

# En spids vinkel på sygdomme og medicin

Næsten al medicin virker ved, at et medicinsk molekyle vekselvirker med et molekyle i kroppen, der direkte eller indirekte er relateret til sygdommen. Med teknikken småvinkelspredning er det muligt at undersøge de vekselvirkende molekyler under naturlige betingelser, hvilket er vigtigt for at kunne udvikle ny medicin.

## Forfatterne



Grethe Vestergaard Jensen, postdoc  
Niels Bohr Institutet,  
Københavns Universitet  
gvjensen@nbi.ku.dk



Bente Vestergaard, lektor  
Institut for Lægemiddel-  
design og Farmakologi,  
Københavns Universitet  
bente.vestergaard  
@sund.ku.dk



Jan Skov Pedersen,  
professor  
Institut for Kemi,  
Aarhus Universitet  
jsp@chem.au.dk



Lise Arleth, professor  
Niels Bohr Institutet,  
Københavns Universitet  
arleth@nbi.ku.dk

Når man behandler sygdomme med medicin, er formålet at angribe sygdommen helt ned på molekylært niveau. Det kan fx ske ved at rette op på et underskud af et bestemt molekyle eller protein, som når insulin gives til diabetikere. Men også ved at skrue op eller ned for et velfungerende molekyles aktivitet. Andre sygdomme er relateret til, at bestemte molekyler i kroppen ikke opfører sig som tilsigtet. Det gælder fx for en lang række neurodegenerative sygdomme som Parkinsons og Alzheimers sygdom, som er associeret med ophobning af proteiner i hjernen.

Det aktive stof i medicinen kan både være et protein eller et lille molekyle som acetylsalicylsyre, der sammen med kodein er det aktive stof i kodimagnyler. Udover selve effekten af lægemidlet er distributionen i kroppen også en vigtig faktor for, hvor virksomt det er.

For at forstå både sygdommene og deres behandling er det vigtigt at kunne undersøge strukturen af de implicerede molekyler og proteiner ned på den mindste skala.

Teknikken krystallografi har været essentiel for den forståelse, man i dag har af proteiners struktur og funktion. Her kan den atomare struktur af et protein bestemmes ud fra diffraktionsmønstre af røntgen- eller neutronstråling. Det kræver dog, at proteinerne er krystalliserede – dvs. at de er place-

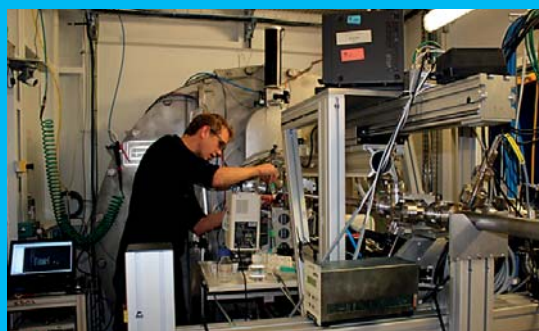
ret i et velordnet gitter, tæt omgivet af nabo-proteiner. Det er temmelig langt fra de fysiologiske betingelser, som proteinet befinder sig under i kroppen, hvor det udfører sin funktion. Det er derfor vigtigt også at få information om, hvordan proteinet og de andre relevante komponenter i en lægemiddelformulering opfører sig i opløsning ved den relevante temperatur og pH. Det kan man få med den teknik, der hedder småvinkelspredning. Småvinkelspredning giver strukturel information på længdeskalaen fra 1 til ca. 500 nanometer på alle typer af prøver. Teknikken har en lavere strukturel opløsning end krystallografi, dvs. man kan fx ikke zoome ind på positionen af de enkelte atomer. Den helt store fordel er dog, at man kan se, hvordan biologiske og medicinske molekyler vekselvirker og danner komplekser under de mere frie og realistiske rammer udenfor krystallerne. Det giver et mere repræsentativt billede af, hvordan disse processer foregår i kroppen og er en unik mulighed for at følge processer under udvikling.

