



Københavns Universitet

Proteiner i lægemidler - de sætter sig alle de forkerte steder

Baldursdóttir, Stefanía Guðlaug; Nielsen, Signe Hougaard; Fullerton, Maria; Jørgensen, Lene

Published in:
Lægemiddelforskning

Publication date:
2010

Document version
Også kaldet Forlagets PDF

Citation for published version (APA):
Baldursdóttir, S. G., Nielsen, S. H., Fullerton, M., & Jørgensen, L. (2010). Proteiner i lægemidler - de sætter sig alle de forkerte steder. *Lægemiddelforskning*, 2010, 43-45.

Proteiner i lægemidler

– de sætter sig alle de forkerte steder

En tredjedel af alle nye lægemidler i kliniske forsøg er baseret på proteiner. Imidlertid er proteinlægemidler vanskelige at formulere, fordi proteiner binder sig til grænseflader og overflader, hvilket kan medføre, at det færdige lægemiddel ikke virker efter hensigten. Nye metoder kan screene for kombinationer af hjælpestoffer, som kan løse problemet.

Af Stefania Baldursdottir, Signe Hougaard Nielsen, Maria Fullerton og Lene Jørgensen

I proteinlægemidler er det aktive stof et biomolekyle – et protein eller et peptid. Et velkendt eksempel er insulin, som anvendes til behandling af sukkersyge. Vi vil meget gerne bruge flere proteiner som lægemidler, mest af alt fordi de er specifikke i deres virkning og derfor kun medfører få bivirkninger. Rigtig mange og vidt forskellige sygdomme kan behandles med proteiner. Det gælder bl.a. kræft, en række mangelsygdomme, infektioner med bakterier, svampe eller parasitter samt virusbårne sygdomme som AIDS. Et nyere eksempel er den meget specifikke behandling af en bestemt type brystkræft ved hjælp af lægemidlet Herceptin®, som indeholder et monoklonalt antistof.

Desværre er proteiner vanskelige at arbejde med i lægemiddelindustrien. En af ulemperne er, at proteiner er grænsefladeaktive, hvilket vil sige, at de vil forsøge at sætte sig i græn-

seflader mellem vand og olie, mellem vand og luft eller på overfladen af beholdere. Det kan føre til mangel på protein i det færdige lægemiddel, så dosis bliver for lav. Der er også risiko for at fremstille u hensigtsmæssige formuleringer, hvor proteinet enten frigives for tidligt eller slet ikke. Hvis proteinet i lægemidlet befinder sig i en grænseflade, fx mellem et fast stof og en væske, vil proteinet måske ikke have nogen terapeutisk effekt overhovedet, og det er selvfølgelig et stort problem.

Adsorption til grænseflader

Under fremstilling af et lægemiddel vil de anvendte proteiner møde flere forskellige typer af grænseflader og overflader. Det gælder eksempelvis, når proteiner indbygges i partikler, som skal beskytte proteinet imod enzymatisk nedbrydning i blodet og transportere det hen til virkningsstedet i kroppen. Her er der risiko for, at proteinet i løbet af produktionsprocessen kommer til at befinde sig i olie-vand lignende grænseflader, og det kan påvirke stabiliteten, effektiviteten og aktiviteten af det færdige lægemiddel på en negativ måde. For eksempel kan proteinet ændre sin tredimensionelle form, hvilket ofte vil hindre det i at udføre sin terapeutiske funktion. Når man producerer proteinlægemidler, er det derfor vigtigt at have kendskab til og forståelse for den indflydelse, som grænseflader har på stabiliteten af det anvendte protein.



Skematisk udvikling af adsorptionen af proteiner til en olie-vand-grænseflade. Over tid adsorberes mere og mere protein. Proteinet kan ændre struktur, når det adsorberes til grænsefladen – med risiko for, at det mister sin biologiske aktivitet og ikke længere virker som lægemiddel. Strukturændringen kan påvirke strukturen af ikke-adsorberede proteiner, specielt hvis adsorptionen er reversibel.



Et billede af en vanddråbe i et oliekar. Et multilag af proteinmolekyler er adsorberet til grænsefladen mellem olien og vandet, hvilket ses som en slags film. Filmen er fleksibel og kan pustes op som en ballon. Billedet er taget ved hjælp af et apparatur, som kan måle grænsefladespænding.

Når et protein adsorberer til en grænseflade, vil proteinmolekylerne over tid opbygge et lag i grænsefladen, som det ofte er svært at detektere. Vi har anvendt nogle avancerede, men dog ret enkle metoder til at bestemme adsorptionen af proteiner ved olie-vand grænseflader. En forståelse for, hvordan adsorptionen foregår, og hvordan den kan ændres ved at finjustere formuleringen af lægemidlet, vil gøre det lettere og mere effektivt at designe gode partikulære eller flydende formuleringer af proteinlægemidler.

