



Københavns Universitet



Transportpeptider

Thorn, Karina; Nielsen, Carsten Uhd; Begtrup, Mikael

Published in:
Lægemiddelforskning

Publication date:
2007

Document version
Også kaldet Forlagets PDF

Citation for published version (APA):
Thorn, K., Nielsen, C. U., & Begtrup, M. (2007). Transportpeptider: nøglen til forbedret optagelse af lægemiddelstoffer. *Lægemiddelforskning*, 18-19.

Transportpeptider

- nøglen til forbedret optagelse af lægemiddelstoffer

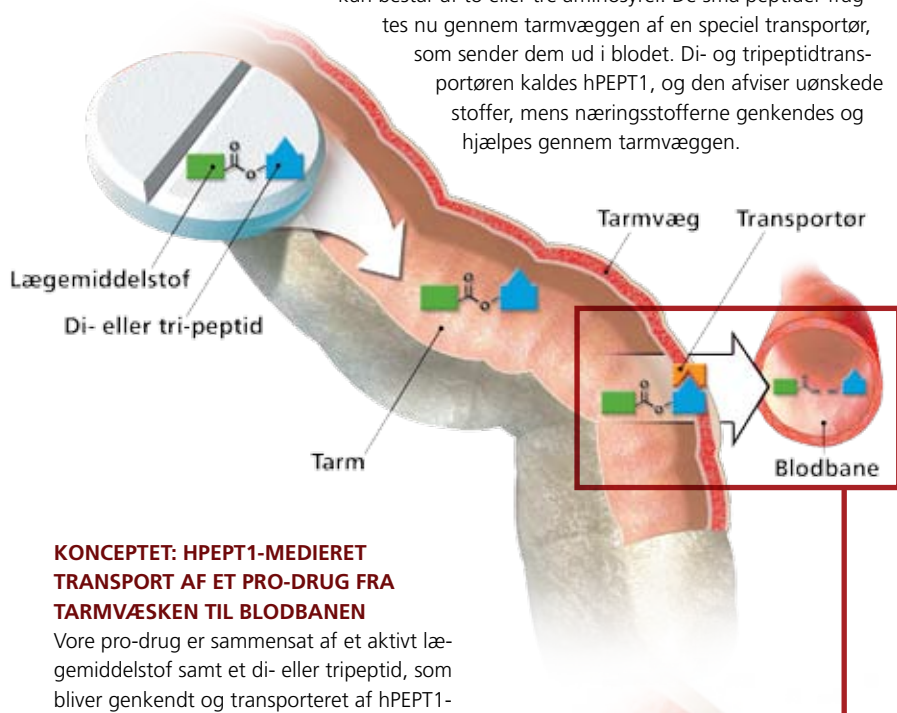


Mange lægemiddelstoffer kan ikke trænge gennem tarmvæggen, hvis de indtages som tabletter, og derfor kan de ikke komme ud i blodet og nå frem til virkningsstedet i kroppen. Problemet kan løses ved at koble lægemiddelstoffet til et transportpeptid, som trækker det gennem tarmvæggen.

Af Karina Thorn, Carsten Uhd Nielsen og Mikael Begtrup

For at et lægemiddel kan udøve sin farmakologiske effekt, skal det af blodet transporteres hen til virkningsstedet i kroppen. For patienten er det mest bekvemt at indtage medicinen i tabletform, men hvordan kommer lægemiddelstoffet gennem tarmvæggen og ud i blodet?

Mange lægemiddelstoffer er desværre ikke i stand til at passere tarmvæggen og må derfor injiceres, og det kan være meget ubekvemt for patienten. For at muliggøre at lægemiddelstoffer, der optages dårligt gennem tarmen, alligevel kan indtages i tabletform, har vi forsøgt at udnytte kroppens mekanismer for optag af næringsstoffer. Når vi har spist, nedbrydes føden under fordøjelsen til mindre molekyler; fx nedbrydes proteiner i kosten til små peptider, som kun består af to eller tre aminosyrer. De små peptider fragtes nu gennem tarmvæggen af en speciel transportør, som sender dem ud i blodet. Di- og tripeptidtransportøren kaldes hPEPT1, og den afviser uønskede stoffer, mens næringsstofferne genkendes og hjælpes gennem tarmvæggen.



KONCEPTET: HPEPT1-MEDIERET TRANSPORT AF ET PRO-DRUG FRA TARMVÆSKEN TIL BLODBANEN

Vore pro-drug er sammensat af et aktivt lægemiddelstof samt et di- eller tripeptid, som bliver genkendt og transporteret af hPEPT1-transportøren. I tyndtarmen bliver dipeptider, tripeptider, peptidefterligninger og pro-drugs sammen med protoner transporteret over den apikale tarmmembran og ind i tarmcellen. Når vores pro-drug er kommet ind i tarmcellen, bliver det transporteret enten i intakt eller i spaltet form over den basolaterale membran og ud i blodbanen. Esterbindingen mellem lægemiddelstoffet og transportpeptidet spaltes ved den højere pH i tarmcellen eller i blodbanen. Illustrationen viser fremstilling af et pro-drug med lægemiddelstoffet gabapentin.

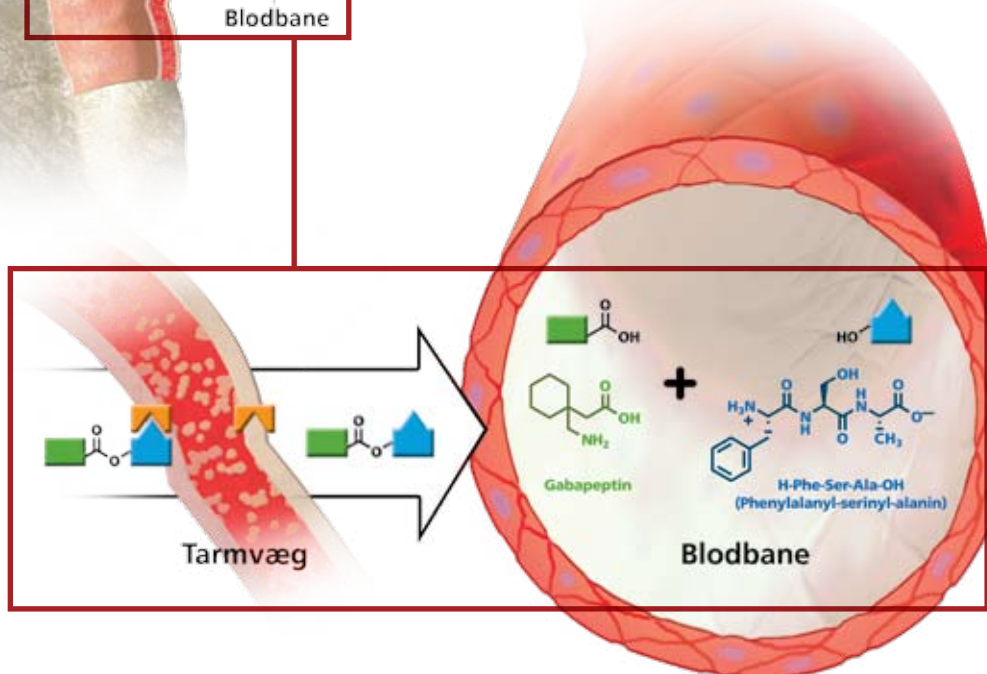
Ideen bag vores projekt er at koble et lægemiddelstof til et egnet di- eller tripeptid med en kemisk binding i forventning om, at koblingsproduktets peptid accepteres af transportøren og derpå fragtes gennem tarmvæggen med lægemiddelstoffet på slæb. Efter passagen gennem tarmvæggen til blodbanen skal koblingsproduktet spaltes til transportpeptid og lægemiddelstof. Denne pro-drug strategi rummer imidlertid store udfordringer. Koblingen mellem lægemiddelstof og transportpeptid må ikke ændre lægemiddelstoffets struktur og dermed dets virkning. Desuden skal koblingen være stabil over for mavesyre og fordøjelsesenzymerne i tarmen, mens den skal kunne brydes i blodbanen, så lægemiddelstoffet frigives til blodet. Disse krav kan kun opfyldes ved at vælge den rigtige kemiske bindingstype ved koblingen. Vi har valgt en esterbinding, fordi den spaltes hurtigere ved højere pH. Vi kan så udnytte, at pH-værdien er 7.4 i blodbanen, men kun ca. 6.6 i tarmen.

Epilepsi og nervesmerter

Som lægemiddelstof valgte vi gabapentin, som siden 1993 er blevet brugt til behandling af epilepsi og visse typer kroniske smerter. Når gabapentin indtages i tabletform, optages 40-60 procent af lægemiddelstoffet i kroppen ved lave doser, og ved høje doser er optaget endnu mindre. Hvis optaget kan øges, vil det aktive lægemiddelstof blive udnyttet bedre, og man kan nøjes med mindre doser. Derfor er det oplagt at formulere gabapentin som et pro-drug, som genkendes af hPEPT1-transportøren i tarmvæggen. Vi har i den forbindelse udviklet et tripeptid, som accepteres af transportøren. Tripeptidet indeholder en hydroxygruppe, som kan udnyttes til at forankre gabapentins syregruppe til transportpeptidet via dannelse af en esterbinding.

Optimering og test af transportpeptider

Transportpeptidets struktur blev først optimeret ved at fremstille en række tripeptider med varierende sammensætning af de tre aminosyrer. Tripeptiderne blev syntetiseret ved at





Ph.d. Karina Thorn er forskningsassistent ved Institut for Medicinalkemi.

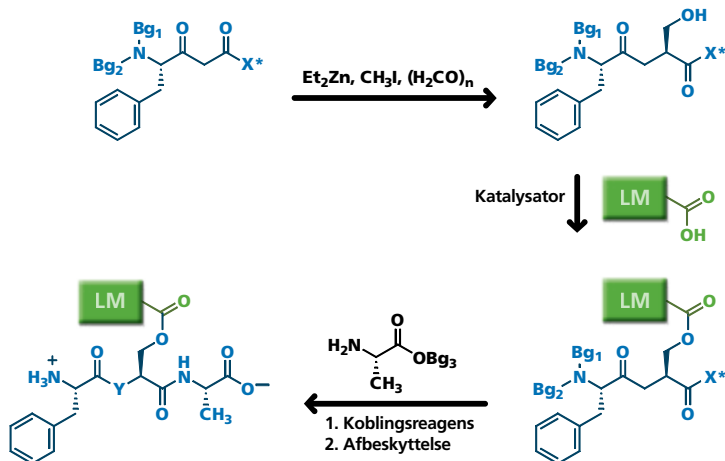


Ph.d. Carsten Uhd Nielsen er lektor ved Institut for Farmaceutisk og Analytisk Kemi.



Ph.d. Mikael Begtrup er professor ved Institut for Medicinalkemi.

STEREOSELEKTIV SYNTese AF KETOMETHYLEN PRO-DRUGS



En stereoselektiv syntese er en kontrolleret fremstilling af kun den ene stereoisomer af et tredimensionelt chiralt molekyle. Et chiralt molekyle er et, der er forskelligt fra sit spejlbillede. Første trin i syntesen er en stereoselektiv kædeforlængelsesreaktion, hvor ketomethylenheden dannes. Stereokemien styres af den påsatte skabelon X*. I andet trin forbindes lægemiddelstoffet LM til dipeptidet med en esterbinding under brug af en katalysator. Derpå påkøbes den tredje aminosyre ved hjælp af aktiverende koblingsreagenser. Til sidst fjernes de beskyttelsesgrupper BG, som er anvendt under synteseforløbet for at undgå, at de forkerte grupper i molekylerne deltager i reaktionerne.

fæstne den første aminosyre med en kemisk binding til små plastkugler. Derefter påkøbedes de øvrige aminosyrer, beskyttet på passende måde, én efter én, idet amidbindingerne etableredes ved hjælp af aktiverende koblingsreagenser. Næste trin var at vurdere tripeptidernes egenskaber ud fra, hvor godt de blev genkendt af hPEPT1-transportøren. Her bestemte vi, hvor effektive de forskellige tripeptider var til at fortrænge et radioaktivt standardstof, som binder sig til hPEPT1-transportøren på tarmceller. Til forsøgene brugte vi en cellelinie af rendyrkede Caco-2-celler. Peptidernes affinitet for transportøren blev bestemt ved at måle bindingskonstanten mellem stof og transportør.