## Neurodegenerative sygdomme på nano-skala

Såkaldt neurodegenerative sygdomme som Parkinsons og Alzheimers er alvorlige sygdomme, der resulterer i mistet hjernefunktion. De er forbundet med dannelsen af meget lange fibre af protein (proteinfibriller), som består af tusindvis af proteinmolekyler i en ændret, inaktiv form. I den farmaceutiske industri er man meget interesseret i at undersøge tilsvarende fibriller for at kunne forebygge, at

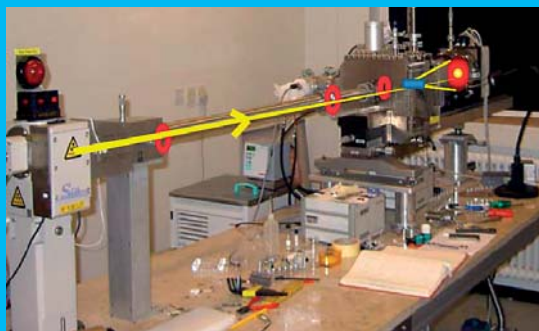
## Småvinkelspredning: SAXS og SANS

I teknikken småvinkelspredning placeres en prøve i en Røntgenstråle (Small-Angle X-ray Scattering, SAXS) eller neutronstråle (Small-Angle Neutron Scattering, SANS). Typisk er prøverne opløsninger eller suspensioner af partikler som proteiner, emulsions-dråber eller polymerer. Hvert punkt i partiklerne spreder strålingen og bidrager dermed til det totale, observerede spredningsmønster. Spredningsmønsteret vil derfor afhænge af partiklernes størrelse og form, hvilket vil sige, at data indeholder information om nanostrukturen i prøven.

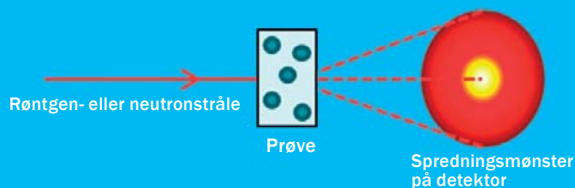


Det synkrotronbaserede SAXS-instrument på storskala-faciliteten ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) i Grenoble.

Data opsamles på storskala-faciliteter i stil med MAX IV og ESS, der er under opbygning i Lund. På nuværende tidspunkt kan data måles fx i Grenoble, hvor der både findes en røntgen- og en neutronkilde. Røntgenstråling kan også genereres på en lille laboratoriebaseret røntgenkilde, fx et røntgenrør. Derfor findes der også rigtigt gode laboratoriebaserede SAXS-instrumenter.



Det laboratoriebaserede SAXS instrument på Aarhus Universitet. Røntgenstrålen er indtegnet med gult og den prøve, der skal studeres, med blåt.



Principskitse for et småvinkelspredningsinstrument. Intensiteten af den stråling, der spredes fra prøven, detekteres ved små vinkler, typisk op til 5 grader. Afhængigt af instrumentet dækker SAXS og SANS størrelser fra ca 1 nanometer og op til 100 eller 500 nanometer.

Røntgenstråling spredes fra elektronerne i prøven, hvorimod neutronerne spredes fra atomkernerne. Det betyder, at SAXS og SANS er følsomme overfor forskellige komponenter i partiklerne, hvilket giver forskellige "kontrastforhold" og dermed komplementær information.

de dannes i protein- og peptidbaserede lægemidler under fremstillingen.

Det er vanskeligt at studere den strukturelle udvikling af fibrillerne, fordi der på ethvert tidspunkt i processen findes et væld af forskellige, sameksisterende former, og fordi den relative fordeling mellem disse former udvikler sig over tid. Småvinkelspredning har dog vist sig at være et meget velegnet værktøj til at få central information. SAXS-data er nemlig additive, hvilket betyder, at man ved grundig analyse af dataserier, der er samlet, mens udviklingen forløber, kan adskille spredningsmønstre for de enkelte former, der dannes i løbet af processen og dermed få detaljeret information om deres struktur. Med denne metode har vi bl.a. undersøgt fibrildannelsen af proteinet alpha-synuclein, som er relateret til Parkinsons sygdom. Metoden er stadig særdeles arbejdskrævende, men vi arbejder på et computerprogram, der kan automatisere analysen.

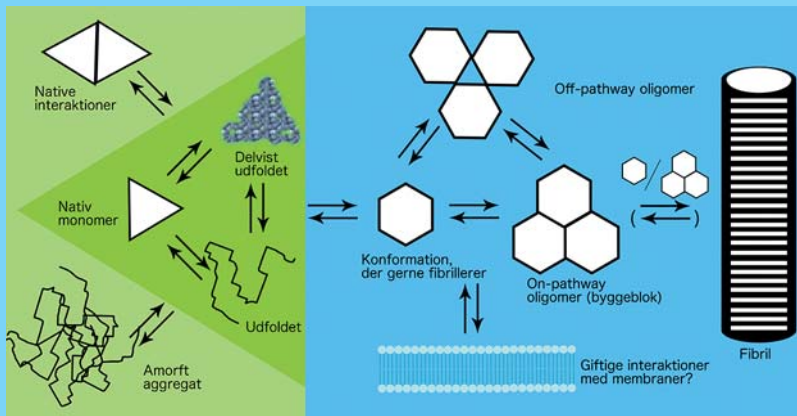
I vore studier har vi også vist, at lipid-modellsystemer, der imiterer cellevægge, destabiliseres og destrueres af de protein-former, der dannes tidligt

i forløbet. Vi har påvist, at der undervejs dannes et aggregat, der består af både protein og lipid. Det er måske en central del af forklaringen på den celledbrydning, der observeres i forbindelse med de neurodegenerative sygdomme. Med denne viden er vi ét skridt nærmere mod at forstå sygdommen på molekylær skala, hvilket er forudsætningen for at kunne behandle den målrettet.

### Insulin

For lidt over 100 år siden blev det opdaget, at sukkersyge hænger sammen med mangel på signalstoffet insulin, som er et lille protein. Hurtigt efter fandt man ud af, at patienter med sukkersyge meget effektivt kunne symptombehandles ved at injicere insulin oprenset fra fx hunde. Siden har bioteknologerne fundet ud af at fremstille insulin langt mere effektivt, præcist og dyrevenligt i genmodificerede gærorganismer. En stor ulempe ved behandling af sukkersyge med insulin er dog, at stoffet skal injiceres direkte under huden, for at dosen kan styres tilstrækkeligt præcist. Dette er til gene for de fleste patienter og medfører, at medicineringen ikke altid bliver tilstrækkeligt god. Derfor har forskere

## Den molekylære basis for neurodegenerative sygdomme



dette korrelerer med forkert foldning af de sygdomsspecifikke proteiner. Vi ved også, at tilstedeværelsen af disse misfoldede proteiner kan være giftigt for cellerne. Systemerne udvikler sig imidlertid på en meget kompleks måde, som det fremgår af figuren.

Proteiners native fold (hvid trekant øverst til venstre) er den 3D-struktur, der udgør den primære funktionelle tilstand. Men proteiner er dynamiske molekyler, som i brøkdelen af deres tid er delvist eller helt udfoldede, og den nativt funktionelle tilstand er en ligevægt mellem disse tilstande (illustreret i den mørkegrønne trekant). Proteinerne kan danne oligomerer med funktionel relevans, eller aggregere amorft (nede venstre hjørne). Imidlertid kan proteinet også antage en form, der har potentiale for at interagere systematisk og dermed danne de højt ordnede proteinfibriller (blå boks). Der findes flere forskellige intermediære oligomere former, hvoraf nogle kan være byggeblokke i fibrillen (on-pathway), og andre kan være midlertidige, stabiliserede former, som ikke fører direkte til fibrillens opbygning (off-pathway). Nogle af formerne er giftige og kan slå celler ihjel. Man regner med, at dette sker via kontakt til cellens membran, men man ved ikke hvilken intermediær form, der er præcist ansvarlig for dette, eller hvad der gør den giftig for celler.

