende forsøg med rotter, som fik insulin i P(MAA-g-EG) geler. Yderligere forsøg i andre dyremodeller er også undervejs. Eksperimenterne har indtil videre givet lovende resultater, hvilket umiddelbart giver anledning til at spå materialet en stor fremtid inden for behandling med peptider og proteiner.

For man når så vidt, er det dog nødvendigt med yderligere karakterisering af materialet, ligesom det er nødvendigt at karakterisere interaktionerne mellem lægemiddelstofferne og hydrogelen med henblik på at bestemme stabiliteten af de anvendte peptider og proteiner.



Cand.pharm., ph.d. Flemming Madsen er forskningsadjunkt ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.

Medicinsk behandling af Føllings sygdom

Føllings sygdom medfører mental retardering, hvis sygdommen ikke behandles med diæt fra fødslen. Årsagen til sygdommen er mangel på et bestemt enzym i leveren. Et alternativ til den strenge diæt vil være at indgive enzymet i tabletter. Men det kræver, at enzymet pakkes effektivt ind, så det ikke nedbrydes i maven eller tarmene.

Af Mette Ingemann, Sven Frøkjær, Lars Hovgaard og Helle Brøndsted

Føllings sygdom eller phenylketonuri (PKU) er en arvelig medfødt stofskiftesygdom, som konstateres for én ud af hver 10.000 nyfødte verden over. PKU skyldes mutationer i et gen, som koder for enzymet phenylalaninhydroxylase (PAH). Enzymet er aktivt i leveren, hvor det nedbryder fødens indhold af aminosyren phenylalanin. Hos børn med PKU fungerer leverenzymer ikke. Resultatet er, at phenylalanin ophobes i organismen. Det fører til mental retardering, hvis barnet ikke kommer på streng diæt.

Phenylalanin tilføres organismen ved nedbrydningen af proteinholdige fødevarer i mave-tarmsystemet til frie aminosyrer eller små brudstykker af proteiner bestående af ganske få aminosyrer. Da PKU-patienter ikke kan omdanne phenylalanin, ophobes aminosyren i organismen, og diagnosen for Føllings sygdom kan således stilles ud fra analyser af mængden af phenylalanin i blodet.

Alle nyfødte i Danmark får taget

en blodprøve, som analyseres på Statens Seruminstitut, hvorfra forældrene får besked om yderligere undersøgelser, hvis koncentrationen af phenylalanin i blodet er forhøjet i forhold til det normale niveau. Ophobning af phenylalanin i organismen medfører hurtigt hjerneskader, og derfor er det vigtigt, at diagnosen stilles hurtigt, og at behandlingen startes fra barnets første levedage.

Alternativer til den strenge diæt

I dag er den eneste form for behandling af PKU en streng diæt, som sikrer, at barnet udvikler sig normalt. Princippet er at undgå at indtage fødevarer, der indeholder store mængder phenylalanin. Varedeklarationen på mange fødevarer er påtegnet "Indeholder phenylalanin" netop for at informere PKU-patienter.

Diætbehandlingen fastlægges individuelt på behandlingscentret John F. Kennedy Institutet i Glostrup, hvor patienterne også går til kontrol gennem hele behandlingsperioden, som minimum skal fortsættes op til teenageårene. Kvindelige patienter skal ligeledes på diæt under en graviditet. Hverdagen for PKU-patienter og deres familier er kompliceret som følge af de strenge restriktioner i indtagelsen af fødevarer, og der er et stort behov for en alternativ behandlingsstrategi.

En mulig fremtidig behandlingsform er genterapi, hvor organismen selv bliver i stand til at producere det manglende enzym. Et alternativ til genterapi er enzymsubstitutionsterapi. Patienten tilføres her det manglende enzym, eller et med tilsvarende effekt, med regelmæssige mel-

lemrum. Den mest bekvemme måde for patienten at indtage enzymet på er via en tablet eller en kapsel. Problemet med dette princip er, at enzymet nedbrydes i mave-tarmsystemet af fordøjelsesenzymer på samme måde som proteinholdige fødevarer. Hvis enzymsubstitutionsterapien skal have en fremtid, skal der findes en løsning på stabilitetsproblemerne i mave-tarmsystemet.

Stabilisering af terapeutisk enzym

Det har længe været kendt, at det mikrobielle enzym phenylalanin-ammonialyase (PAL) omdanner phenylalanin til det ikke-toxiske kanelsyre. En canadisk forskergruppe har arbejdet med beskyttelsen af Føllings sygdom netop ved at gøre brug af PAL og vist, at det er muligt at reducere phenylalanin mængden i blodet efter oral indtagelse af store mængder PAL i mikrokapsler.

Som nævnt tidligere er det nødvendigt at stabilisere enzymet, for at det ikke ødelægges, inden det får lov til at udføre sin virkning lokalt i mave-tarmsystemet. En løsning kunne være fysisk at beskytte det indgivne enzym mod fordøjelsesenzymerne ved at indlejre enzymet i et gelnetværk, hvor fordøjelsesenzymerne ikke kan komme ind. Forhindring af tæt kontakt mellem enzymet og fordøjelsesenzymerne kunne alternativt opnås via store molekyler, der er fæstnet på det indgivne enzym.

På Institut for Farmaci har vi arbejdet med at finde en metode til at beskytte PAL mod de mest dominerende fordøjelsesenzymer trypsin og chymotrypsin med henblik på oral administration. Vi har taget udgangspunkt i drug delivery syste-

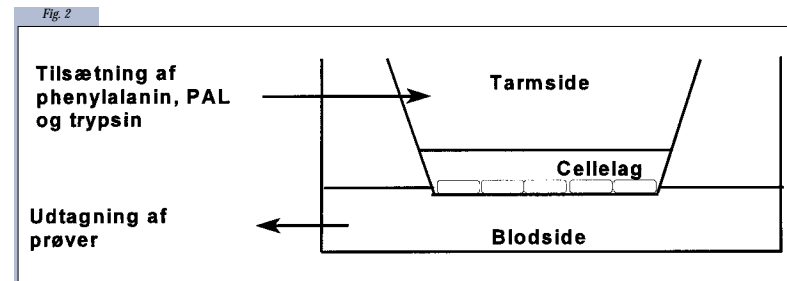


Fig. 2
Cellelag som model for mave-tarmslimhinden. Phenylalanin, PAL og fordøjelsesenzymer appliceres på tarmsiden og prøver udtages fra blodsiden. Mængden af phenylalanin og omdannelsesproduktet kanelsyre bestemmes i prøverne.

mer baseret på polymermaterialer f.eks. acrylater eller polyethylen-glycol (PEG). Arbejdet har primært været koncentreret om syntese af hydrogeler via to principielt forskellige polymeriseringsreaktioner samt PEG-PAL-konjugater via en koblingsreaktion.

Hydrogeler er tredimensionelle polymer-netværk, hvor det terapeutiske enzym indlejres mellem de kemisk krydsbundne polymerkæder. PEG-konjugaterne er forbindelser hvor ganske få lineære PEG-molekyler kemisk fæstnes til det terapeutiske enzym. Drug delivery systemer af varierende sammensætning er blevet syntetiseret, fysisk-kemisk karakteriseret og vurderet med hensyn til opretholdelse af PAL's enzymaktivitet efter syntese, efter opbevaring og ved kontakt med fordøjelsesenzymer.

Hydrogeler har i mange sammenhænge vist sig at kunne bruges som system til kontrolleret afgift af små lægemiddelmolekyler, som frigi-

ven. Det var forventet, at indlejringen af det store PAL-molekyle ikke ville resultere i afgift fra systemet. Vi håbede således på, at phenylalanin ville diffundere ind i hydrogelen, hvor stoffet ville blive omdannet til kanelsyre, som så ville sive ud igen. Det viste sig dog hurtigt, at PAL mistede den overvejende del af sin aktivitet ved syntesen af drug delivables enzym indlejres mellem de kemisk krydsbundne polymerkæder. PEG-konjugaterne er forbindelser hvor ganske få lineære PEG-molekyler kemisk fæstnes til det terapeutiske enzym. Drug delivery systemer af varierende sammensætning er blevet syntetiseret, fysisk-kemisk karakteriseret og vurderet med hensyn til opretholdelse af PAL's enzymaktivitet efter syntese, efter opbevaring og ved kontakt med fordøjelsesenzymer.

PEG-PAL-konjugater tegner lovende

PEG-konjugering er et hyppigt anvendt stabiliseringsprincip for terapeutiske proteiner beregnet på injektion, hvor flere produkter allerede er registrerede lægemidler. Den stabiliserende effekt vil også kunne udnyttes ved oral administration, og for PAL viste teknikken sig anvendelig.

Enzymaktiviteten af PAL blev bibeholdt efter syntese samt efter

længere tids opbevaring. Forsøg med kontakt til fordøjelsesenzymer viste samtidig, at PEG-PAL-konjugater var aktive dobbelt så lang tid som det frie PAL. Anvendeligheden blev yderligere bekræftet efter transportforsøg med Caco2 celler: en laboratoriemodel af mave-tarmslimhinden. Phenylalanin og enten frit eller PEG-konjugeret PAL blev appliceret på tarmsiden, hvorefter mængden af phenylalanin og produktet kanelsyre blev kvantiseret på blodsiden ved HPLC-analyse.

Da PAL ikke passerer cellelaget, kunne det fastslås, at PAL - enten frit eller konjugeret - omdanner phenylalanin til kanelsyre på tarmsiden, og at kanelsyren hurtigt transporteres over cellelaget til blodsiden. Ved samtidig tilstedeværelse af trypsin på tarmsiden var mængden af transporteret kanelsyre mindre for det frie PAL end for det PEG-konjugerede PAL. Det viser, at PEG-konjugeringen til en vis grad forhindrer trypsin i at ødelægge PAL.

Ved at variere forsøgsbetingelserne for koblingsreaktionen mellem PEG og PAL, aktiveringsgruppen på PEG-molekylet samt molekylvægt og mængde af PEG kan den stabiliserende effekt optimeres. Herefter vil test i PKU-dyremodel være det næste trin i en vurdering af, om PEG-konjugeringen af PAL er en mulighed for en fremtidig medicinsk behandling af Føllings sygdom.

Mængde kanelsyre transporteret over cellelaget som funktion af tiden for frit PAL og PEG-konjugeret PAL med og uden tilstedeværelse af trypsin.

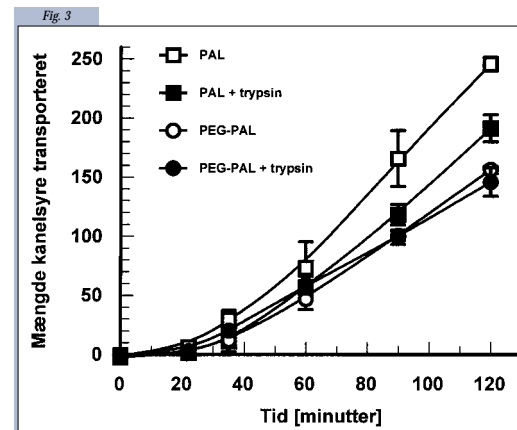


Fig. 3
Mængde kanelsyre transporteret over cellen som funktion af tiden for frit PAL og PEG-konjugeret PAL med og uden tilstedeværelse af trypsin.



Cand.pharm. Mette Ingemann er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci.



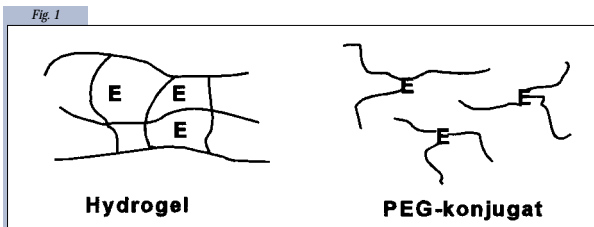
Cand.pharm., ph.d. Lars Hovgaard er professor ved Institut for Farmaci.



Cand.pharm., ph.d. Lars Hovgaard er lektor ved Institut for Farmaci.



Cand.pharm., ph.d. Helle Brøndsted er lektor ved Institut for Farmaci.



PKU skyldes mangel på et leverenzym. Et alternativ til diætbehandlingen er at tilføre det manglende enzym i tabletter eller kapsler. Desværre nedbrydes enzymet i mave-tarmsystemet. Det terapeutiske enzym kan imidlertid beskyttes ved, at det indlejres i hydrogeler eller ved at store PEGmolekyler konjugeres til enzymet. E står for enzymet.

Depoteffekt efter injektion

Når visse lægemidler injiceres i muskler, frigives de gradvist over et døgn eller nogle uger. Omkring 30 depotpræparater markedsføres i Danmark, og flere nye lægemidler er under udvikling. Derfor er der behov for en mere fuldstændig forståelse af præparaternes virkemåde, så deres effekt kan optimeres.

Af Dorrit Høj Larsen, Susan Weng, Karin Fredholt, Gitte Juel Fris og Claus Selch Larsen

Langt den hyppigste og mest bekvemme måde at indtage medicin på er i form af tabletter eller kapsler. Der er imidlertid flere situationer, hvor der er behov for alternative måder til at få lægemiddelstoffer ind i kroppen. En af mulighederne er at indgive stoffet ved injektion, hvor det aktive stof indsprøjtes direkte i en vene, under huden eller i en muskel.

Et godt eksempel er insulin, der anvendes i behandlingen af diabetes. Insulin kan ikke transporteres fra mave-tarmkanalen over i blodbanen og kan derfor ikke indgives som tabletter. Mange diabetespatienter må derfor sprøjte sig en eller flere gange dagligt for at få tilført den til-

strækkelige mængde af det livsnødvendige stof.

En tilsvarende dårlig optagelse efter indtagelse gennem munden gør sig gældende for andre proteinlignende lægemiddelstoffer samt for mange vacciner, der som følge heraf må injiceres. Det må forventes, at flere af fremtidens bioteknologisk frembragte lægemidler vil have vanskeligt ved at passere den biologiske barriere, som tarmvæggen udgør. Også for sådanne stoffer vil indsprøjtning måske udgøre den eneste realistiske og reproducerbare administrationsvej.