De peptider, som blev accepteret i særlig høj grad, blev derpå testet for deres transportevne. Transporten over membranen måles i HeLa- eller MDCK-celler, som udtrykker hPEPT1, ved at bestemme ændringen i cellemembranens potentiale. Potentialet bygges op af protoner, fordi hvert peptidmolekyle under transporten ledsages af en proton. Måleresultatet opgives i procent i forhold til et standardstof. Tripeptidet H-Phe-Ser-Ala-OH klarede sig bedst i målingerne og blev udvalgt til videre undersøgelser.

Gabapentin blev nu koblet til dette tripeptid ved etablering af en esterbinding. Det resulterende pro-drug blev testet for genkendelse og transport via hPEPT1-transportøren. Vort pro-drug blev accepteret af transportøren, om end i lidt ringere grad end selve transportpeptidet. Til gengæld syntes vores pro-drug at blive transporteret lige så godt gennem tarmvæggen som transportpeptiderne selv. Det fremstillede pro-drug opfyldte således en række kriterier for forøget optagelse gennem tarmen. Et tilbageværende problem var den relativt hurtige nedbrydning af selve transportpeptidet i mave-tarm systemet.

Stabilitet under fordøjelsen

Peptider består af aminosyrer, som er forbundet med amidbindinger. Under fordøjelsen spaltes amidbindingerne ved hydrolyse, der ofte katalyseres af enzymer som peptidaser

og proteaser. Di- og tripeptider, som skal hjælpe lægemiddelstoffer gennem tarmvæggen, kan også undergå hydrolytisk nedbrydning i fordøjelsessystemet, før de når frem til hPEPT1-transportøren i tyndtarmen. Der skal altså konstrueres et transportstof, der ligner det optimerede tripeptid så meget, at det genkendes og accepteres af hPEPT1-transportøren, og som tåler de barske forhold i fordøjelsessystemet. En løsning er at erstatte amidbindingen med en efterligning, som ikke spaltes i fordøjelsessystemet. Ved erstatningen er det afgørende for genkendelse af hPEPT1-transportøren, at det oprindelige transportpeptids tredimensionelle struktur bevares. Fremstillingen af tripeptidefterligningen skal derfor være stereoselektiv og kun give en af de otte mulige stereoisomere.

Efterligningen blev fremstillet ved at erstatte amidgruppen i det optimerede tripeptid med en ketomethylen-gruppe. Denne gruppe kan ikke nedbrydes ved hydrolyse. Ved syntesen anvendte vi højreaktive udgangsstoffer, som skulle håndteres med største forsigtighed, fordi de anvendte zinkforbindelser bryder i brand blot ved kontakt med atmosfærens oxygen. Reaktionen blev derfor udført i nitrogenatmosfære.

Den nødvendige entydige tredimensionelle struktur sikres ved at bruge phenylalanin som skabelon. Phenylalanin findes i naturen kun på én spejlbilledform. Den tredimensionelle skabelon præger stereokemien ved de efterfølgende reaktioner, der fører til ketomethylendelen, som derfor kun opstår på én spejlbilledform. Ved afsluttende påkoblinger af aminosyrer dannes tripeptidanalogen, som ifølge vores foreløbige målinger er stabil under fordøjelsesbetingelser, og som heldigvis har bevaret det oprindelige tripeptids gode genkendelses- og transportegenskaber.

Således synes alle fundamentale problemer ved pro-drug-strategien at være løst. Det næste skridt bliver at afprøve, om det koblede pro-drug med lægemiddelstof og transportpeptid virker. Hvis svaret er ja, må princippet afprøves på andre lægemidler.