Ved neurodegenerative sygdomme dannes proteinfibriller af et sygdomsspecifikt protein. I Parkinsons syge dannes fx såkaldte Lewy bodies, som indeholder store mængder fibrillert alpha-synuclein. Der er dog ikke en simpel sammenhæng mellem tilstedeværelsen af fibriller og tabet af kognitive funktioner. Man ved, at nervecellerne langsomt dør, men man forstår endnu ikke den bagvedliggende molekylære mekanisme. Det er tydeligt, at forskellige faktorer som regulering af cellernes oxidative tilstand og deres normale signalering henover cellemembranen er stærkt forandret, og at

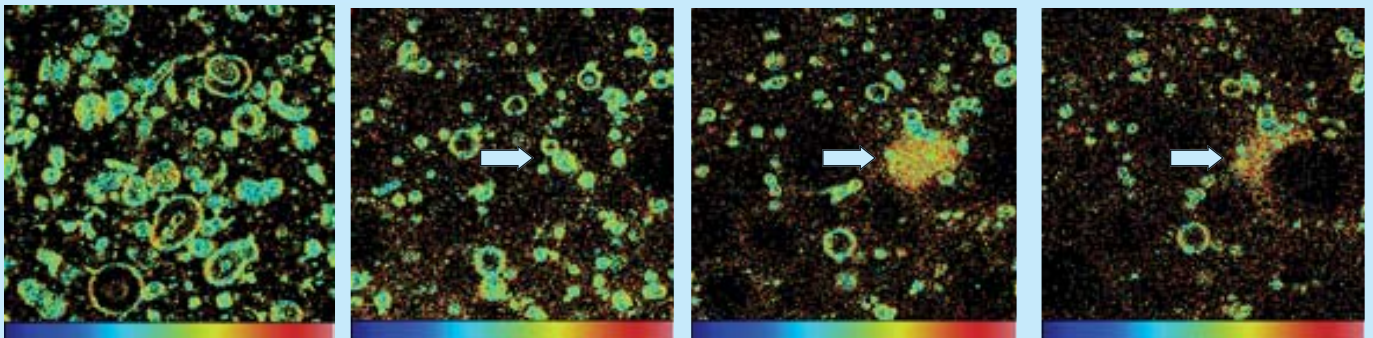
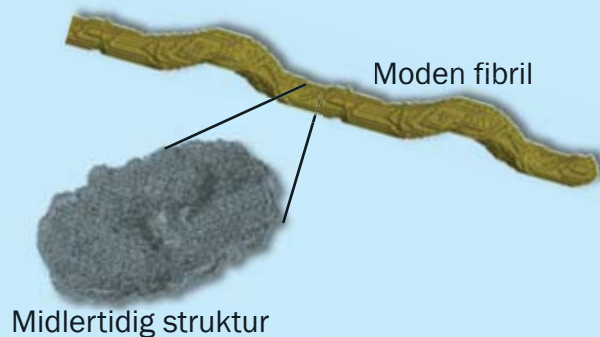
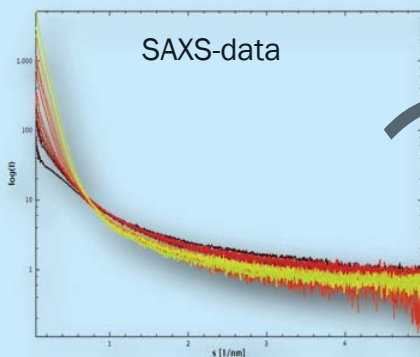


Illustration af sammenhængen mellem cellededbrydning og de tidlige aggregatformer i processen, hvor proteiner omdannes til fibriller i neurodegenerative sygdomme som Alzheimers. Baseret på GISAXS-data har vi kunnet beskrive både de strukturer, der dannes midlertidigt i løbet af processen og de modne fibriller. Fibrillerne består af mange tusinde proteiner. De grå strukturer (som dannes midlertidigt) har en diameter, der svarer til

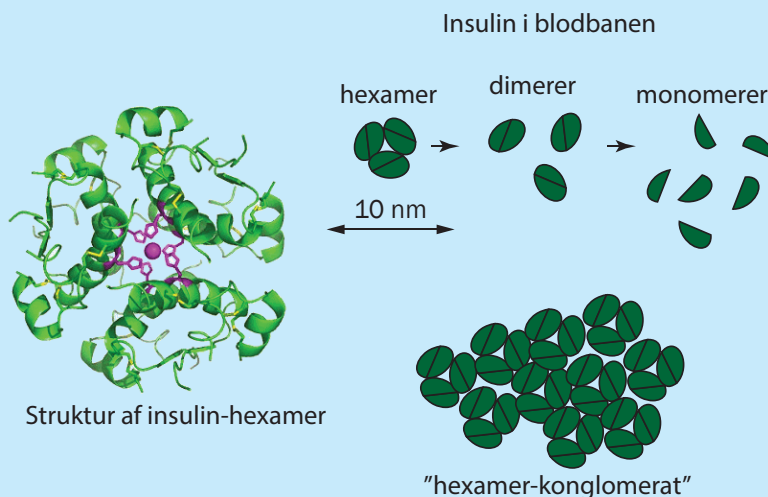
fibrillens diameter og er sandsynligvis byggesten i fibrillen. Når lipid-baserede vesikler (modelsystemer for cellerne) tilsættes enten de oprindelige, native proteiner eller de midlertidige former (grå partikler) kan man observere, at vesiklerne nedbrydes. Det fremgår af billederne nederst (optaget med 2-foton mikroskop). Pilen angiver et område, hvor vesikler først går i stykker og der derefter dannes aggregater af protein og lipid i baggrunden.



## Principper for proteinbaseret lægemiddelformulering

Insulin er godt eksempel på et proteinbaseret lægemiddel, og den formuleringsstrategi, man benytter til insulin, er i grove træk den samme, som benyttes til en lang række af andre proteinbaserede lægemidler. Proteiner, der indtages oralt, dvs. spises, vil hurtigt blive nedbrudt af fordøjelsessystemet til enkelte aminosyrer og miste deres relevans som medicin. Derfor skal de fleste proteinbaserede lægemidler injiceres direkte, enten i blodbanerne eller lige under huden. Grundlæggende gælder, at proteiner, der injiceres på monomer-form, dvs. som enkelte protein-molekyler, virker hurtigt, fordi monomeren næsten altid er den aktive form. Proteiner, der injiceres på oligomerform, dvs. små ansamlinger af monomerer, virker derimod langsomt, fordi de skal falde fra hinanden til monomerer, før de kan udføre deres funktion.

Figur: Når insulinen produceres i den raske krop lagres den midlertidigt i form af hexamerer koordineret omkring zinkatomer (pink kugle). Når insulinhexamererne kommer ud i blodbanerne, falder de fra hinanden, først til dimerer og siden til insulin-monomerer, som derefter kan binde til en insulinreceptor, der igen giver signal til cellerne om, at de skal optage glucose fra blodbanen. Moderne insulin typer udnytter dette samspil mellem lagring af inaktivt insulin på hexamerform og aktivt monomerisk insulin. Når man skal lave hurtigtvirkende insulin, overflademodificerer man de enkelte insulinmolekyler, sådan



at de i højere grad er på monomer- eller dimer-form. Dermed virker de umiddelbart efter injektion. Omvendt fås langsomt-virkende insulin ved at stabilisere hexamererne og overflademodificere disse, sådan at de samler sig i større konglomerater. Disse konglomerater af hexamerer skal så først falde fra hinanden til hexamerer, dernæst skal hexamererne falde fra hinanden til dimerer, som så til sidst falder fra hinanden til de aktive monomerer. Alt i alt giver dette en forsinket frigivelse af insulin.

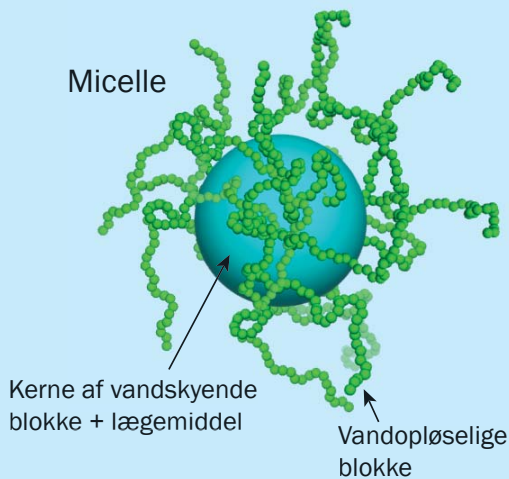
både på universiteterne og i medicinalvirksomhederne i mange år arbejdet på at gøre den injicerede insulin så langtidsvirkende som muligt ved at skabe bedre kontrol over insulinfrigivelsen. En af de vigtigste strategier er at etablere mikroskopiske depoter af insulin lige under huden på patienten. Herfra vil insulinen så frigives langsomt over lang tid. Dermed vil patienten ikke skulle injicere insulin alt for ofte, og insuliniveauet i patienten vil kunne holdes mere konstant.

Småvinkelspredning er i de seneste par år blevet en mere og mere hyppigt benyttet teknik til at få yderligere indsigt i disse mikroskopiske insulinstrukturer. Den helt store fordel ved småvinkelspredning er, at man let kan studere insulinmolekylerne under fysiologisk relevante betingelser. Bl.a. kan man undersøge, hvordan forskellige modifikationer af insulinens overflade påvirker mikrostrukturen af insulindepoterne og den måde hvorpå, insulinmolekylerne sidder sammen med hinanden. Vi ved nu, at en af de nyeste kommercielle insulin typer organiserer sig i lange tynde stave, som igen er dannet af enheder af hver seks insulinmonomerer. Med denne struktur er det mest oplagt, at den aktive insulin bliver frigivet fra enderne af stavene. Det er formentlig en vigtig del af forklaringen på, at insulin frigives så langsomt fra denne formulering. Denne nyttige viden kan bruges som et springbræt

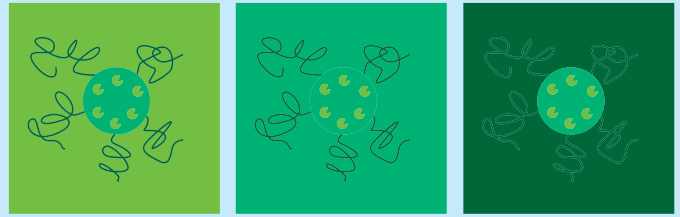
til at finde ud af, hvordan man yderligere kan kontrollere frigivelsen af insulin og dermed nedsætte generne samt øge livslængden og livskvaliteten for patienterne.

### Lægemiddelformuleringer

For at lægemidler kan virke, er det essentielt, at de kan optages i blodbanen. Det er en udfordring for de mange lægemidler, der ikke er opløselige i vand. Derfor er tabletter og kapsler bl.a. tilsat specielle polymerer, olier og overfladeaktive stoffer, der skal øge opløseligheden af lægemidlerne i vand. Når man blander lægemidlerne med disse stoffer, taler man om *lægemiddelformuleringer*. Polymererne vil typisk være sammensat af to blokke af forskellige polymerer, hvoraf den ene er vandopløselig, og den anden er vandskyende. Når polymeren er opløst i vand, samles den spontant i nanometer-store aggregater, der kaldes miceller. Heri danner den vandskyende blok en kerne, hvori lægemidlet kan opløses, og den vandopløselige blok omgiver kernen, og gør hele micellen vandopløselig. Indkapslingen af lægemidlet i kernen giver yderligere den fordel, at lægemidlet kan frigives gradvist og langsommere, så der opnås en konstant koncentration i blodet over længere tid. Polymer-micellerne er ofte så små, at de kan krydse blod-hjerne-barrieren, hvis vitale funktion er at forhindre skadelige stoffer og især bakterier og virus i at komme ind i hjernen. Micellerne



Figuren illustrerer en micelle fra en computersimulering, baseret på målinger med SAXS og SANS. Micellen består af lange polymer-molekyler, der igen består af to forskel-



lige blokke: En vandopløselig og en vandskyende blok. Ved at indkapsle et vandskyende lægemiddel på denne måde, kan det gøres opløseligt i blodstrømmen. Til højre ses kontrasterne for de forskellige komponenter i tre forskellige solventblandinger. Det svarer til et SANS-eksperiment, hvor de forskellige komponenter er "mærket" med deuterium ( $D_2O$ ) og undersøgt i forskellige blandinger af  $H_2O$  og  $D_2O$ . Denne "kontrastvariation" får de forskellige komponenter til hhv. at fremtræde tydeligt eller blive usynlige.

kan således bruges til at levere lægemidler til hjernen. For at dette kan gøres, skal man kende og kunne kontrollere micellernes størrelse og struktur. Til det formål er småvinkelspredning baseret på både røntgen- og neutronstråling en optimal teknik.

For nogle polymerer er dannelsen af kerne-skalstrukturen i micellerne ikke så tydelig, hvis prøverne studeres med småvinkel-røntgenspredning (SAXS). I dette tilfælde er småvinkel-neutronspredning (SANS) et fantastisk værktøj til at undersøge micellerne. Når vi bruger SANS, hvor neutronerne spredes fra atomkernerne i opløsningen, kan vi ved at "mærke" kun den ene af blokkene bestemme fordelingen af de to blokke i strukturen. Dette gøres ved at bruge en polymerblok, hvor hydrogen (H) er udskiftet med tungt hydrogen, deuterium (D), der foruden den sædvanlige proton også har en neutron i sin atomkerne. Når micellerne så opløses i almindeligt vand ( $H_2O$ ), kan neutronerne se den deutererede blok, mens vi ved at opløse den i tungt vand ( $D_2O$ ), vil se den blok, der ikke er deutereret ved hjælp af neutronerne. Man kan derefter gå skridtet videre og studere fordelingen af et lægemiddel ved delvist at mærke det med deuterium og så undersøge flere blandinger af  $H_2O$  og  $D_2O$ . Dermed får man "flere ligninger" til de "flere ubekendte", som man kan bruge til at bestemme, hvor de enkelte bestanddele er placeret i forhold til hinanden. Denne metode kaldes også for kontrastvariation, da synligheden af de enkelte komponenter varieres ved at variere  $H_2O/D_2O$ -indholdet i den opløsning, der udgør baggrunden.

Resultaterne for kernestørrelse, skaltykkelse og placering af lægemidlet forklarer, hvorfor nogle læge-

midler frigives langsomt (tyk skal og lægemidlet er fortrinsvist til stede dybt i kernen), mens andre lægemidler frigives hurtigt (tynd skal og lægemidlet sidder på overfladen af kernen). Denne indsigt kan bruges til at optimere lægemiddelformuleringen ved fx at ændre molekylemasse af de to polymerblokke eller typerne af polymerer, der anvendes for blokkene, så der kan opnås en given frigivelsesprofil, fx med konstant frigivelse over tid af lægemidlet, så koncentrationen i blodbanen holdes konstant.

### En efterspurgt teknik

Småvinkelspredningsmetoden er i løbet af de seneste ti år gået fra at være en halvveksotisk metode, der kun blev benyttet af specialister, til i højere og højere grad at være en metode, der benyttes af en bredere skare af forskere og udviklere til at få essentiel information om medicinske molekyler og sygdomsrelaterede molekylære strukturer. Metoden er en af de mest efterspurgte teknikker på de internationale neutronspretningsfaciliteter, og på røntgen-synkrotronerne har den været en stærkt voksende teknik de seneste ti år og er en central del af instrumentporteføljen på de fleste internationale faciliteter. Småvinkelspredning er dog stadig en relativt svært tilgængelig metode, fordi det kræver et stort analysearbejde at fortolke data, og den vil næppe lige med det første blive en fuldt automatiseret og bredt tilgængelig screeningmetode. Dog er der en lang række af situationer, hvor småvinkelspredning giver essentiel information, der vanskeligt kan fås på andre måder. Der arrangeres derfor store internationale kurser flere steder i verden med henblik på at uddanne flere unge forskere indenfor feltet. ■

Videre læsning  
Mere om småvinkelspredning:  
Læs også i dette nummer artiklen "Form og funktion på nanoskalaen" af Dorthe Posselt.