I sjældne tilfælde kan det forekomme, at patienter ikke er motiverede til at tage deres medicin til trods for, at den lægelige vurdering har fundet medicinering påkrævet. Dette kan være tilfældet for visse sindslidende, f.eks. skizofrene personer, som af hensyn til dem selv og samfundet bør være i stabil behandling med et neuroleptikum. Sådanne patienter behandles i kortere eller længere tid med injektionspræparater med lang virkningstid. Depotlægemidlet sprøjtes her ind i en muskel, hvorfra det virksomme stof langsomt frigøres, således at den terapeutiske effekt kan holde sig i 2-4 uger.

Fordelen ved depotpræparaterne er blandt andet, at patienten ikke skal behandles så ofte. For en del af de injicerbare depotlægemidler gør

det sig endvidere gældende, at den månedligt indgivne mængde stof er væsentligt mindre end, hvis stoffet tages i form af en tablet en gang om dagen i den samme periode. Det skyldes, at lægemiddelstoffet, når det gives som en tablet, skal passere leveren, inden det kommer frem til virkningsstedet i hjernen. I leveren kan lægemiddelstoffer i større eller mindre udstrækning blive nedbrudt. Ved injektion transporteres stoffet til hjernen uden passage af leveren i første omgang.

Indsprøjtning vil fortsat være nødvendig, men vil formentlig aldrig blive den foretrukne vej til at få lægemiddelstoffer ind i kroppen. Det hænger sammen med, at der er en vis risiko forbundet med at give injektioner, hvorfor disse normalt foretages af specielt uddannet personale.

Oliedepoter til injektion

Depoteffekten af et givent lægemiddel kan ikke nødvendigvis relateres til en nærmere fastsat virkningsvarighed på eksempelvis en uge eller derover. Varigheden bestemmes nemlig af det enkelte lægemidlets egenskaber og den vej, hvoraf stoffet indgives. For visse insulinpræparater kan virkningen holde sig i op til 36 timer, mens nogle depotpræparater til behandling af skizofreni virker i op til 30 dage.

Der er i Danmark markedsført omkring 30 depotinjektionspræparater, som primært kan inddeles i to grupper; krystaluspensioner og olieopløsninger. Den førstnævnte type består af meget små faste partikler i et vandigt eller olieholdigt medium. Til oliedepoterne anvendes vegetabiliske olier som kokosnødolie og sesamololie, hvori det aktive stof er opløst.

Oliedepoter til injektion i muskler har været anvendt i mange år. Men alligevel foreligger der ikke en fuldstændig forståelse af, hvorfor præparaterne virker, som de vittentlig gør. Det hænger i høj grad sammen med, at lægemidlerne er udviklet og

Pharmaceutisk-kemiske aspekter ved depotinjektioner.

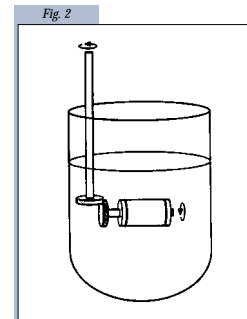


Fig. 2. Fremover må der forventes en stigende anvendelse af depotlægemidler. Derfor er der behov for at undersøge, hvordan lægemiddelstoffer frigøres fra oliedepoter. Her anvendes en roterende dialysecelle. Oliedepotet med lægemiddelstoffet anbringes i cellen, hvorpå stoffets frigørelse til vandet måles. Metoden er en model for, hvordan depotpræparater frigives fra muskelvæv.

registreret mange år tilbage, hvor analysemetoderne langt fra var så udviklede, som de er i dag.

Fremover må der generelt forventes et øget behov for anvendelse af depotlægemidler. Et væsentligt fremskridt inden for dette område vil være at sikre optimal styring af den hastighed, hvormed lægemiddelstoffet frigives fra depotet og dermed når virkningsstedet i organismen.

Nye prodrugs i depotpræparater

Oliedepoterne byder på en række produktionstekniske fordele sammenlignet med krystalpræparater. Ikke mindst er det enkelt at opnå sterile præparater, og da olierne har været brugt gennem mange år, er det dokumenteret, at de er ugiftige.

Design af oliedepoter åbner endvidere på fascinerende vis mulighed for at kombinere mere traditionelle formuleringsmæssige tiltag med såkaldte prodrugs; eller på dansk transportformer. Her omdannes lægemiddelstoffet til et inaktivt stof ved at koble det sammen med et ugiftigt transportstof. På det ønskede sted i kroppen spaltes det pågældende prodrug tilbage til det oprindelige lægemiddelstof samt transportstoffet. Spaltningen kan f.eks.

Eksempler på udløsningsprofiler, hvor mængden af stof afgivet fra oliedepotet til det vandige miljø er bestemt som en funktion af tiden. Modelstoffet er en svag syre, og det ses, at både afgiftshastigheden og mængden af afgivet stof varierer med vandets pH-værdi.

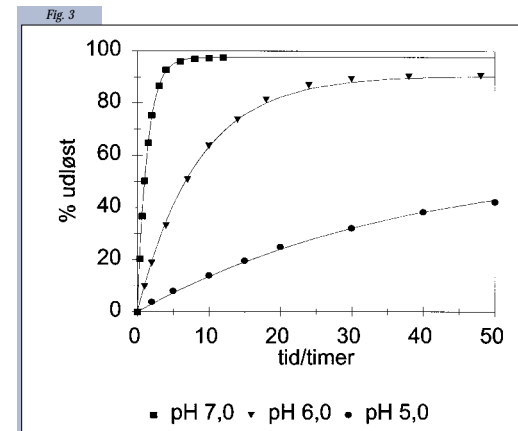
blive udløst af enzymer eller pH i det pågældende væv.

Forud for egentlige dyreforsøg med sådanne nye depotsystemer, arbejder vi på at opbygge laboratoriemodeller til studier af den hastighed, hvormed modelstoffer frigøres fra oliepræparater til et vandigt medium. Vi studerer her betydningen af såvel den kemiske struktur af modelstoffer som oliernes sammensætning på frigørelses-hastigheden. For et depot, der er sprøjtet ind i en muskel, vil den aktive substans blive afgivet til den omliggende vævs-væske og herfra transporteret over i blodkredsløbet. Vi arbejder på at klarlægge hvilke mekanismer, der på injektionsstedet bidrager til at få stoffet ud af oliepotet.

I den venøse del af blodbanen kan et lægemiddelstofs eller en transportforms skæbne blive påvirket af enzymer og andre komponenter i blodet. Det indgivne stof vil herefter nå hjertet, der pumper blodet ud i lungerne. Efter passagen gennem lungerne transporteres det aktive stof tilbage til hjertet, som så pumper det iltede blod ud i kroppen. En del af blodet med lægemiddelstoffet går til hjernen. I relation hertil er vi specielt interesseret i at designe prodrugs, som er i stand til at krydse blod-hjerne-barrieren med efterfølgende spaltning i hjernen, hvorefter det oprindelige lægemiddelstof så frigives.

Den roterende dialysecelle-model

I undersøgelserne af, hvordan forskellige faktorer påvirker frigørelses-hastigheden fra olie, bruger vi en roterende celle, der er cylinderformet og opbygget af en dialysemembran. Oliepræparatet anbringes i cel-



Dr.pharm. Claus Selch Larsen er professor ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi



Cand.pharm. Dorrit Høj Larsen er ph.d.-studerende ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Cand.pharm. Susan Weng er ph.d.-studerende ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Cand.pharm., ph.d. Karin Fredholt er adjunkt ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Cand.pharm., ph.d. Gitte Juel Fris er lektor ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi

Model for mundslimhinden kan reducere brugen af forsøgsdyr

Mange mennesker vil foretrække indgift af lægemidler gennem mundslimhinden via hurtigtværende tabletter, tyggegummi eller en slags plaster, der sættes på indersiden af kinden frem for injektioner. Sådanne lægemidler testes ofte på dyr, men en ny cellemodel for mundslimhinden kan reducere antallet af dyreforsøg.

Af Hanne Mørck Nielsen og Margrethe Romer Rassing

Mange livsnødvendige lægemiddelstoffer er ikke effektive i form af tabletter, men må i stedet injiceres direkte i blodet. Årsagen er typisk, at det aktive stof i for høj grad nedbrydes i menneskets tarmsystem, hvis det indgives i tabletter.

Nogle af disse lægemiddelstoffer kan med fordel indgives gennem mundslimhinden, hvorfra de optages direkte i blodkredsløbet. Et eksempel er behandling af hjertekramper med glycerylnitrat i hurtigtværende tabletter, som anbringes under tungen.

Fig. 1



Tyggegummi eller en slags plaster, der sættes på indersiden af kinden, er andre måder, hvorved lægemiddelstoffer kan indgives via mundhulen.

For at vurdere, om et nyt levende lægemiddelstof kan optages gennem mundslimhinden, anvendes ofte modeller for mennesket. Den optimale model ville være en model baseret på vævsstykker udtaget fra frivillige forsøgspersoner, men dette er ikke muligt i særlig høj grad af etiske og praktiske grunde. I stedet anvender man ofte dyremodeller i lægemiddelforskningen. Det er dog langt fra givet, at resultater fra forsøg med f.eks. rotter kan overføres direkte til mennesker. Dertil kommer, at det ikke er etisk acceptabelt at anvende det store antal forsøgsdyr, som ofte kræves til grundlæggende studier.

Derfor er der en stor interesse for at udvikle modeller for mundslimhinden baseret på celler, som dyrkes uden for den levende organisme. Cellemodeller gør det muligt at udføre flere og mere ensartede forsøg ad gangen. Ved anvendelse af menneskeceller undgår man samtidig usikkerheden ved eventuelle

variationer fra dyr til mennesker.

Ofte anvendes hurtigtværende kræftceller, der i vid udstrækning ligner de normale celler. Kræftceller er u dødelige, hvilket betyder, at den samme type celler kan anvendes til uendelig mange forsøg.

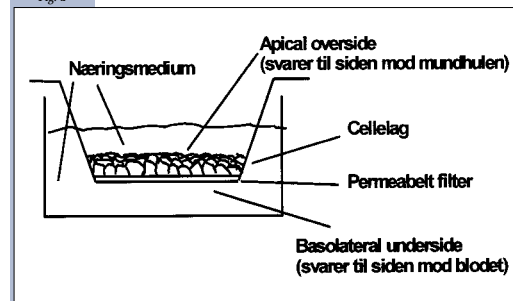
Cellemodel af mundslimhinden

En type kræftceller, kaldet TR146, udtaget fra en metastase af en cancer i mundslimhinden hos en kvinde, har ved næring og dyrkning på permeable filtre vist sig at danne en membran af flere cellegang, der delvis svarer til indersiden af menneskets kind. Den forventes derfor at udgøre en god model for menneskets mundslimhinde. Modellen kan bruges ved en generel vurdering af nye potentielle lægemiddelstoffers evne til at absorberes gennem mundslimhinden samt til vurdering af stoffers giftighed.

En af fordelene ved anvendelse af denne cellemodel i stedet for levende dyr eller væv fra dyr er, at cellerne forbliver levende, hvorimod væv udtaget fra eksempelvis hunde eller svin kun kan holdes levende i et begrænset tidsrum, hvorfor der må anvendes et nyt dyr ved hvert forsøg. En anden fordel ved brug af cellemodellen er, at der er mindre variation mellem de enkelte forsøg og dermed større mulighed for at skelne mellem resultater, som opnås med forskellige lægemiddelstoffer. Det er endvidere muligt at studere effekter på celleniveau og at kontrollere forsøgsomstændighederne nøje. Modellen vil kunne erstatte flere former for forsøg på levende dyr såvel som på væv udtaget fra forsøgsdyr.

Et stykke mundslimhinde udtages fra et menneske. Mundslimhinden bruges som kontrol ved karakterisering af TR146-cellemodellen. Den nye cellemodel kan bruges til testning af lægemidler, som skal trænge gennem mundslimhinden, i stedet for stykker af mundslimhinde fra mennesker eller dyr.

Fig. 2



Sammenligning med mennesker og dyr

For at resultater opnået med TR146-cellemodellen kan overføres til mennesket, er det vigtigt, at modellen karakteriseres og sammenlignes ikke blot med mennesket, men også med de modeller, der i dag anvendes i stedet for mennesket. I flere forskellige typer af studier er TR146-cellerne derfor sammenlignet med mundslimhinde fra frivillige raske forsøgspersoner samt med mundslimhinde udtaget fra slagtesvin.

I en type af forsøg bestemmes, hvor hurtigt samt hvordan et stof trænger fra den ene side af TR146-cellemodellen til den anden side. Dette kan sammenlignes med passage over mundslimhinden fra mundhulen til blodbanen. Hvor hurtigt dette sker, afhænger bl.a. af størrelsen af stoffet, dvs. molekylvægten, samt af, hvor fedtopløseligt stoffet er.

I samarbejde med forskere ved Leiden/Amsterdam Center for Drug Research i Holland er der undersøgt en række modelstoffer, der er lige fedtopløselige, men har forskellig molekylvægt. Studierne er dels udført med TR146-modellen og dels med mundslimhinder fra svin.

Hastigheden for absorption af stoffer med omtrent samme molekylvægt, men med forskellig fedtopløselighed, viser samme tendens i de to modeller. Nogle af de stoffer, der er anvendt i de ovennævnte studier, er også blevet testet på mundslimhinde fra mennesker ved samarbejde med læger fra Rigshospitalet. Her blev det observeret, at resultaterne

Sammenhængen mellem hastigheden for absorption over TR146-cellemodellen og absorption over mundslimhinde fra svin. De undersøgte stoffer er alle vandopløselige, men har forskellig molekylvægt. I det de undersøgte stoffers molekylvægt ligger mellem ca. 200 dalton og 40.000 dalton.

Skitse af TR146-cellemodellen. Cellerne gror i flere lag på et permeabelt filter. De næres med en specielt sammensat opløsning af vigtige næringsmidter, der tilsættes både på oversiden og på undersiden.

sådanne absorptionsfremmende stoffer. Det viser sig, at effekten af en type potentielle absorptionsfremmende i høj grad afhænger af molekylvægten samt fedtopløseligheden af det lægemiddelstof, der anvendes. Da modellen ser ud til at kunne sammenlignes med menneskets mundslimhinde, må man formode, at effekten af det absorptionsfremmende stof vil vise samme tendens i mennesket.

Nyttig test af nye lægemidler

Potentialet for cellemodellen er lovende, både fordi strukturen af cellemodellen ligner den normale mundslimhinde, og delvis fordi kendte stoffers permeation over eller effekt på TR146-cellemodellen kan korreleres til resultater opnået med human væv fra mundslimhinden.

Ved anvendelse af modellen i de indledende faser af udviklingen af et nyt lægemiddel kan der hurtigt skelnes mellem de enkelte nye stoffers evne til at trænge igennem den formentlig vigtigste barriere for absorption til blodbanen fra mundhulen, nemlig mundslimhinden. Dermed kan antallet af forsøgsdyr, der bruges i sådanne indledende studier reduceres betydeligt, mens det dog stadig vil være nødvendigt at kontrollere virkningen af et næsten færdigudviklet nyt lægemiddel på levende dyr, inden det afprøves i klinikken på mennesker.

fra studier med TR146-cellemodellen kan korreleres til resultater fra studier med menneskets mundslimhinde på samme måde som med hensyn til resultaterne fra studierne med mundslimhinde fra svin.

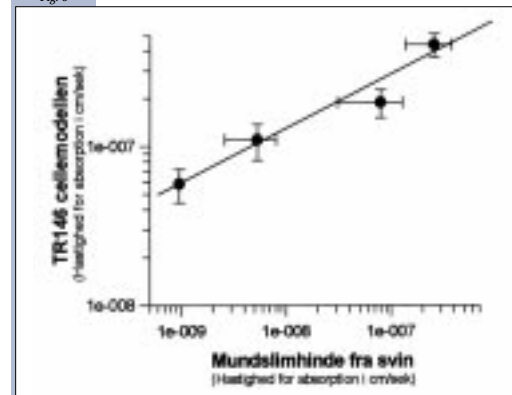
Anvendelse af TR146-cellemodellen

Til trods for, at mange lægemiddelstoffer ikke nedbrydes i så høj grad ved indgift gennem mundslimhinden som ved indgift via tarmsystemet, er det ikke givet, at koncentrationen af lægemiddelstof i blodbanen når op på et virkningsfuldt niveau.

Ofte er absorptionen over mundslimhinden for lav. Derfor forskes der idag i anvendelse af absorptionsfremmende stoffer. Det er ved hjælp af TR146-cellemodellen muligt at undersøge effekten af forskellige absorptionsfremmende stoffer. Samtidig kan man ved hjælp af bl.a. mikroskopi se, hvordan nogle stoffer påvirker cellerne, og på den måde opdage eventuelle skadelige virkninger.

TR146-cellemodellen er blevet anvendt til at studere effekten af

Fig. 3



Cand.pharm. Hanne Mørck Nielsen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmaci.



Lic.pharm. Margrethe Romer Rassing er lektor ved Institut for Farmaci.

Membranbiofysik og målrettede lægemidler

Grundlæggende fysisk-kemiske studier af byggestenene i cellemembraner og deres samspil med lægemiddelstoffer er af central farmaceutisk betydning. Det gælder især for udviklingen af målrettede transportsystemer, som bringer lægemiddelstoffet hen til virkningsstedet, hvor det skal reagere med receptorer i cellemembranerne eller transporteres gennem membranerne og ind i cellerne.

Af Kent Jørgensen, Ole G. Mouritsen, Sven Frøkjær og Charlotte Vermehren

Alle kroppens celler er omgivet af cellemembraner, som er opbygget af et dobbeltlag af lipider, dvs. fedtstoffer. Ud over lipidmolekylerne indeholder cellemembranerne forskellige proteiner, der medvirker ved udvekslingen af stoffer mellem cellen og omgivelserne.

Membran-biofysik beskæftiger sig med eksperimentelle og teoretiske undersøgelser af lipider, lipidmembraner og membranproteiners strukturelle og funktionelle opførsel. Lipidmembraner udgør det centrale element i alle cellemembraner. De kan fremstilles i laboratoriet og er vigtige modelsystemer, som kan bruges til at studere sammenhængen mellem lipidmembranens strukturelle opførsel og aktiviteten af mange af de processer, som finder sted i biologiske membraner.

En bedre forståelse af lipidmembraners funktionelle egenskaber åbner samtidig op for nye og interessante farmaceutiske og medicinale anvendelsesmuligheder. Det gælder f.eks. anvendelsen af liposomer som mikrotransportører af lægemiddelstoffer. Liposomer er små kugleformede lipidagregater, som kan stabiliseres, så de ikke så nemt nedbrydes i blodet. Samtidig eksisterer der muligheder for at designe liposomerne, så de først nedbrydes, når de kommer frem til virkningsstedet og der frigiver det aktive lægemiddelstof.

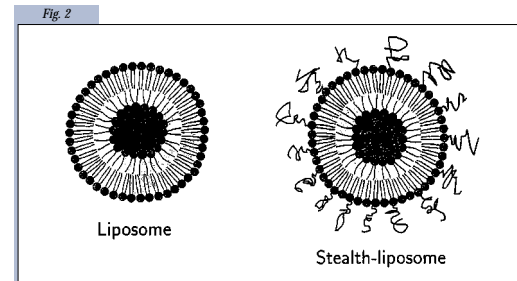
Et muligt, fremtidigt eksempel er behandling af inflammation, hvor der i det betændte væv findes en forøget koncentration af et membranbrydende enzym. Dette enzym kan nedbryde liposomer, som ellers er stabile i blodet. På den måde kan man opnå, at lægemiddelstoffet kun frigives på det ønskede sted, hvorved virkningen bliver størst og bivirkningerne minimale.

Lægemiddelstoffer og lipidmembraner

Den seneste membranforskning, der omfatter biofysiske, biofarmaceutiske og biokemiske undersøgelser, har afsløret, at den molekylære opførsel af membranlipiderne samt lipidmembranernes dynamiske mikrostruktur har afgørende indflydelse på de biomolekylære processer, som finder sted i tilknytning til cellemembranerne. Lipidmembranens strukturelle opførsel påvirker således aktiviteten af membranudne proteiner og enzymer og har ligeledes indflydelse på lægemiddelstoffers evne til at binde sig til receptorer på overfladen af cellemembranerne.

Andre lægemiddelstoffer skal transporteres ind i cellerne for at virke. Her udgør lipidmembraner en transportbarriere, som mange lægemiddelstoffer har svært ved at passere. Dertil kommer, at mange lægemiddelstoffer som f.eks. psykofarmaka, narkosemidler og hjertemedicin er i stand til at ændre lipidmembranernes molekylære opførsel og udøve en farmakologisk effekt via en indirekte påvirkning af membranproteinerne aktivitet. Undersøgelser af lipidmembraners strukturelle og funktionelle egenskaber er derfor betydningsfulde for at forstå, hvordan transporten af lægemiddelstoffer ud til virkningsstederne i kroppen finder sted.

Ud over at være velegnede modelsystemer for biologiske membraner har liposomer og lipidmembraner interessante farmaceutiske anvendelsesmuligheder som mikrokapsuleringsystemer og transportører af lægemiddelstoffer. Grundlæggende studier af lipidmembraners strukturelle og dynamiske opførsel har bidraget til en bedre forståelse af deres egenskaber, hvilket er af



afgørende betydning for udvikling af transportsystemer for lægemiddelstoffer baseret på liposomer.

Den opnåede viden gør det muligt at optimere liposomernes stabilitet i blodet, deres transportegenskaber og deres evne til kun at frigive det aktive lægemiddelstof på det ønskede virkningssted i kroppen. På den måde vil mange af de bivirkninger, der normalt optræder ved indgift af potente lægemidler, kunne reduceres.

Nyt princip for målrettet afgift

Vore undersøgelser har identificeret et nyt potentielt princip for målrettet afgift af lægemiddelstoffer til betændte områder i kroppen.

Nøglen er enzymet fosfolipase A2, som er et regulatorisk og membranaktivt enzym, der forekommer både inde i cellerne og imellem dem. I forbindelse med inflammatoriske sygdomme medvirker enzymet ved dannelsen af nogle af de signalstoffer, der optræder i det syge væv, og som indgår i den inflammatoriske proces. Kendskab til de grundlæggende forhold, der bestemmer aktiviteten af fosfolipase A2 er derfor vigtig, hvis man skal gribe ind i de mekanismer, som påvirker funktionen af enzymet og derved den inflammatoriske reaktion.

Parallele teoretiske og eksperimentelle undersøgelser af lipidmembranens mikrostruktur og aktiviteten af fosfolipase A2 har afsløret, at specielt dannelsen af domæner i lipidmembranen med en størrelse på nogle få hundrede lipidmolekyler, har afgørende indflydelse på enzymets aktivitet. Monte Carlo computersimuleringer af lipidmembranens opførsel har vist, at forekomsten af specielle grænseområder i lipidmembranen med en høj koncentration af delvist uordnede lipider er betydningsfuld for funktionen af fosfolipase A2 og oger enzymets aktivitet. Andre undersøgelser har samtidig vist en forøget aktivitet af enzymet

Liposomer rummer et stort potentiale som transportører af lægemiddelstoffer. Ved indbygning af polymerlipider i lipidmembranen dannes Stealth-liposomer, som vanskeligere nedbrydes i blodbanen, og som derfor har mulighed for at nå frem til virkningsstedet i kroppen, hvor lægemiddelstoffet kan frigives.

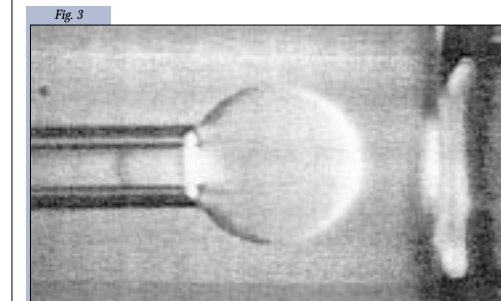
hold af membranbrydende enzymer - som det f.eks. er tilfældet med fosfolipase A2 i vævsområder med inflammation. Kendskabet til de enzymatiske nedbrydningsmekanismer udenfor blodbanen giver nemlig mulighed for at designe liposomer med den rette sammensætning af lipider og polymerlipider. På den måde kan man opnå, at liposomerne er stabile i blodet, men bliver nedbrudt i de betændte områder, hvor der er en høj koncentration af membranaktive enzymer, som kan nedbryde liposomerne. Herved vil de indesluttede anti-inflammatoriske lægemiddelstoffer kunne frigives netop på de steder i kroppen, hvor de skal udøve deres virkning.

Liposomer som mikrosensorer

Udviklingen af specielle overfladeteknikker som Atomic Force mikroskopi har gjort det muligt at studere lipidmembraners mikrostruktur og opførsel netop på de små længdeskalaer, der har funktionel betydning. Men det er dog stadig vanskeligt at opnå information om bløde lipidmembraner i de relevante vandige omgivelser.

Et gennembrud i undersøgelserne er imidlertid opnået ved anvendelsen af en speciel mikropipette-teknik, der gør det muligt at bruge liposomer som ultrafølsomme mekaniske mikrosensorer. Ved at udnytte liposomernes bløde materialeegenskaber er det muligt at måle svage intermolekylære kræfter i et størrelsesområde, der spænder fra svage brintbindinger, bindingskræfter mellem membranoverflader og til bindinger mellem små organiske molekyler og biologiske makromolekyler.

En speciel farmaceutisk interesse knytter sig til indbygningen af specielle membranproteiner og receptorer i liposomerne. Herved vil teknikken kunne bruges til at måle de molekylære kræfter, der er tilstede, når lægemiddelstoffer binder sig til den enkelte receptor.



En ny mikropipette-teknik anvender liposomer som mikrosensorer. Hermed bliver det bl.a. muligt at måle de molekylære bindingskræfter, som spiller en rolle, når et lægemiddelstof bindes til en receptor i cellemembranerne.



Cand. pharm., ph.d. Kent Jørgensen er lektor ved Institut for Farmaci.



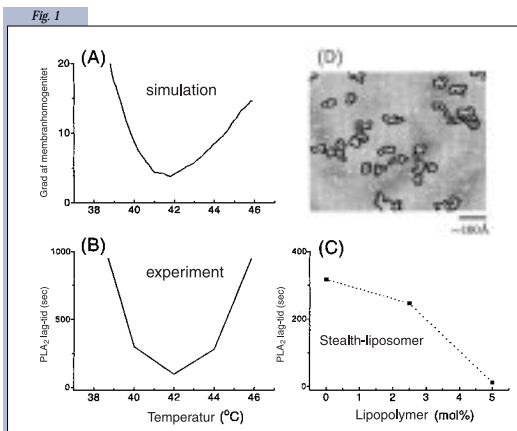
Dr. scient. Ole G. Mouritsen er professor ved Institut for Kemi, Danmarks Tekniske Universitet.



Cand. pharm., ph.d. Sven Frøkjær er professor ved Institut for Farmaci.



Cand. pharm., ph.d. Charlotte Vermehren er adjunkt ved Institut for Farmaci.



Eksperimentelle og teoretiske resultater, der viser en tæt sammenhæng mellem lipidmembranens mikrostruktur og aktiviteten af fosfolipase A2. (A) Monte Carlo computersimuleringer af graden af homogenitet i lipidmembranen. (B) Fosfolipase A2 lag-tidsmålinger. Lag-tiden er omvendt proportional med den enzymatiske nedbrydning af liposomerne. (C) Ved anvendelse af Stealth-liposomer øges aktiviteten af fosfolipase A2. (D) Monte Carlo computersimulering af lipidmembranens dynamiske mikrostruktur.

Virus vej ind i cellerne

Virus er årsag til sygdomme, men de kan også benyttes til behandling. En mulig anvendelse er genterapi, hvor virus transporterer gener ind i kroppen, som patienten mangler. Virus kan også bruges som indpakning af lægemidler, der så føres ind i cellernes indre. I alle tilfælde er det vigtigt at opklare, hvordan virus inficerer celler.

Af Klaus Bahl Andersen, Katharina E. P. Olsen, Stine Willemann og Gitte Schmidt

Nogle virus er nøgne, andre er omsluttet af en membran. I begge tilfælde skal virus have deres gener ført ind i kroppens celler, hvor de reproduceres i stort antal. De membranomsluttede virus opnår dette via en membranfusion, hvor virusmembranen smelter sammen med cellemembranen. Man kan sammenligne med to sæbebobler, der smelter sammen, så deres indhold blandes.

Fusionen sker ved hjælp af viruspartiklens overfladeproteiner. De fleste membranomsluttede virus har to typer proteiner, som er aktive i fusionen; et bindingsprotein og et fusionsprotein.

Opgaven for bindingsproteinet er at binde viruspartiklen til makro-

molekyler på cellens overflade. F.eks. binder HIV-proteinet gp120 sig til proteinet CD4 på T-hjælpercellerne, som indgår i immunforsvaret. Derpå aktiveres fusionsproteinet. Det sidder i viruspartiklens membran og skydes ind i cellens membran, så der dannes en kanal mellem de to membraner. Kanalen vil da blive udvidet, og fusionen er sket.

Virustransport af gener og lægemidler

Virus er årsag til mange sygdomme, men de kan også anvendes til at transportere lægemidler ind i cellerne. På den måde kan virus bruges til at løse et udbredt problem. Det er nemlig vanskeligt at få store eller ikke-fedtopløselige lægemidler ind i cellerne, hvorfor vor evne til at kontrollere mange vitale processer i cellernes indre er begrænset.

Virus kan betragtes som indpakkede gener, der leveres ind i cellen. Det kan udnyttes i forbindelse med genterapi, hvor man til dels erstatter viruspartiklens gener med humane gener, som patienten mangler. En anden mulighed er at bruge virus til indpakning af lægemidler, som så sendes ind i cellens indre. Preparationer af membranmateriale fra inficerede celler kan også give fusion. Det kan benyttes til praktiske anvendelser, f.eks. genterapi. Gener kan således pakkes ind i membraner og blive indført i cellen ved fusion.

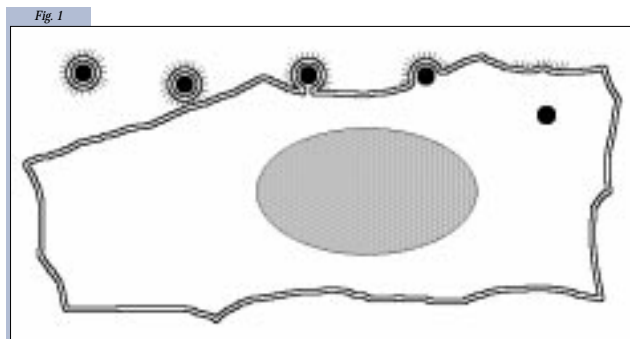
Både når det gælder virus evne til at forvolde sygdom og de bioteknologiske anvendelser, er det vigtigt med en detaljeret viden om, hvordan virus inficerer celler ved membranfusion.

Vi undersøger fusionen for en retrovirus fra mus, Moloney murin leukæmi virus (MoMLV). Retrovirus er specielt velegnede til genterapi, fordi deres gener sættes ind i cellens kromosomer. For MoMLV hedder bindingsproteinet gp70 og fusionsproteinet p15E. Vi har undersøgt fusionsmekanismen samt modningen af fusionsproteinet, der sker under virusdannelsen.

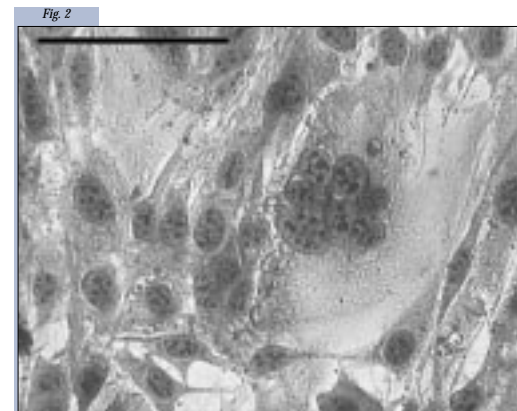
Inducerer fusion mellem celler

Fusionen mellem virus og celle starter til en kædereaktion, så det ender med, at flere celler smelter sammen. Fænomenet er kendt for HIV, mæslinger, og især for RS-virus, som inficerer luftvejene hos børn. Der var udbrud af RS-virus i Danmark sidste vinter.

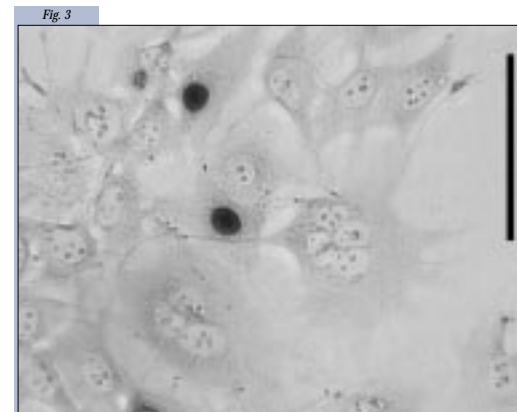
Traditionelt har man ment, at celle-cellefusion kun kan ske på to forskellige måder. Dels kan fusionen ske mellem uinficerede celler, når viruspartikler tilsættes, og dels kan fusionen ske mellem en inficeret og en uinficeret celle. For musevirus MoMLV kan de to typer fusion skelnes fra hinanden ved, at de kan stimuleres ved henholdsvis tilsætning af store positive ioner og med mole-



Membranomsluttede virus inficerer celler ved en membranfusion. Først bindes viruspartiklens membran til cellemembranen, dernæst smelter de to membraner sammen, hvorpå den nøgne viruspartikel frigives i cellevæsken.



Virus kan få celler til at smelte sammen. Billedet viser en sådan virusinduceret celle-cellefusion. Fusionerne ses ved, at cellekernerne samles tæt i samme cytoplasma. Her ses en fusion med syv kerner.



Vi har overraskende opdaget en ny type celle-cellefusion. Når inficerede og uinficerede celler blandes, sker der fusion mellem uinficerede celler, uden at fri virus er involveret. Fusionen er sandsynligvis induceret af umodne virus, da den kun sker i nærheden af en inficeret celle. Kernerne i de inficerede celler er mærket med stoffet bromdeoxyuridin, som til sidst er sortfarvet.

kyler, som lader kalium passere gennem membranen.

Vore studier har overraskende ført os til endnu en type celle-cellefusion: Når inficerede og uinficerede celler blandes, sker der også fusion alene mellem uinficerede celler, uden at fri virus er involveret. Denne fusion sker tæt på inficerede celler. Meget tyder på, at nylig dannede umodne virus, som kun findes tæt på den inficerede celle, er involveret.

Mekanismen bag fusionsprocessen

Når MoMLV-virus inficerer musceller, styres membranfusionen ved en kløv-

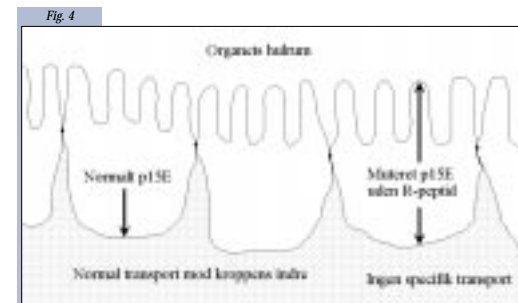
ning af fusionsproteinet, som er placeret på tværs i virusmembranen, så en del af proteinet stikker ud i omgivelserne, mens den modsatte ende rækker ind i viruspartiklen. Under dannelsen af viruspartiklerne kløves et peptid på 16 aminosyrer fra den inderste del af fusionsproteinet. Det kløvede, modne fusionsprotein betegnes p12E, og peptidet kaldes for R-peptid. Først p12E kan give fusion.

Vi er i gang med at studere R-peptidets egenskaber. I sig selv er det vandopsløseligt, men overraskende nok bindes det til den fedtholdige cellemembran. Samtidig kobles fedtsyrer til peptidet, hvilket tyder på, at det binder sig til membranens lipider.

Kløvningen af fusionsproteinet sker som nævnt under virusdannelsen, men der er stor forskel på, hvor meget af proteinet, der bringes med i de nye viruspartikler. Mængden er dog uden indflydelse på viruspartiklers fusionssevne.

MoMLV-virus inficerer bl.a. epithelceller. Det er slimhindeceller, som afgrænser organernes hulrum, f.eks. tarmkanalen, fra kroppens indre. Når MoMLV-virus har inficeret en celle, udnyttes cellens produktionsapparat til at danne et kompleks af fusionsproteinet p15E og bindingsproteinet gp70. Komplekset føres nu ud på cellemembranen, hvor de nye viruspartikler dannes.

På vejen ud til cellemembranen sørger R-peptidet normalt for, at proteinkomplekserne dirigeres hen til den side af cellerne, som vender ind mod vævene. Men hvis R-peptidet er forkortet som følge af en mutation, forsvinder denne specifikke transport. Herved bliver proteinkomplekserne også transporteret hen til den side af slimhindecellerne, som vender ud mod kroppens hulrum. På den måde kan nye viruspartikler blive sendt ud i organet, så infektionen spredes yderligere.



Transport af fusionsproteinet p15E i epithelceller. Normal virus og mutanter, hvor R-peptidhalen mangler, er anvendt. Som det ses har R-peptidhalens betydning for transportvejen.



Lic.scient. Klaus Bahl Andersen er lektor ved Institut for Farmakologi.



Cand.pharm. Katharina E. P. Olsen er ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi.



Cand.pharm. Stine Willemann, tidligere specialstuderende ved Institut for Farmakologi.



Cand.pharm. Gitte Schmidt, tidligere specialstuderende ved Institut for Farmakologi.

Regn med vand!

Lægemidler virker typisk ved at binde sig til enzymer eller til receptorer på cellerne. For at forstå og forudsige bindingsprocessen er det af afgørende betydning, at det omgivende vands indflydelse kan forstås og beregnes.

Af Tommy Liljefors, Per-Ola Norrby, Jonas Boström og Peter Aadal Nielsen

Vandmolekylet, som kun indeholder tre atomer, er et af de mindste molekyler vi kender - på trods af dette er vand i biologisk sammenhæng det vigtigste af alle molekyler. Samtidig er vand et af de sværeste molekyler at forstå og forudsige effekterne af.

Vand har unikke egenskaber, som sætter det i stand til at opløse og stabilisere ioner og andre højt polære molekyler. Ligeså vigtig er

vands manglende evne til at opløse ikke-polære molekyler som f.eks. kulbrinter. Denne egenskab er årsag til den vandafvisende såkaldt hydrofobe effekt, som er ansvarlig for, hvorledes komplekse biologiske strukturer organiseres, f.eks. de fedtholdige cellemembraner, som adskiller cellernes indre miljø fra omgivelserne.

Ved design af nye lægemiddeltoffer, som skal påvirke enzymer og receptorer i kroppen har lægemiddelmikeren traditionelt koncentreret sig om, hvordan stoffet binder sig til bindingsstedet i receptoren, dvs. hvordan det vekselvirker med de aminosyrer, som udgør bindingsstedet. Problemet med sådan en analyse er, at den langt fra giver hele sandheden om stoffets bindingsmuligheder. Det er ligeså vigtigt at analysere stoffets evne til at forlade det vandmiljø, det befinder sig i, inden det binder sig til receptoren og at undersøge, om stoffet antager en anden tredimensionel form i vand, end den gør i gasfase.

For at kunne transporteres i vand skal et godt lægemiddelt

være designet, så det er vandopløseligt, men en alt for stor vandopløselighed kan hæmme stoffets evne til at forlade vandmiljøet, og derved bliver det mindre aktivt. Ved design af nye lægemiddeltoffer er en analyse af vands effekt på stoffets struktur og energi således af afgørende betydning.

Lægemiddeltoffer, vand og computerkemi

Computerkemi, som i dag er et vigtigt værktøj i moderne lægemiddelforskning, var i sin barndom hovedsageligt begrænset til gasfasestudier. Effekterne af de vandige omgivelser indflydelse på forskellige molekylegenskaber, f.eks. ladningsfordelingen og den foretrukne tredimensionelle struktur, var helt eller delvist umulige at forudsige.

Et af de senere års vigtigste fremskridt indenfor computerkemi er de forbedrede muligheder til at beregne opløsningsmidlets effekt på et lægemiddeltofs egenskaber. Mange forskergrupper, inklusive vores egen, arbejder intensivt med

ydligere forbedringer af disse muligheder.

Forskningen går hovedsageligt i to forskellige retninger. Den første indebærer, at man direkte inkluderer et stort antal vandmolekyler i beregningerne. Sådanne beregningsmodeller kaldes *explicitte vandmodeller*. Eftersom effekter, der virker over store afstande, er meget vigtige, er det nødvendigt at inkludere hundrevis til tusindvis af vandmolekyler. Desuden må et meget stort antal relative positioner af de forskellige vandmolekyler afprøves. Denne type beregninger, kaldet molekyledynamik eller Monte Carlo simuleringer, er meget tidskrævende og oftest upraktiske i forbindelse med design af nye lægemiddeltoffer, da beregninger på en lang række stoffer skal kunne gennemføres på relativt kort tid.

Den anden retning indebærer, at de *explicitte vandmolekyler* erstattes af et kontinuert medium. Lægemiddeltstoffet placeres her i et passende hulrum i dette kontinuerte medium og vekselvirkningen mellem molekylet og mediet beregnes. Disse beregningsmodeller kaldes *kontinuummodeller*. En del af disse modeller anvender en generalisering af teorien for ioners vandopløselighed, som allerede blev introduceret i 1920'erne af Born. Fordelen ved kontinuum-modeller er, at beregningerne foregår meget hurtigt. Dette bevirker, at hele systemet kan beskrives kvantemekanisk, hvilket er vigtigt ved beregninger på polære molekyler, hvis elektronstruktur ændres i vandigt miljø.

Ionpar og saltbroer - findes de?

Et par eksempler fra vores eget forskningsarbejde viser, hvor vigtigt det er at forstå vandets indvirkning på biologiske processer.

Alle kemistuderende ved, at en amin blandet med en carboxylsyre danner et ionpar - et ammoniumcarboxylat-salt. Sådanne ionpar spiller en vigtig rolle i mange biologiske systemer, eksempelvis danner ionparrene de såkaldte "saltbroer" i proteiner, og de er f.eks. meget afgørende for, hvordan nervesystemets signalstoffer bindes til receptorproteiner.

Vi har udført avancerede kvantemekaniske beregninger af egenskaberne hos et ammoniumcarboxylat-ionpar og fundet, at denne type af ionpar ikke kan eksistere isoleret. Vores beregninger viser, at det er nødvendigt, at der findes mere end ét vandmolekyle eller en lignende brintbindingsdonor, som stabiliserer ionparret for, at det kan eksistere.

Eksistensen af de biologisk vigtige ionpar er således helt beroende på omgivelsernes natur. En undersøgelse af eksperimentelt kendte røntgenstrukturer af såvel små molekyler som komplekser af store proteiner og små molekyler støtter vores slutning om, at ionpar ikke eksisterer uden stabilisering fra omgivelserne. Denne viden er vigtig for forståelsen af, hvordan signalstoffer binder sig til receptorer og for udviklingen af computermodeller for denne neurotransmitter-receptorbinding.

Vandets indvirkning på form og energi

Computerberegninger viser, at hvis ikke vands påvirkning inkluderes, antager mange molekyler en tredimensionel struktur, som giver dem en energi, der gør det umuligt for dem at binde til en receptor eller et enzym.

Et eksempel på dette er biotin (vitamin B7), som binder til proteinet streptavidin med en exceptionel høj bindingssevne. Hvis det omgivende vand ikke medtages i beregningerne,

er det nødvendigt at tilføre meget energi for at ændre biotins struktur til stoffets tredimensionelle form i receptoren. Dette gør det umuligt at forstå biotins høje bindingssevne. Imidlertid påvirker det omgivende vand biotinmolekylets facon på en sådan måde, at dets foretrukne form og energi ligger nær den bundne struktur. Med andre ord: Når der er vand tilstede, behøves der ingen unødigt energi for at få molekylet på den rette form, så det kan binde til proteinet.

Hvis det ikke var muligt at udføre beregningerne i vandfasen og få viden om molekylets foretrukne struktur i vand, ville biotins høje evne til at binde sig til streptavidin være uforståeligt.

Stærkt polære molekyler - et vigtigt problem

De beregningsmetoder for vands indvirkning på molekylære egenskaber, som nu er tilgængelige, fungerer godt og er veltestede, når det gælder upolære og moderat polære molekyler; derimod er metoderne mindre veludviklede for stærkt polære molekyler som aminosyrer. Vort forskningsarbejde retter sig nu mod at forsøge på at udvikle beregningsmetoder for stærkt polære molekyler i vand.

En interessant mulighed i denne sammenhæng er at forsøge at udvikle metoder, som kombinerer *explicitte* vandmodeller og *kontinuummodeller*. Et stort problem i denne sammenhæng er dog, at der findes meget få eksperimentelle data at teste nye metoder efter. Derfor samarbejder vi med professor Jerzy Jaroszewski, DFH, om at producere sådanne data ved hjælp af NMR spektroskopier.



Fil.dr., docent Tommy Liljefors er forskningsprofessor ved Institut for Medicinalkemi.



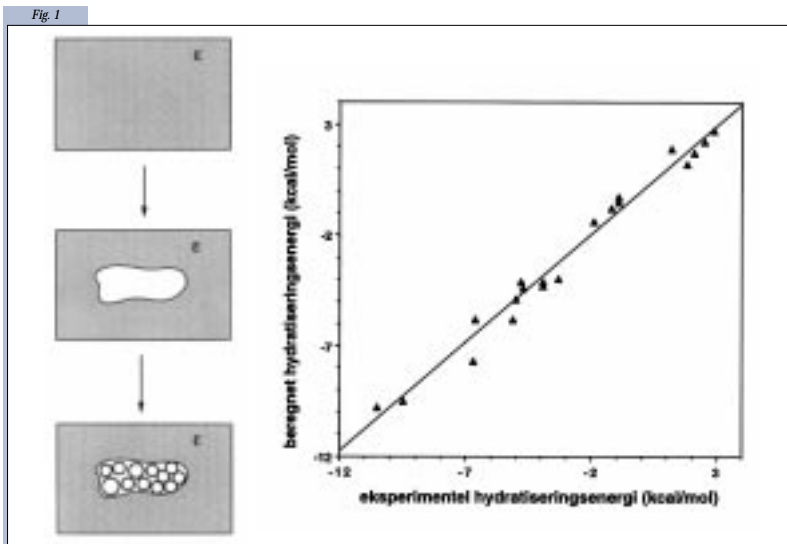
Tekn.dr., docent Per-Ola Norrby er forskningslektor ved Institut for Medicinalkemi



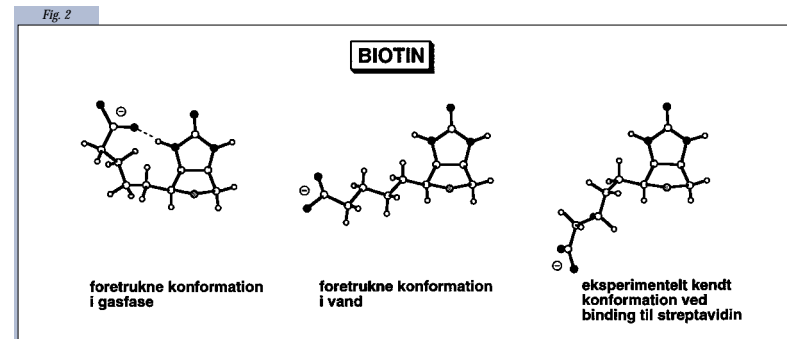
Fil.kand. Jonas Boström er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi



Cand.scient. Peter Aadal Nielsen er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi



Figuren illustrerer beregning af hydratiseringsenergi, dvs. de energier, hvorved molekyler opløses i vand. I kontinuum-modeller placeres molekylet i et hulrum i det kontinuerlige medium med dielektricitetskonstanten ϵ . Herefter beregnes energien for dannelsen af hulrummet samt vekselvirkningen mellem molekylet og det omgivende medium. Til højre vises et plot af eksperimentelle vs. beregnede hydratiseringsenergi for en serie af repræsentative molekyler. Beregningerne er lavet med den kvantemekaniske AM1/SM2 metode.



Polære molekylers tredimensionelle facon er oftest stærkt beroende på omgivelserne. Figuren viser biotins (vitamin B7) foretrukne konformation i gasfase og i vand, i følge vores beregninger, samt den eksperimentelt bestemte konformation af biotin, der er bundet til streptavidin.

Selektive metoder kan vise effekten af selentilskud

Kroppen kan ikke undvære selen, og mangel kan føre til sygdom. De traditionelle metoder til at måle mængden af selen i kroppen viser ikke, hvilke selenforbindelser der findes i organismen. En sådan viden vil være nyttig til at vurdere effekten af selentilskud til kostene. Derfor udvikler vi metoder til at bestemme mængden af forskellige selenholdige forbindelser.

Af Bente Gammelgaard, Ole Jøns og Ulrik Sidenius

Selen er et essentielt grundstof, og symptomer på selenmangel er konstateret i områder med selenfattig jord. Det mest kendte eksempel er Keshans sygdom, en dødeligt forløbende sygdom i hjertemuskulaturen, der er set hos især børn i selenfattige områder i Kina. Sygdommen kan helbredes fuldstændigt ved hjælp af selentilskud. Selen er desuden sat i forbindelse med mange forskellige symptomer og sygdomme, bl.a. kræft. En amerikansk undersøgelse fra 1996 har vist, at selen har

en vis generel beskyttende virkning mod kræft. En europæisk opfølgning af denne undersøgelse er nu under forberedelse.

Selen udøver sin virkning gennem selenholdige proteiner. Indtil nu er to selenproteiner identificeret i humant blodplasma. Det mest kendte er enzymet glutathion peroxidase, som katalyserer nedbrydningen af stoffer, som kan ødelægge membraner i levende celler via oxidation. Selen spiller herved en vigtig rolle i organismens antioxidative processer.

Den biologiske funktion af det andet protein, Selenoprotein P, er endnu ikke klarlagt. Det har været foreslået, at proteinet er et transportprotein, men der foreligger dog en del indici for, at også dette protein virker ved at beskytte mod oxidativ beskadigelse af cellemembraner. Selenoprotein P er det protein, der dannes først ved indgivelse af selen, når kroppen er i selenmangel.

Alle selens funktioner er således endnu ikke klarlagt. Disse funktioner vil kun kunne belyses med veldokumenterede analytisk-kemiske metoder. Der er således behov for udvikling af metoder, som kan anvendes i studier af f.eks. selens virkning ved indgivelse som kosttilskud til mennesker.

Behov for mere specifikke målinger

Menneskets selenstatus vurderes normalt ved totalbestemmelse af selen i blodplasma eller urin. Sådanne totalmålinger giver imidlertid ingen oplysninger om, hvilke specifikke selenforbindelser, der er tilstede i organismen. Der er derfor stor interesse for analysemetoder, der kan separere og detektere de enkelte forbindelser.

Sådanne analyser kan frembringe ny detailviden om de enkelte selenforbindelsers funktion. Dette vil være af betydning for hvilke parametre, man bør måle på i befolkningsstudier. Desuden kan en sådan viden medvirke til at belyse, hvor store mængder selen, mennesket har behov for. Vores hovedprojekt er derfor at identificere og kvantitere forskellige selenforbindelser i blodplasma og urin.

Selenforbindelser i blodplasma og urin

Totalindholdet af selen i blodplasma udgør kun ca. 80 µg pr. liter. Ca. to trediedele af selenindholdet i blodplasma er specifikt bundet i selenoproteinerne. Resten er der ikke redet for; formentlig findes den

resterende selen uspecifikt bundet i andre plasmaproteiner, sandsynligvis især i albumin. Det vides ikke, hvilke mindre selenholdige molekyler, der optræder i plasma.

I et ph.d.-projekt arbejdes på at separere og oprense Selenoprotein P fra humant plasma ved hjælp af FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). De forskellige proteiner i blodplasma separeres i kolonner, som indeholder forskellige metalholdige kolonnematerialer, hvortil proteinerne bindes i forskellig grad, mens resten af plasmaet skylles ud.

Ved efterfølgende at skylle kolonnen med en saltopløsning med lav pH, frigøres proteinerne, som opsamles i fraktioner.

For at lokalisere de selenholdige proteiner i de enkelte fraktioner måles lysabsorptionen ved 280 nanometer, hvor alle proteiner absorberer. Desuden måles selenkoncentrationen i fraktionerne. Selenoproteinerne kan således lokaliseres i de fraktioner, som både absorberer lys og indeholder selen. Kolonnematerialer, som indeholder nikkel, zink og cobalt har været afprøvet. Det cobaltholdige kolonnemateriale er mest velegnet, eftersom det giver en god separation af de to selenoproteiner samtidig med, at der opnås den mest oprensede Selenoprotein P fraktion.

I urin er totalindholdet af selen ca. 30 µg pr. liter. I urin er påvist selenit og trimethylselenonium-

ionen. Det diskuteres om trimethylselenonium er et primært stofskifteprodukt i urin eller kun optræder under særlige omstændigheder som en del af en afgiftningsmekanisme for selen. Der findes desuden en del selenholdige forbindelser i urin, som endnu er uidentificerede. Vi arbejder nu med at separere de forskellige selenforbindelser i urin. Hertil anvendes forskellige kromatografiske systemer koblet til et massespektrometer som en selenspecifik detektor.

Massespektrometri på uorganiske stoffer

For at analysere af de forskellige selenforbindelser i plasma og urin skal man kunne detektere koncentrationer, der er omkring en faktor 10 lavere end totalkoncentrationen, som i forvejen er meget lav. Dette kræver en meget høj følsomhed af detektoren. Desuden er det ønskeligt, at detektoren kan kobles på separationssystemet on-line.

Anskaffelsen af et ICP massespektrometer (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) har derfor åbnet helt nye muligheder, eftersom dette instrument opfylder disse krav, hvilket ingen af de tidligere detektionsmetoder gør.

Apparatet består af en plasmaedel, som er koblet til et massespektrometer, hvorfra den indføres i argonplasmaet. I dette plasma, hvor temperaturen er 6-8.000°C, atomise-

res og ioniseres prøven. Ionstrålen føres herfra gennem ionlinsen, hvor den fokuseres og videre ind i massespektromeret. Her sorteres ionerne efter deres masse/ladningsforhold ved hjælp af et magnetfelt.

Fordelen ved teknikken er, at alt organisk materiale afbrændes i plasmaet, hvilket resulterer i forholdsvis enkle spektre. Dette er en stor fordel ved arbejde med biologisk materiale, hvor det ofte kan være vanskeligt at opnå den tilstrækkelige selektivitet i separationsmetoden, da biologisk materiale indeholder mange mulige interfererende stoffer.

Alle ioner detekteres ved deres respektive masser, hvorved isotoper af forskellige grundstoffer kan overlappes hinanden. Desuden dannes der i plasmaet en del polyatomiske ioner, som ligeledes kan interferere med målingerne. F.eks. dannes argonionen ⁴⁰Ar⁴⁰Ar⁺, som har samme atommasse som den mest forekommende selenisotop ⁷⁸Se. Det er derfor nødvendigt at måle på en af de mindre forekommende isotoper med deraf nedsat følsomhed.

I et igangværende arbejde undersøges årsagen til forskellige former for interferens ved selenmålinger i urin og plasma med henblik på at kaste lys over processerne i argonplasmaet og optimere følsomheden og nøjagtigheden af selenmålingerne.



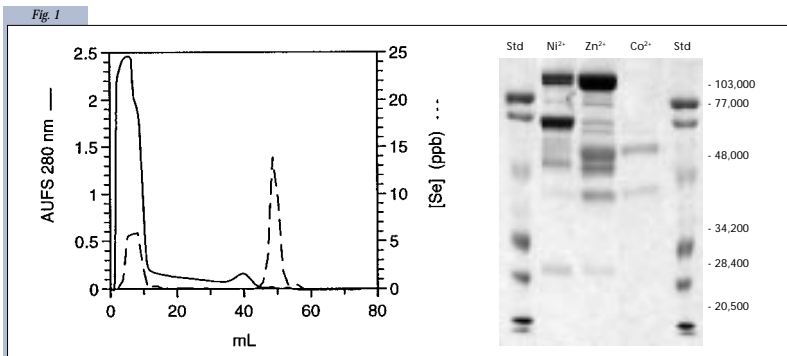
Lic.pharm. Bente Gammelgaard er lektor ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Lic.pharm. Ole Jøns er lektor ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Cand.scient. Ulrik Sidenius er ph.d.-studerende ved Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi.



Kromatografisk adskillelse af selenproteiner ved hjælp af en cobalt-immobiliseret kolonne. Den første proteinfraktion indeholder enzymet glutathion peroxidase. Den anden proteinfraktion indeholder Selenoprotein P. Ved gelelektroforese fremkommer Selenoprotein P som to bånd ved molekylmasse ca. 60.000 g/mol.



Laborant Suraya Jabin betjener ICP-massespektromeret. Massespektromeret kan kobles direkte til separationssystemer, som adskiller selenforbindelser i blodplasma eller urin.

Medicinmandens midler mod sneglefeber

Millioner af mennesker i tropener angrebet af sneglefeber, der også kendes som schistosomiasis og bilharziose. I et samarbejde med forskere i Zimbabwe arbejdes der på at udnytte et plantestof til at bekæmpe sneglene med. Samtidig undersøges det, om man fra planter, der anvendes i den traditionelle medicin, kan isolere stoffer, der kan helbrede allerede smittede personer.

Af Per Mølgaard og Else Lemmich

Isamfundsmæssig betydning overgår sneglefeber kun af malaria. Omkring 200 millioner mennesker i tropener er smittet med sygdommen. I begyndelsen har sneglefeber et udramatisk forløb, men hvis parasitinfektionen ikke behandles, kan den medføre alvorlige følgesygdomme i urinvejene og fordøjelsessystemet. Gennem en årrække har der været et udbytterigt samarbejde mellem Danmark og Zimbabwe om udnyttelse af et plantemiddel til

bekæmpelse af de snegle, der overfører smitten. Fra den afrikanske plante Endod, som er i familie med kermesbær, kan der høstes bær, der indeholder saponiner med snegle-dræbende effekt, og dette middel vil kunne produceres billigt af befolkningen selv. Endod projektet er nu nået til en fase, hvor lokalbefolkningen bliver involveret i dyrkning af planten og anvendelse af sneglegiften efter princippet hjælp til selvhjælp.

Men det er naturligvis ikke tilstrækkeligt kun at hindre smitte; de allerede smittede personer skal også behandles for at blive befriet for parasitten. Til dette findes et udmærket lægemiddel, praziquantel, som dog desværre på grund af prisen er utilgængeligt for størstedelen af de mennesker, der behøver det mest.

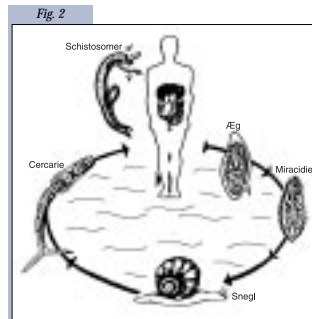
Som et sideprojekt til Endod-programmet har vore samarbejdspartnere fra Blair Research Laboratory (BRL) i Harare i Zimbabwe undersøgt, hvilke planter der bliver brugt i den traditionelle medicin til behandling af sneglefeber. Mange patienter vælger nemlig behandling hos medicinmanden eller -kvinden, også selv om de bliver tilbudt behandling på helseklinikken med praziquantel.

Traditionelle lægeplanter

Ved en rundspørge hos 286 traditionelle behandlere viste det sig, at de sammenlagt brugte op mod 50 forskellige plantearter til behandling af sneglefeber.

De mest anvendte planter havde røde frugter, eller deres rødder eller bark udskilte rød saft. Dette kan tolkes som et eksempel på "signaturlæren", en behandlingsfilosofi vi også har kendt i Europa. Man udvalgte plantedele med form efter det formodede syge organ: hjerteformede dele til behandling af hjertesygdomme, nyreformede til behandling af nyresygdomme osv. I forbindelse med sneglefeber er et af de tydeligste symptomer på sygdommen, at der er blod i urinen. Derfor har man typisk valgt planter med røde dele eller med rød saft.

Mange af planterne var gengangere hos de traditionelle behandlere. På BRL i Zimbabwe undersøgte man virkningen af vandige udtræk af de syv hyppigst anvendte planter på hamstere inficeret med de sygdomsfremkaldende parasitter, der kaldes schistosomer. Tre af disse plantearter havde næsten samme virkning som praziquantel på infektionen hos hamsterne.



Indsatsområder ved bekæmpelse af sneglefeber: 1) medicinsk behandling 2) sundhedsuddannelse 3) gode toiletforhold 4) rent drikkevand 5) sneglebekæmpelse.

som et bevis for metodens anvendelighed.

De vandige ekstrakter, der viste størst effekt i ormeassayet, blev også testet på unge parasitter, schistosomuler. Denne metode er mere tilrovnende, idet schistosomulere først skal "fremstilles". De inficerede snegle udskiller talrige små bevægelige organismer, cercarier, der kan gennemtrænge huden hos mennesker. Under passagen taber de halen og bliver til schistosomuler. Dette kan efterlignes i laboratoriet. Når inficerede snegle belyses, udskiller de cercarier, som kan sendes gennem en membran fremstillet af musemaveskind, hvorved de omdannes til schistosomuler.

Effekt på parasitterne

Vi fandt i alt 11 vandige ekstrakter, som var effektive over for schistosomuler. Tre af ekstrakterne havde særlig god effekt, heraf to som også var effektive i ormetesten.

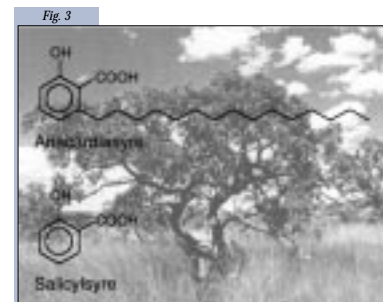
Det mest effektive ekstrakt mod schistosomer kom fra planten *Abrus precatorius*, men da denne plante er velkendt for sine giftige indholdsstoffer, var den mindre attraktiv som et muligt lægemiddel. Derfor fokuserede vi i stedet på ekstrakter fra et lille træ ved navn *Ozoroa insignis* fra familien Anacardiaceae: henholdsvis fra rodbark, stængelbark og blade: de to første begge med rød farve. Da ormetesten var mest velegnet til at spore de aktive stoffer i ekstrakterne, brugte vi den til det videre arbejde videre arbejde med ekstrakten fra rodbarken, der havde vist størst aktivitet i ormetesten, også

Som et led i samarbejdet mellem BRL og DFH, blev vi opfordret til at arbejde videre med planternes antischistosom virkning for at prøve at spore det eller de plantestoffer, der var ansvarlig for virkningen. På den baggrund indsamlede vi plantemateriale i Zimbabwe blandt de 47 arter, behandlere brugte. Oftest var det rod eller bark, der blev brugt, men blade og eventuelt frugter fra planterne blev også indsamlet.

Laboratorietest af ekstrakter

For at kunne isolere de aktive indholdsstoffer er det nødvendigt at have adgang til en metode - et bioassay - som kan vise indholdsstoffernes aktivitet uden brug af forsøgsdyr. På Institut for Populationsbiologi ved Københavns Universitet var det muligt at etablere to anvendelige metoder, og undersøgelsen af plantestoffer blev gennemført som et specialeprojekt ved DFH.

Den ene metode gik ud på at teste de vandige plantestoffer virkning på unge bændelorm. Disse var lettest at arbejde med, og derfor blev alle 37 planteprovninger testet for effekt mod bændelorm. De fleste ekstrakter havde temmelig ringe effekt, men enkelte havde en kraftig virkning på ormene. Dette blev tolket



Det lille træ ved navn *Ozoroa insignis*. Rodbarken indeholder parasitter ihjel, der giver sneglefeber.

selvom effekten overfor schistosomuler ikke var så kraftig. Endvidere er andre planter fra Anacardiaceae familien kendt for indholdsstoffer med meget forskellig biologisk aktivitet, så der var gode muligheder for, at ekstrakter kunne indeholde interessante stoffer.

En anden potentiel kandidat for et lægemiddel mod sneglefeber er en ekstrakt af *Elephantorrhiza goetzii*, som også er indsamlet i større mængde og ligger som næste mulighed for nye specialestuderende.

Isolation af aktive stoffer

Med ormetesten som ledetråd under adskillelsen og oprensningen af ekstrakterne blev der isoleret tre stoffer med stor biologisk aktivitet både overfor bændelorm og schistosomuler.

To af disse hører til gruppen af anacardiazinsyre, som er beslægtet med salicylsyre. Det tredje stof havde et steroidlignende molekyle. Indhold af anacardiazinsyre er et specielt træk for plantefamilien Anacardiaceae og de er kendt for deres biologiske aktivitet. De har endda vist sig at være snegle-dræbende med samme styrke som de saponiner der findes i Endod-planter. Der er anacardiazinsyre i cashew-nøddernes skaller, og det har været undersøgt, om disse skaller kunne anvendes som et billigt snegle-lægemiddel. Men da der tillige forekommer stoffer, der kan fremkalde allergi, måtte det opgives.

Flere planter fra denne familie anvendes som ormebidere i den traditionelle medicin også i andre dele af Afrika. I vore undersøgelser manglede der endnu at blive foretaget toksikologiske studier, der kan godtgøre at rodbarketræet fra *Ozoroa* er ufarligt. Først da kan vi vende tilbage til informanterne fra Zimbabwe med anbefaling om at satse på brugen af *Ozoroa insignis* til behandling af patienter med schistosomiasis.

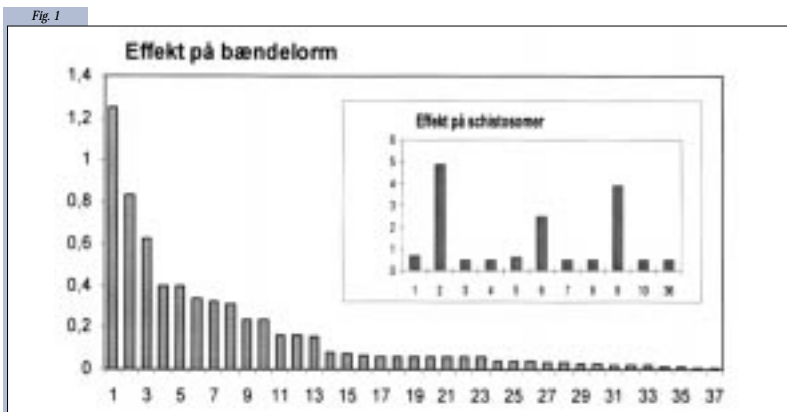
Disse resultater er fremkommet gennem to specialeopgaver udført af henholdsvis Susanne Berg Jensen og Dorte Rasmussen og af Hanne Lisbeth Frederiksen og Charlotte Sletbjerg. Under indsamlingerne i Zimbabwe havde vi hjælp af R. B. Drummond fra Herbariet i Harare og af Norman Makaza fra Blair Research Laboratory. De to bioassays er gennemført hos Jørn Andreassen på Institut for Populationsbiologi ved Københavns Universitet, og Dansk Bilharziose Laboratorium har leveret de inficerede snegle. Carl Erik Olsen fra Kemisk Institut ved Landbohøjskolen har hjulpet med massepektroskopiske undersøgelser af indholdsstofferne. De takkes alle for det gode samarbejde.



Lic.ago. Per Mølgaard er lektor ved Institut for Medicinalkemi.



Cand.pharm. Else Lemmich er lektor ved Institut for Medicinalkemi.



Figuren viser effekten af 37 vandige ekstrakter af planter fra Zimbabwe overfor unge bændelorm, cystocercarier. Skalaen er omvendt logaritmisk således, at nr. 1 har størst virkning, og ekstrakterne er herefter ordnet efter aftagende aktivitet. Nummer 1, 5 og 33 er fra tre organer fra den samme plante, et lille træ ved navn *Ozoroa insignis* fra familien Anacardiaceae: henholdsvis rodbark (1), stængelbark (5) og blade (33). I den lille indsatte figur er vist effekten af en del af ekstrakterne overfor schistosomuler. Bemærk at der ikke er sammenfald mellem ekstrakternes effekt overfor de to typer af parasitter.

Ingen magisk kugle mod smerter

Lægemidler uden bivirkninger skal fungere som et cruiseskib: nå sikkert og uden svinkeærinder frem til det ønskede mål, som derefter sættes ud af spillet uden unødige tab. Således har man tænkt i 50 år, men meget tyder nu på, at strategien er forfæjlet ved mange sygdomme. Et eksempel er smerter, hvor flere systemer er forstyrrede. Derfor skal en effektiv smertebehandling ramme flere forskellige mål på samme tid.

Af Bjarke Ebert og Bjarne Fjalland

Hvorfor virker lægemidler, og hvordan skal et effektivt lægemiddel uden bivirkninger se ud? Dette er et par af de spørgsmål, som forskere gennem de sidste halvtreds år har stillet sig selv, når de har forsøgt at udvikle nye lægemidler. Men er det overhovedet muligt at udvikle lægemidler uden bivirkninger, og hvad forstås vi ved et effektivt lægemiddel?

Den moderne forståelse af lægemidlers virkning går tilbage til begyndelsen af dette århundrede, hvor det for første gang blev erkendt, at lægemiddelstoffer udøver deres virkning gennem receptorer. Receptorer er proteiner, som sidder på cellerne, og gennem aktivering eller blokering af disse receptorer påvirker lægemidlerne cellerne på en sådan måde, at sygdommens ubalance kan modvirkes.

Det ideelle lægemiddel fungerer i teorien som den magiske kugle, der rammer den syge proces uden at påvirke andre systemer. Et eksempel på denne type lægemiddel er penicillin, der, når det virker, meget selektivt kan gå ind og dræbe bakterier uden på nogen anden måde at påvirke mennesket, der er blevet

Organbad med en opspændt musesædleder i midten. Musesædledere indeholder relativt store mængder af opioidreceptorer og er derfor ideelle til at karakterisere virkningen af morfinlignende stoffer.

inficeret med bakterier. Desværre er antibiotika et af de få lykkelige eksempler på det magiske lægemiddel; langt hovedparten af de lægemidler, som vi benytter idag, har bivirkninger.

Grunden er, at næsten alle lægemidler udøver at påvirke den syge celle også rammer alle andre celler, der indeholder den pågældende receptor. Det betyder, at bivirkningerne kommer, fordi lægemidlet enten rammer andre celler med den samme receptor, eller fordi lægemidlet rammer andre receptorer end dem, man ønsker at påvirke. For at undgå disse bivirkninger er det i teorien blot et spørgsmål om at udvikle lægemidler, der går rent ind og rammer den ønskede receptor uden at påvirke andre systemer.

Desværre er virkeligheden i langt de fleste tilfælde langt mere kompliceret end den netop beskrevne teori. Grundene hertil er mange, men den grundlæggende ide om, at enhver sygdomstilstand kan henføres til ubalance af et enkelt system er nok for simpel. Især når det drejer sig om sygdomme, der påvirker hjernen, har det vist sig, at meget forenklede behandlingsstrategier ofte har fejlet, når de er blevet afprøvet i patienter. Der er derfor et stort behov for en dybere forståelse af hvorledes forskellige systemer vekselvirker i såvel den raske som den syge hjerne.

Et af de områder, hvor der de seneste år har været omfattende forskning, er smertebehandling. Smertelindring har fået en stadig større placering ved behandling af

sygdomme, og dette har medført et udtalt ønske om mere effektive smertestillende lægemidler.

Gammel vin på nye flasker

Til smertelindring hos patienter med stærke smerter for eksempel i forbindelse med kræft benytter man gerne morfin eller morfinlignende stoffer. Morfin virker via opioidreceptorerne, således at smerteimpulsen i hjernen ikke bliver opfattet som særlig stærk. For en del patienter får morfin desværre nedsat effekt i løbet af behandlingen, hvorfor det bliver nødvendigt at anvende andre typer af stærke smertestillende lægemidler.

Forskningen indenfor smertekanismer har vist, at adskillige systemer løber af sporet i forbindelse med stærke vedvarende smerter. Man har derfor forsøgt at udvikle stoffer, som kan påvirke flere forskellige systemer på samme tid. Dette lyder umiddelbart indlysende og relativt simpelt, men vor forståelse af, hvor meget de enkelte systemer skal påvirkes og i hvilken retning, er meget mangelfuld. Endvidere ved man ikke, hvorledes man skal indbygge alle disse ønskede virkninger i et molekyle på en og samme tid. Der er derfor lange udsigter til det magiske lægemiddel, som ved et slag vil fjerne alle smerter uden bivirkninger.

På Institut for Farmakologi har vi gennem de seneste år derfor i stedet undersøgt kendte smertestillende lægemidler med henblik på at finde nye og måske ukendte sider af deres virkning for på denne måde hurtigt at kunne udvælge lægemidler, der kan være interessante at benytte ved smerter med nedsat morfinfølsomhed.

Rottehjerner og musesædledere

For at undersøge, om et lægemiddel vil virke i forbindelse med en bestemt type smerte, er der kun en mulighed: prøve det i mennesker med symptomerne!

Dette er dog ikke let, da et menneskes oplevelse af smerte ikke blot er resultatet af for eksempel en brækket arm, men derimod et sam-

Kroppens egen morfin, enkefalin, hæmmer sædleders evne til at trække sig sammen. De lodrette streger viser hvorledes sædlederen trækker sig sammen, når den bliver stimuleret med et svagt stød. Ved stigende koncentrationer af enkefalin, vist ved tykkelsen af søjlen øverst, bliver sædledersens sammentrækning stadig svagere, indtil yderligere mængder af enkefalin ikke giver yderligere effekt.

spil mellem skaden og personens psyke.

For derfor at kunne undersøge flere forskellige stoffer under standardiserede betingelser benytter man dyreforsøg. Når man anvender dyr til forsøg, foretager man en mængde etiske og praktisk overvejelser, inden man opstiller en model for smerten.

Vi har valgt at benytte rottehjerner og musesædledere til at belyse, hvorledes de forskellige stærke smertestillende lægemidler virker. Ved at benytte organer, som er udtaget fra dyret og derefter behandlet på en sådan måde, at de kan holdes i live, undgår vi dels at foretage smertevoldende forsøg, dels at have problemer med, at stofferne optages og nedbrydes forskelligt.

Rottehjernemodellen er specielt god til at undersøge stoffers blokerende virkning på den type af glutaminsyre receptorer, som er ansvarlig for smertetransmissionen, mens sædlederen indeholder opioidreceptorer, som især afspejler den kendte morfinfølsomme virkning. Ved at kombinere de to modeller, opnår vi derfor viden om stoffernes evne til at hæmme glutaminsyre-smertetransmissionen og aktivere det smer-

tedæmpende opioidreceptor-system.

Vi har nu karakteriseret stort set alle stærke smertestillende præparater på det danske marked, og det har vist sig, at enkelte stoffer har en virkningsprofil, som er helt forskellig fra de andre stoffer. Selv om disse resultater antyder, at enkelte af de smertestillende præparater kan have en helt særlig effekt på morfinfølsomme smerter, er det for tidligt at råbe hurra. Kliniske undersøgelser mangler endnu at afklare om der er en sammenhæng mellem disse modeller for smerter, og den type smerter, som mennesker faktisk oplever.

I samarbejde med overlæge Finn Molke Borgbjerg, Smerteklinikken, Bispebjerg Sygehus og cand.pharm. Charlotte Egebo har vi undersøgt en serie lægemidler, som især benyttes til behandling af depression. Kliniske erfaringer samt vore forsøg peger i retning af, at jo flere smertehæmmende systemer disse lægemidler påvirker, jo mere effektive er stofferne til lindring af morfinfølsomme smerter. Disse konklusioner er nu ifærd med at blive efterprøvet i mere avancerede modeller end her beskrevet.



Fig. 1

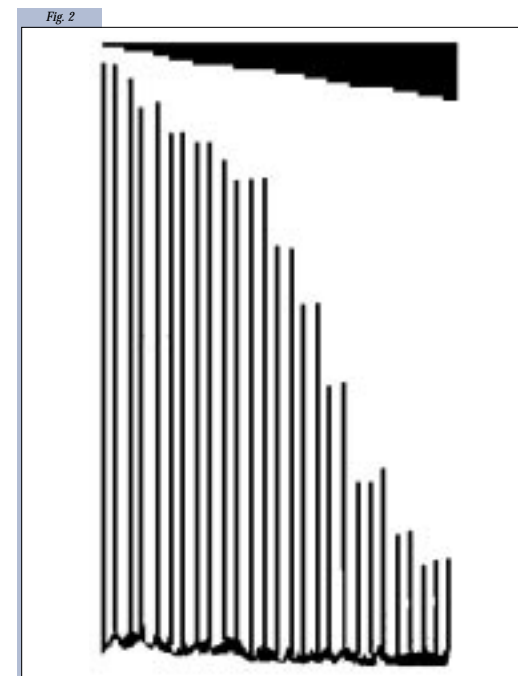


Fig. 2



Lic.pharm. Bjarke Ebert er lektor ved Institut for Farmakologi.



Lic.pharm. Bjarne Fjalland er lektor ved Institut for Farmakologi.

Cellekommunikation og kræft

Ubalance i cellers kommunikation og styringsmekanismer kan være alvorligt for organismen og f.eks. bevirke udbredelse af kræft. Karakterisering af de involverede proteiner kan føre til, at man bliver i stand til at gribe ind i processerne.

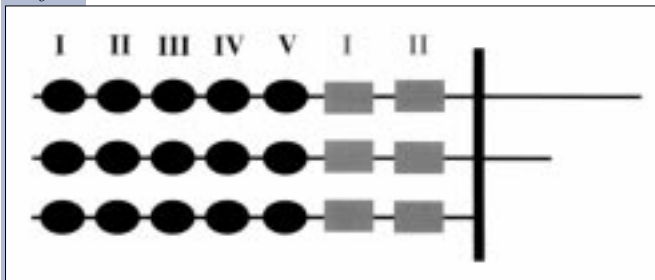
Af Christina Kasper, Hanne Rasmussen og Ingrid Kjølter Larsen

Når celler kommunikerer indbyrdes, binder de sig til hinanden ved hjælp af særlige proteiner. Ubalance i bindingsmekanismen kan føre til sygdomme, f.eks. kræft.

For at kunne gribe ind i cellernes biologiske bindingsmekanismer ved hjælp af lægemidler, er det nødvendigt, at vi forstår processerne bedre. Til denne forståelse hører et detaljeret kendskab til den rumlige opbygning af de involverede proteiner samt til deres indbyrdes samspil.

I samarbejde med professor Elisabeth Bock fra Proteinlaboratoriet ved Københavns Universitet arbejder vi på at bestemme den tredimensionelle struktur af proteinet NCAM (neural cell adhesion molecule) ved hjælp af røntgenkristallografi. NCAM's overordnede funktion er netop at genkende og sammenknytte celler. Protein er involveret i signalering mellem cellerne og i regulering af vævenes morfologi. Samtidig spiller det en nøglerolle i udviklingen af nervesystemet.

Fig. 1



Modeltegning af NCAM-varianten. To varianter krydser cellemembranen, og en er koblet til membranen via lipidanker.

Cellernes kommunikation

Udviklingen af en organisme er underlagt mange niveauer af kontrol. Forskellige styresystemer sikrer, at organismen udvikles korrekt, så udvikling og opretholdelse af vævstyper og celletyper fungerer.

Et eksempel på et sådant styresystem er gruppen af celleadhæsionsmolekyler, CAM'er. Disse proteiner, som befinder sig på overfladen af celler, har en afgørende rolle under udvikling og opretholdelsen af organismens korrekte vævs morfologi. Styringen foregår ved, at cellerne via de enkelte CAM'er har kontakt og interaktion med hinanden og med omgivelserne. CAM'erne indgår på denne måde i signalprocesserne mellem cellerne.

I mange situationer er det gunstigt for celler at binde sig til hinanden og sende signaler, mens det i andre situationer ikke er ønskeligt. Ved nogle sygdomstilstande, f.eks. kræft, er mekanismen for celleadhæsion ude af balance.

NCAM er opbygget som en perlekæde

NCAM er et af de bedst karakteriserede CAM'er. Protein findes hovedsagelig i nervecellerne og deres støttceller, men forekommer også i bl.a. muskeltvæv og hjertevæv.

I hjernen findes NCAM i tre forskellige varianter. To af varianterne krydser cellemembranen. Der er forskel i størrelsen af den del af proteinet, som rækker ind i cellen. Den tredje udgave af proteinet er koblet

til membranen via et såkaldt lipidanker.

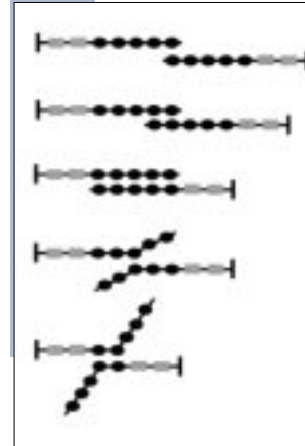
Den del af proteinerne, som stikker ud af cellerne, er stort set ens i alle varianter og består af fem domæner, hvis opbygning er beslægtet med immunoglobulin (Ig) domæner, samt to domæner nærmest cellemembranen, som i opbygning ligner fibronektin type III (F3) domæner. Domænerne sidder i en lang række som perler på en snor, men "perlekæden" kan være mere eller mindre sammenfoldet i organismen.

Yderligere variation i den overordnede struktur af NCAM kan ske i organismen ved en proces, der indfører ekstra aminosyrer flere steder i kæden, en proces, der kaldes alternativ splicing. Selvom det normalt kun drejer sig om få aminosyrer, ses en klar modificering af proteinets funktion og egenskaber. Dette er et led i reguleringen af cellekontakternes styrke og sker under såvel udviklingsmæssig som vævsspecifik regulering.

NCAM kan påvirke udvikling af kræft

Ændringer i mængden af NCAM kan medføre morfologiske ændringer. Omvendt er morfologiske ændringer, f.eks. ved overskæring af nervebaner, ofte korreleret med en stigning i mængden af proteinet, indtil den normale tilstand er genoprettet. I visse sammenhænge synes binding af NCAM til andre biomolekyler, som bl.a. receptoren for vækstfaktoren FGF (fibroblast growth factor), at

Fig. 2



Foreslåede modeller for NCAM-NCAM-binding.

mellem to NCAM-molekyler kendes endnu ikke. Det vides således ikke, hvilke af de ekstracellulære domæner, der binder til hinanden, men mange muligheder har været foreslået.

Forskellige eksperimentelle forsøg, fortrinsvis udført på Proteinlaboratoriet, samt af Flemming Poulsen på Carlsberglaboratoriet, har fornylig vist, at det sandsynligvis er de to yderste domæner IgI og IgII, der binder sig til hinanden.

Derfor har vi ved hjælp af genteknologi fremstillet et rekombinant protein,

kunne starte en signaleringskaskade inde i cellerne. Dette kan bl.a. føre til, at nerveceller stimuleres til at udsende udvækster, såkaldte neuriter.

Det kan være alvorligt for organismen, hvis genkendelsen og bindingen mellem cellerne hæmmes eller bringes ud af kraft. Ved ondartet kræft sker der en løsrivelse af kræftceller fra den oprindelige svulst, hvorpå kræftcellerne spredes sig i organismen, så der dannes metastaser. Kræftcellers evne til at sprede sig og danne metastaser er således delvist bestemt af deres bindingsevne og mobilitet.

På Proteinlaboratoriet har man arbejdet med en ondartet nervecellekræftform, hvor kræftcellerne normalt ikke har NCAM på celleoverfladen. Ad genteknologisk vej er det lykkedes at skabe en variant af denne kræftform, med NCAM på overfladen af cellerne. Nu viser det sig, at de modificerede celler ligner en mere godartet kræftform, hvor svulsten vokser langsommere, og hvor der opstår langt færre metastaser. Dette kan skyldes, at celler med NCAM på overfladen bindes bedre til hinanden, samt at proteinet medvirker til en langsommere vækst af svulsten.

Struktur og funktioner

NCAM-proteinets mange funktioner bygger på binding mellem to NCAM-molekyler på overfladen af samme eller to forskellige celler, eller på binding mellem NCAM og et helt andet biomolekyle. I mange år har man vidst, at NCAM binder til sig selv, men mekanismen for interaktionen

bestemme alle atomernes rumlige placering i forhold til hinanden. Når alle atomernes positioner er fastlagt, har man et billede af den rumlige opbygning af proteinet. Desuden vil man kunne se, hvordan de enkelte proteinmolekyler er placeret i forhold til hinanden, og en interaktion mellem domænerne vil kunne påvises.

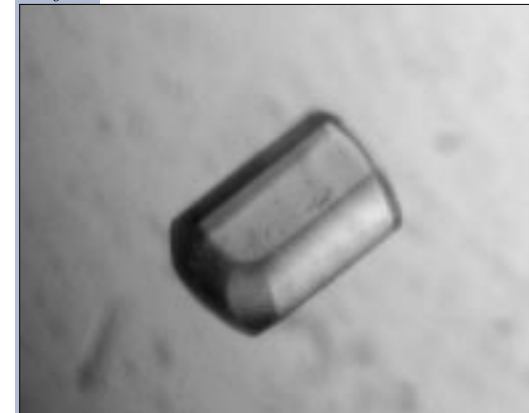
Krystallisation af proteiner er som regel en vanskelig og langvarig proces. Ofte vil man have testet mere end tusind forskellige forsøgsbetingelser, før den egnede krystal er fundet. Det er lykkedes os at krystallisere NCAM-IgII. Krystallerne spredte røntgenstråling godt, hvilket betyder, at der kan forventes en struktur af høj detaljeringsgrad.

Vi har søgt at bestemme proteinstrukturen ved modelbygning ved hjælp af allerede kendte strukturer af beslægtede proteiner. Denne metode har imidlertid ikke givet et entydigt resultat ved anvendelse på NCAM-IgII, hvilket muligvis kan skyldes stor fleksibilitet i broregionen mellem de to domæner.

Derfor er strukturen nu ved at blive løst ved hjælp af en metode, hvor krystallerne bliver behandlet med opløsninger af tunge atomer, som diffunderer ind i krystallen. Ved hjælp af røntgendata opsamlet fra disse behandlede krystaller vil man kunne lokalisere de tunge atomer i proteinet. På basis heraf kan positionen af alle andre atomer fastlægges, det vil sige strukturen bestemmes.

Vi har netop nu opnået spændende resultater i strukturbestemmelsen, som vil give os helt ny information om cellulær genkendelse og binding mellem nerveceller.

Fig. 3



Krystal af NCAM-IgII, dvs. de to første Ig-domæner af NCAM.



Cand.scient. Christina Kasper er ph.d.-studerende ved Institut for Medicinalkemi.



Erhvervsforsker Hanne Rasmussen er kemiker på Novo Nordisk A/S.



Lic.pharm Ingrid Kjølter Larsen er lektor ved Institut for Medicinalkemi.

Farmaceuter under liberalisering

Lægemiddellovgivningen i Island blev ændret i retning af liberalisering den 1. juli 1994, og den 15. marts 1996 var samtlige elementer i loven trådt i kraft. Ændringerne vedrører især oprettelse af apoteker, apoteksdrift og apotekservice samt reklamer for lægemidler. Vi har været med til at evaluere den nye lovs betydning for den farmaceutiske profession.

Af Anna Birna Almarsdóttir og Janine Marie Morgall

Islandske farmaceuter har oplevet en revolution i apotekervæsenet som følge af landets nye lægemiddellovgivning.

Indtil marts 1996 bestemte myndighederne, om et nyt apotek kunne etableres, hvor apoteket skulle være, hvem der skulle være apoteker, og

hvem der skulle overtage apoteket ved pensionering. Samtidig var det et krav, at apotekeren selv ejede apoteket. Desuden fastsatte myndighederne priserne på såvel receptpligtige lægemidler som håndkøbsmedicin.

Liberaliseringen består i grove træk i, at ejerskabet af apoteker er ændret radikalt. Oprettelse af apoteker kræver dog stadigvæk en licens udstedt af sundhedsministeren. Licensansøgeren skal være farmaceut, der er berettiget til professionen efter islandsk lov, hvilket indebærer, at pågældende skal have arbejdet mindst tre år på et apotek samt have en handelslicens eller en aftale med en licensindehaver.

Ministeren sender licensansøgninger til de relevante lokale myndigheder for udtalelse om f.eks. indbyggertal for apoteket og nærhed til andre apoteker. Hvis den lokale myndighed er imod licensudstedelse, kan ministeren give afslag. En farmaceut kan kun have én apotekslicens, men apoteksejeren behøver ikke at være farmaceut. Farmaceuten kan vælge at være lønmodtager hos et firma, som ejer apoteket. Der er også mulighed for, at det samme firma opretter en kæde af apoteker, dog med det forbehold, at apotekerne har hver sin farmaceutlicens.

For apoteksdrift er den vigtigste ændring, at apotekeren skal give brugere og sundhedsprofessioner information om anvendelse og opbevaring af lægemidler. De må endvidere yde farmaceutisk omsorg i samarbejde med andre sundhedsprofessioner med det formål at mindske

risikoen for sygdom og fremme sundhed generelt. Denne lovgivning må være den eneste i Europa og måske i hele verden, som indeholder en klausul om farmaceutisk omsorg.

Farmaceutisk omsorg defineres af Hepler og Strand som: "... den ansvarlige tilvejebringelse af lægemiddelterapi med det formål at opnå bestemte resultater, som forbedrer patientens livskvalitet". Kerne i filosofien er, at det drejer sig om deltagelse i ansvarsfor lægemiddelbehandlingsresultat.

Forfatterne har været med til at evaluere, hvad der skete, og hvordan ændringen i distributionssystemet påvirkede professionen. Vi har fundet, at lovændringen var et produkt af en meget stærk sundhedsminister og en splittet profession. Resultaterne viser også, at apotekerne er blevet mere forretningsorienterede. Nogle apoteksfarmaceuter er tilfredse med denne udvikling, mens andre synes, at fagligheden er ved at forsvinde.

Interviews med farmaceuter

Vi gennemførte to slags interviews med farmaceuter. Den første type var dybdegående interviews med farmaceuter, som havde været aktive, eller som er kendt for at have haft stærke meninger om loven. Ti interviews af mindst én times varighed blev foretaget af en af forfatterne i perioden fra maj 1997 til januar 1998. Formålet var ikke at samle egentlige fakta om ændringen, men at høre de fremtrædende personers mening om og fortolkning af, hvordan loven havde påvirket dem, og få deres forklaringer på, hvordan og hvorfor denne lov blev lavet.

Den anden type interviews var fokusgruppinterviews med apoteksfarmaceuter. Henholdsvis syv farmaceuter i Reykjavikområdet og otte farmaceuter fra landet blev udvalgt som repræsentative for farmaceuter "i marken". Disse var samlet i oktober 1997 for at diskutere emner som udviklingen med hensyn til deres egen arbejdsplads, deres faglige arbejde og relationerne med andre parter som f.eks. lægerne og myndighederne. De to fokusgrupper blev styret af en farmaceut, der arbejder i

lægemiddelindustrien og er kendt for at have en afbalanceret holdning til den nye lov.

En splittet profession

Resultaterne af de individuelle interviews viste, at anledningen til den nye lov var umiddelbart en meget stærk og målrettet sundhedsminister og en splittet farmaceutprofession. Gennem 20 år havde der været diskussioner om, at systemet burde ændres. Der blev både snakket om et apoteksbolag som i Sverige og på den anden yderkant et totalt liberaliseret system inspireret af USA og Storbritannien. Hovedargumentet for et liberaliseret system var at øge konkurrencen på lægemiddelmarkedet og derved spare i det offentlige udgifter til lægemidler.

De, der har set den engelske tv-serie "Yes Minister", vil ikke genkende ministerens rolle i Island. Sundhedsministeren siges at have været drivkraften i at få lovforslaget skrevet og vedtaget. Ministre i Island har mere magt end i de fleste andre vestlige demokratier, og sundhedsministerens argument om besparelse blev godt modtaget af politikere, der alle var bekendt med de høje avancer og stigende priser på lægemiddelområdet. Desuden var det almen viden i Island, at nogle af de største skatteydere var apotekerne.

De individuelle interviews viste også, at farmaceuterne ikke reagerede som én profession på det nye lovforslag. Den vigtigste opdeling var mellem apotekere og ansatte farmaceuter. Mange af de ansatte farmaceuter var utilfredse med at skulle vente med at blive apoteker. En farmaceut, som aspirerede til at blive apoteker, behøvede i de fleste tilfælde først at arbejde på apotek i nogle år, derefter at blive apoteker i et yderområde med et meget lille befolkningsunderlag, hårde vilkår og dårlig løn, for til sidst at kunne få et mere attraktivt apotek i Reykjavik eller en større by. Denne utilfredshed mandede ud i, at aktive medlemmer af Farmaceutforeningen så en række ulemper ved det gamle system og støttede liberaliseringen.

Fokusgruppinterviewerne viste, at apoteksfarmaceuter nu finder sig i et mere forretningsagtigt miljø end før ændringen. Nogle er tilfredse med dette, men andre er betænkelige ved udviklingen. Ved indførelse af den nye lov er rabatter på receptpligtige lægemidler og håndkøbsmedicin blevet meget udbredte, hvilket i følge nogle af farmaceuterne gør arbejdet på apotekerne mere belastende og mindre fagligt end før.

Analysen af fokusgrupperne har vist, at betingelserne for patientkontakt samt farmaceutisk omsorg er blevet sværere. Det ser ud til at være umuligt at liberalisere apoteksvæsenet og lovgive om farmaceutisk omsorg på det samme tidspunkt. Farmaceuterne har måttet tackle to store ændringer på én gang. Den ene, liberaliseringen, restrukturerede deres arbejdsplads på kort tid og den anden, farmaceutisk omsorg, kræver en helt ny tilgang til arbejdet med kunder. Farmaceuterne var ikke forberedt på nogen af disse ændringer.

Procedurene i apotekerne er meget mere udtrykkelige end for fra Lægemiddeltilsynets side. Farmaceuterne udtrykker stor tilfredshed med denne udvikling, som standardiserer arbejdet på apotekerne. Deltagerne er meget optaget af deres tekniske problemer i dagligdagen. Nogle udtrykker savn efter magistrel fremstilling af lægemidler.

Der er nogle forskelle i synspunkter mellem farmaceuter i Reykjavikområdet og det øvrige Island. Farmaceuter i landområderne er generelt mere optimistiske med hensyn til kundekontakten. Dette er ikke overraskende, da der er mindre konkurrence i lægemiddeldistributionen i yderområderne. Oplevelsen af konkurrencen er årsagen til, at der ses stærkere modsætninger i Reykjavikgruppen, og lange diskussioner forekommer om, hvorvidt liberalisering gavner professionen og kunden. I landområderne er farmaceuterne

mere enige og taler om, hvordan man eventuelt kan løse de problemer, der er opstået som følge af den nye lov.

Mål og resultater af projektet

Vi har nu sendt tre artikler om denne forskning til internationale tidsskrifter. Foreløbige resultater blev præsenteret til Nordisk Farmakologisk Kongress i København i juni, FIP (Federation Internationale Pharmaceutique) i september og Farmaciens Dag i oktober 1998. Øvrige deltagere i projektgruppen er farmaceuterne Almar Grimsson (leder), Ingunn Björnsdóttir og Ólafur Ólafsson.

Projektplanen for 1999 omfatter en tidsreanalyse af økonomiske og lægemiddelforbrugsdata, samt en undersøgelse af alle ansatte islandske farmaceuters oplevelser og erfaringer med den nye lov.

Projektet har som formål:

- at være et laboratorium, der informerer lovgivere og beslutningstagere om effekten af regulering og lovændringer i sundhedssystemet, herunder farmaceutisk praksis.
- at udforske farmaceutprofessionens udvikling ved ændringer i sundhedssystemet.
- at udvikle metoder til at øge patienters tilfredshed med farmaceutisk service.



Cand.pharm., ph.d. Anna Birna Almarsdóttir er adjunkt ved Institut for Samfundsfarmaci.



Fil.dr. Janine Marie Morgall er lektor ved Institut for Samfundsfarmaci.

Fig. 1



Billedet er taget på det eneste apotek i Reykjavikområdet med en åben receptur, hvor kunder med recepter kunne sætte sig hos en farmaceut og blive ekspederet. Apoteket har som følge af den nye lovgivning lukket recepturen igen, således at kunderne ikke længere har direkte kontakt til farmaceuten.



Lægemiddelforskning
udgives af Danmarks Farmaceutiske Højskole.

Redaktion:
Mette Rasmussen (ansvarshavende),
Rolf Haugaard, Jesper Munck,
Annemette Møller Hansen og
Anne-Mette Nielsen.

Grafisk design og produktion:
Mads Frederik/Graphic Design.

Tryk:
Centraltrykkeriet Skive
ISO 14001 miljøcertifikat.

Foto:
Jesper Munck, Tue Askaa, Erik Nielsen,
Bjarke Ebert og Biofoto.

Forsideillustration:
Henning Dalhoff.