Grænsen mellem vand og olie

Når proteiner adsorberer til en vand-olie grænseflade, vil energien over grænsefladen falde, mens der dannes et monolag af proteiner. Vi kan derfor følge processen under den tidlige adsorption og opbygningen af monolaget ved at måle ændringer i grænsefladespændingen mellem vanddråben og olien.

Hvis der fortsat er overskud af protein, vil monolaget med tiden blive udbygget til et multilag, og denne sene adsorption og opbygning af multilaget kan observeres ved hjælp af reologi. Reologi er en meget følsom metode, som traditionelt bruges til at bestemme væskers flydeegenskaber. Vi har benyttet en ny og ikke så ofte anvendt reologisk opsætning, der gør det muligt at måle flydeegenskaberne direkte i grænsefladen mellem vand og olie. På den måde kan vi observere og karakterisere den del af processen, som fører frem til dannelsen af et multilag af proteiner.

Omdannelsen fra monolag til multilag begynder så småt ef-

ter en halv times adsorption af proteinet, og den medfører en forandring i lagets flydeegenskaber, så det bliver stærkere. Efter 40 minutter ændres flydeegenskaberne fra at minde om en tyktflydende væske til at blive dominerende elastisk, og netop ved dette skift forandres proteinlaget fra et monolag til et multilag. Derefter fortsætter opbygningen af multilaget, som vokser i tykkelse. Ved forstørrelse i et mikroskop kan man nu direkte se laget i grænsefladen mellem olie og vand som et fleksibelt lag på overfladen af en vanddråbe. Faktisk er laget så fleksibelt, at det kan pustes op som en ballon.

Bedre proteinlægemidler

De to anvendte metoder – målinger af grænsefladespændingen og reologi – gør det muligt at beskrive dannelsen af proteinlaget lige fra den første adsorption af ganske få proteiner, dannelsen af et monolag og videre til dannelsen af det fleksible multilag.

Dét åbner op for, at man kan bruge disse to metoder til at undersøge påvirkningen af forskellige parametre på adsorptionen af proteiner i en olie-vand grænseflade; fx proteintypen og anvendelse af hjælpestoffer med forskellige egenskaber. I forbindelse med optimering og design af nye og forbedrede formuleringer af proteinlægemidler kan de anvendte metoder benyttes til at screene for brugbare kombinationer af hjælpestoffer, som kan forhindre uønsket proteinadsorption under produktion af lægemidler.

FORMULERING AF PROTEINLÆGEMIDLER

At formulere et lægemiddel vil sige at fremstille det i en stabil form og sørge for ved brug af passende hjælpestoffer, at det aktive lægemiddelstof efter indgift er tilgængeligt for kroppen via den valgte administrationsvej.

Proteiner egner sig generelt ikke til tabletter, fordi de nedbrydes i mave-tarm-kanalen, og skal derfor normalt injiceres. Den mest enkle formulering vil være at opløse proteinet i vand, men denne formulering vil ikke være stabil eller acceptabel for patienterne. Det skyldes, at proteinlægemidler til injektion skal være sterile og tæt på pH-neutrale. En vandig proteinformulering vil derfor indeholde hjælpestoffer, typisk salte, til at holde pH stabil. Ellers vil proteinet kunne fælde ud, fordi dets opløselighed eller den kemiske nedbrydning af proteinet kan accelereres. Begge dele vil betyde, at der ikke administreres den angivne mængde af det aktive protein, og at virkningen af lægemidlet udebliver. Rent prak-

tisk kan udfældningen også betyde, at proteinet slet ikke kan administreres, fordi det klumper sammen, så det ikke kan komme ud gennem nålen.

Derudover anvender man ofte stabilisatorer, fx grænsefladeaktive stoffer, i flydende formuleringer. Et andet hjælpemiddel er co-faktorer, som er nødvendige for, at proteinet præsenteres på dets aktive form, eller for at beskytte proteinet, så det forbliver stabilt og ikke ændrer struktur i formuleringen.

Proteiner kan også formuleres som frysetørrede pulvere eller i partikler. Under fremstillingen udsættes proteinet for påvirkninger som frysning og tørring eller for grænseflader, der vil kunne påvirke strukturen og stabiliteten af proteinet. Derfor tilsættes hjælpestoffer, som beskytter proteinet mod effekten fra frysningen og grænsefladerne. Det kan fx være sukkerstoffer eller grænsefladeaktive stoffer.

REOLOGI VISER OPBYGNINGEN AF PROTEINLAGET

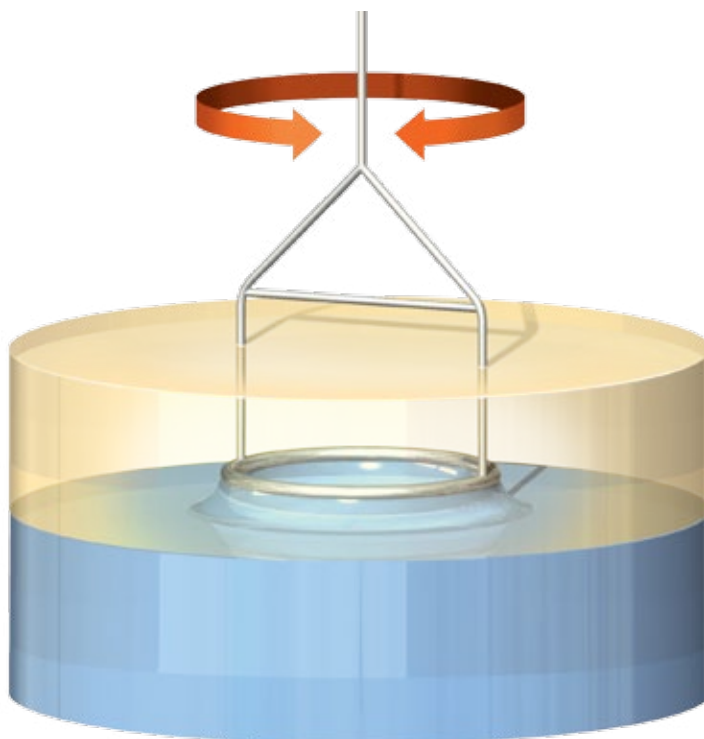
Reologiske målinger kan følge overgangen fra monolag og multilag, når proteiner adsorberes til grænseflader mellem olie og vand.

Målingen indledes ved at stille et bæger med proteinopløsning på reometret, derefter placere en såkaldt Du Noüy-ring i grænsen mellem vand og luft og lægge en bestemt mængde olie oven på den vandige opløsning. Ringen begynder nu at oscillere, og modstanden under bevægelsen bliver registreret.

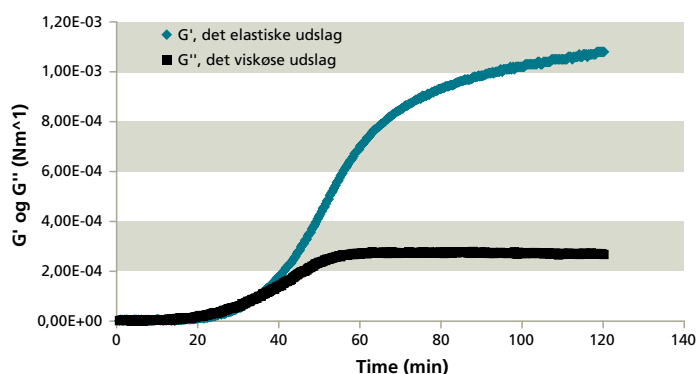
Når proteinerne diffunderer op til overfladen og samles i et monolag ved ringen, giver det et signal. Under målingen ændres monolagets struktur og multilag dannes. Senere for-

andres multilagets opførsel fra at minde om en tykflydende væske til at være dominerende elastisk. Ændringerne undervejs i processen fører alle til en gradvist øget modstand imod ringens bevægelser.

Når proteinlagets flydeegenskaber måles, kan de deles op i to forskellige udslag: Et viskositets-udslag og et elasticitets-udslag. Viskositet er et mål for, hvor meget grænsefladen ændrer sig under målingen via frigivelse af energi. Elasticitet beskriver den energi, der bliver bevaret under målingen; dvs. hvor meget af den oprindelige struktur, der er tilbage, når målinger er afsluttet.



Øverst ses en Du Noüy-ring, som måler dannelsen af et proteinlag i grænsefladen mellem vand og olie. Diagrammet til højre viser en reologisk beskrivelse af opbygningen af proteinlaget. Med tiden stiger det elastiske udslag i takt med, at det dannede multilag bliver tykkere og tykkere.



Ph.d. Stefania Baldursdottir er adjunkt på Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi
Cand.pharm. Signe Hougaard Nielsen er tidligere specialestuderende på Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi
Cand.pharm. Maria Fullerton er tidligere specialestuderende på Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi
Ph.d. Lene Jørgensen er lektor på Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi