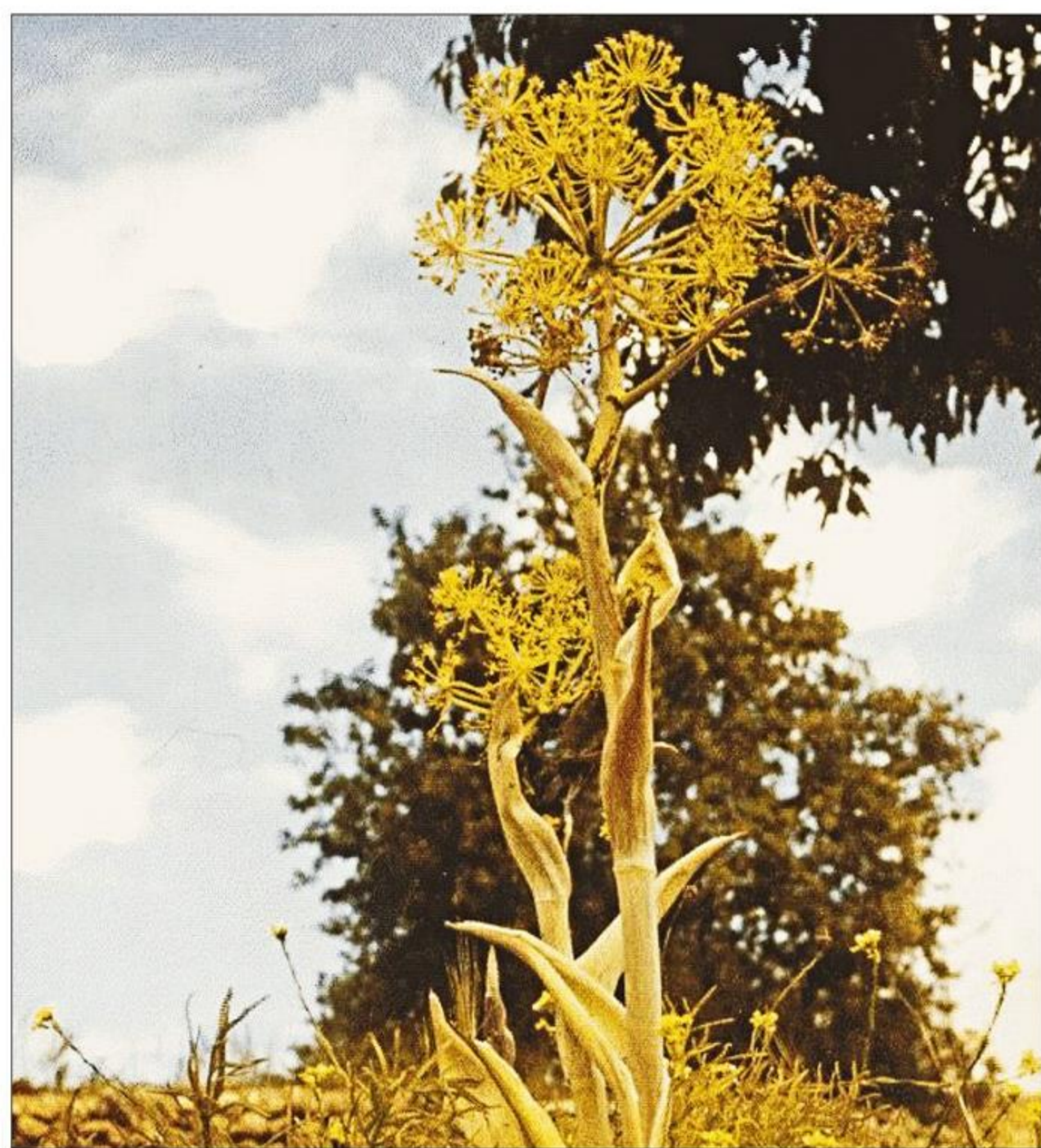


# Fra plante til patient: Fyrre års arbejde med thapsigargin

Fyrre års arbejde med thapsigargin har ført til en lægemiddelkandidat, der i øjeblikket afprøves i klinikken som potentielt lægemiddel. Her beskrives arbejdet.

Af Søren Brøgger Christensen, Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi, KU

Planten *Thapsia garganica*, L. (figur 1), hvis danske navn er uægte turbit, gror vildt på mange øer i Middelhavet og i flere lande, der grænser op til dette hav. Uægte turbit er et dårligt



Figur 1A. Blomstrende eksemplar af *Thapsia garganica*. Planten gror vildt i lande ved Middelhavet. Planten får gule blomster. I slutningen af juni sætter den store frugter, hvorefter den visner væk. Planten skyder igen i foråret.



Figur 2. *Emplastrum thapsiae* skal lægges på huden, hvor indholdet af harpiks fra *Thapsia garganica* vil fremkalde irritation, der øger blodtilførslen og derved lindrer smerter.



Figur 1B. *Thapsia garganica* fotograferet omkring 1. juli, hvor kun de tørre stængler og de store frugtstande er tilbage over joden.

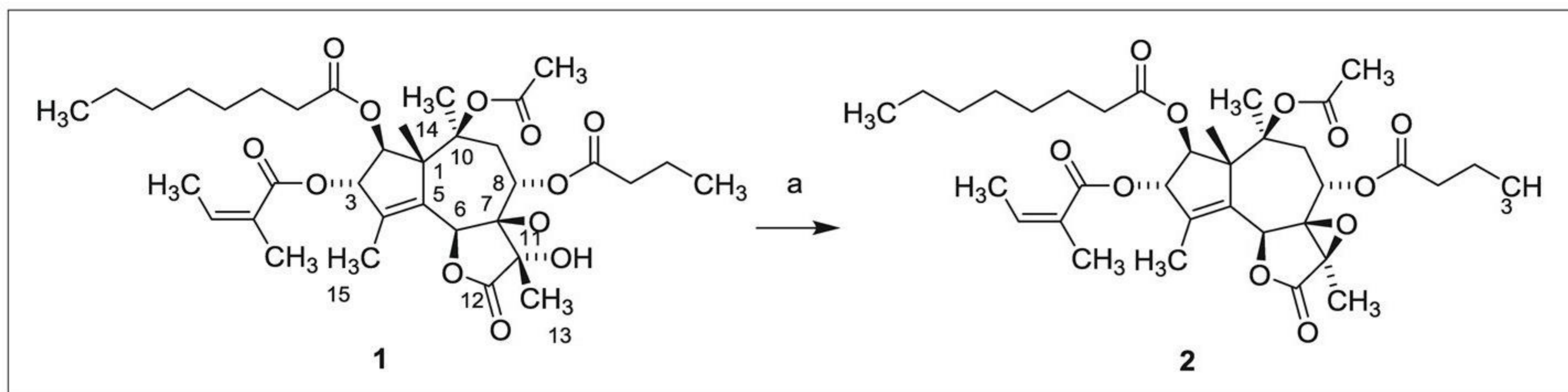
navn, da de fleste forbinder det med en forædlet dueart. Et mere passende dansk navn ville være giftgulerod.

I de arabiske lande er planten velkendt. Beduiner er meget omhyggelige med at forhindre deres kameler i at æde af planten, idet den kan fremkalde forgiftninger. Harpiks fra planten har i årtusinder været anvendt til at lindre smerter. Harpiks fra planten var optaget i den franske farmakopé frem til 1937. Harpiksen blev anvendt i medicinske plastre, der skulle lægges på huden (figur 2).

Inspireret af professor Finn Sandberg fra Uppsala Universitet begyndte vi i 1970'erne et projekt, der havde til formål at isolere, identificere og undersøge de farmakologiske effekter af plantens indholdsstoffer. Han foreslog dette som et projekt til Ulla Wagner Smitt, der gerne ville gennemføre et ph.d.-studium, så hun kunne blive lektor ved det daværende Farmakognostiske Laboratorium ved Danmarks Farmaceutiske Højskole. Tidligere forsøg var strandet på, at planten indeholder en række nært beslægtede stoffer, der ikke kunne adskilles. Da vi startede, var

omvendt fase HPLC netop blevet implementeret på instituttet. Ved at anvende denne teknik lykkedes det os i løbet af få måneder at isolere en række højpotente hudirriterende stoffer fra planten. Faktisk blev den biologiske aktivitet fulgt ved applikation af fraktionerne på huden af Ulla Smitt, en fremgangsmåde, der næppe var blevet godkendt i dag. Ved et samarbejde med Carsten Christophersen lykkedes det at fastlægge konstitutionen af molekylet, der blev navngivet thapsigargin (skema 1: 1).





Skema 1. Omdannelse af thapsigargin (**1**) til epoxidet **2** ved behandling med a:  $\text{SOCl}_2$ .

Efter mange måneders arbejde lykkedes det at fremstille et krystallinsk epoxid (**2**), der gjorde det muligt at fastlægge den relative konfiguration, undtagen ved C7 og C11, under anvendelse af røntgenkrystallografi. Omdannelsen af en vic-diol til et epoxid er en bemærkelsesværdig reaktion, som der kun findes få analoge eksempler på i litteraturen. Ved et Alfred Benzon symposium i København foreslog Koji Nakanishi, at den absolutte konfiguration skulle løses ved at anvende exciton koblingsteknikken. Efter at strukturen i alle detaljer var blevet fastlagt, blev flere nærtbeslægtede *Thapsia*-arter undersøgt for at afklare udbredelsen af denne type forbindelser. Det førte til isolering af en række analoger, der kun adskilte sig fra **1** ved acylgrupperne ved O2 og O8. Desuden ledte undersøgelserne til mange spændende nye naturstoffer, hvoraf nogle endda besad et helt nyt carbonskelet (thapsanerne). Resultaterne satte spørgsmålstejn ved taksonomien af *Thapsia*-slægten og nært beslægtede planteslægter. Først for meget nylig begyndte under-

søgelser med anvendelse af moderne DNA-baserede metoder at give tilfredsstillende svar på disse spørgsmål.

### Thapsigargin som hæmmer af den sarco-endoplasmatiske calcium ATPase

Samtidig med disse undersøgelser gennemførtes farmakologiske undersøgelser mhp. at finde en forklaring på den voldsomme hudirritation. Det blev fastslået, at thapsigargin fremprovokerer histaminfrigørelse fra mastceller, hvilket givet er en del af forklaringen på effekten. Senere blev det vist, at alle celler, der indgår i immunsystemet, og også muskelceller blev aktiveret af stoffet.

Den brede aktivitet af forbindelsen rejste spørgsmålet om det biologiske målmolekyle. Efter kraftige opfordringer tog Ole Thastrup denne udfordring op, og det lykkedes ham at fastslå, at molekylet er en selektiv hæmmer af den sarco/endoplasmatiske  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) i subnanomolære koncentrationer ▶

# FOOD TECH

Processing & Packaging  
28.-30. oktober 2014



Nordeuropas  
største fagmesse  
for fødevareteknologi

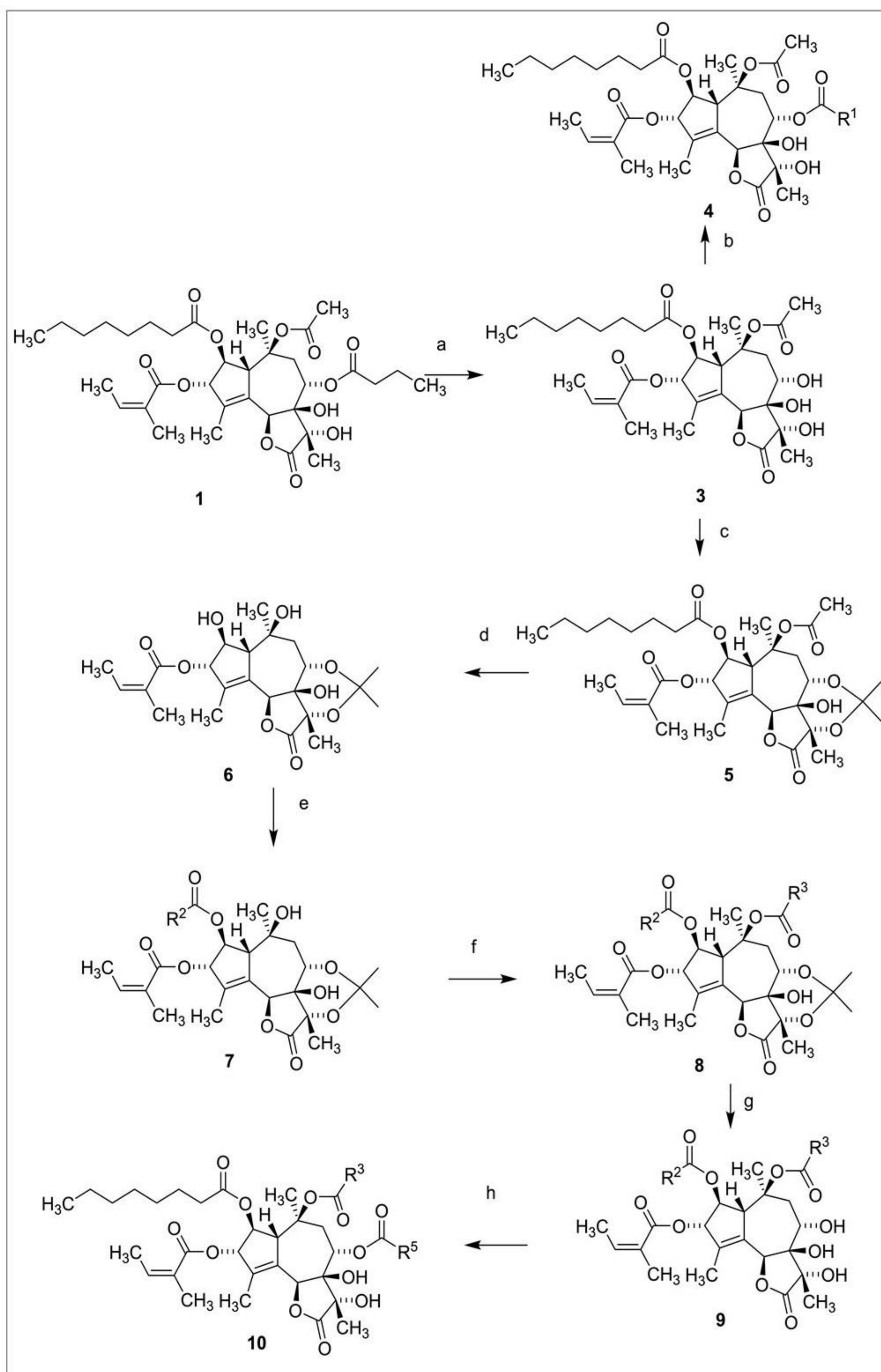


- Ny viden
- Ny teknologi
- Inspiration
- Networking

Læs mere på  
foodtech.dk







Skema 2. a:  $(C_2H_5)_3N$ , MeOH; b:  $(R^1CO)_2O$ , DMAP; c: 2,2-dimethoxypropan, pTsOH; d: KOH, MeOH; e:  $(R^2CO)_2O$ , DMAP; f:  $(R^3CO)_2O$ , DMAP; g:  $H^+$ ,  $CH_3OH$ ,  $H_2O$ ; h:  $(R^4CO)_2O$ , DMAP.

(figur 3). Dette arbejde blev senere fulgt op af mange biokemikere og farmakologer, og det har medført, at thapsigargin i dag er standardforbindelsen til undersøgelser over SERCA-pumpen (en søgning i SciFinder under ordet thapsigargin giver mere end 15.000 svar). En af de forskere, der blev inspireret af disse resultater, var John T. Isaacs. Han forudså, at en så potent hæmmer af SERCA også måtte være en stærk cellegift. Hans teorier blev bekræftet, idet forbindelsen dræbte en lang række både maligne og godartede celletyper. Celledøden skyldes blokering af SERCA-pumpen.

### Selektiv omdannelse af thapsigargin

Samtidig med at alle disse farmakologiske undersøgelser blev gennemført arbejdede vi videre med at forstå kemien af thapsigargin. Molekylet indeholder kun to forskellige funktionelle grupper, tertiære alkoholer og estergrupper. Det forekom derfor usandsynligt, at det skulle være muligt at lave selektive transformationer. Overraskende nok viste det sig, at f.eks. estergruppen ved C8 var meget mere labil end de øvrige estergrupper, således at denne selektivt kunne fjernes. I skema 2 er vist, hvorledes det har været muligt selektivt at ændre de forskellige funktionaliteter i molekylet. Endvidere blev der udviklet metoder til invertering af C3 og C8. De mange derivater af thapsigargin gjorde det muligt at opstille nogle struktur-aktivitets-korrelationer. Det blev herved fastslået, at indførelse af en lang fleksibel acylgruppe ved O8 og O2 ikke ændrede den biologiske aktivitet nævneværdigt. Derimod medførte invertering af enten C3 eller C8 et voldsomt fald i aktiviteten. Ved publiceringen af den første røntgenstruktur af SERCA-pumpen bundet til thapsigargin kunne alle disse observationer forklares. På baggrund af disse data og en GRID-analyse af bindingslommen kunne vi fremsætte et forslag til en farmakofor for thapsigargin. En farmakofor er et tredimensionalt arrangement af grupper, der medfører en farmakologisk effekt, i dette tilfælde en blokering af SERCA-pumpen. I tilfældet thapsigargin bestod farmakoforen af acetyl-, angeloyl-, butanoyl- og C15 methylgruppen (figur 3). Mhp. at verificere denne model indledte vi et samarbejde med Poul Nissen og Jesper Vuust Møller, Aarhus Universitet. Vi fremstillede en del analoger, hvis affinitet og effekt på SERCA-pumpen blev afprøvet af Jesper Vuust Møller, og røntgenstrukturen af analogen bundet til SERCA blev undersøgt af Poul

Nissen. Vores undersøgelser indikerede, at den første farmakofor-model var for simpel. Tilsyneladende er hydrogenbindinger til SERCA via vandmolekyler også væsentlige for den rigtige placering af thapsigargin i bindingslommen.

### Thapsigargin som prodrug

På dette tidspunkt var vi overbeviste om, at denne forskning var rent grundvidenskabelig. Vi havde et molekyle, der effektivt og nonselektivt slog alle celler ihjel. Det var svært at forestille sig, at dette skulle kunne anvendes som et lægemiddel. Denne



## Er dit fokus akkrediterede kalibreringer?



### Akkrediteret kalibrering af partikeltællere

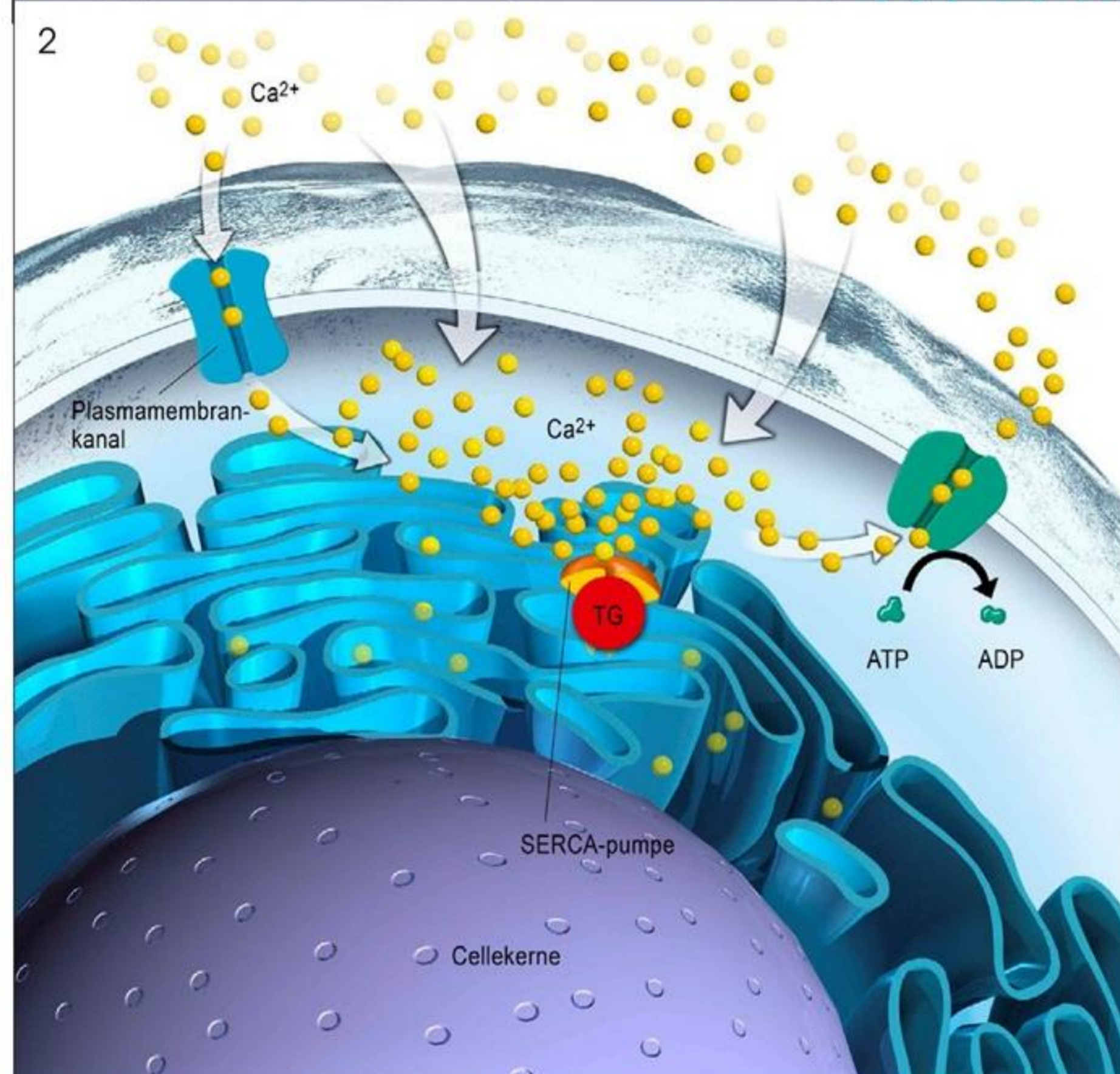
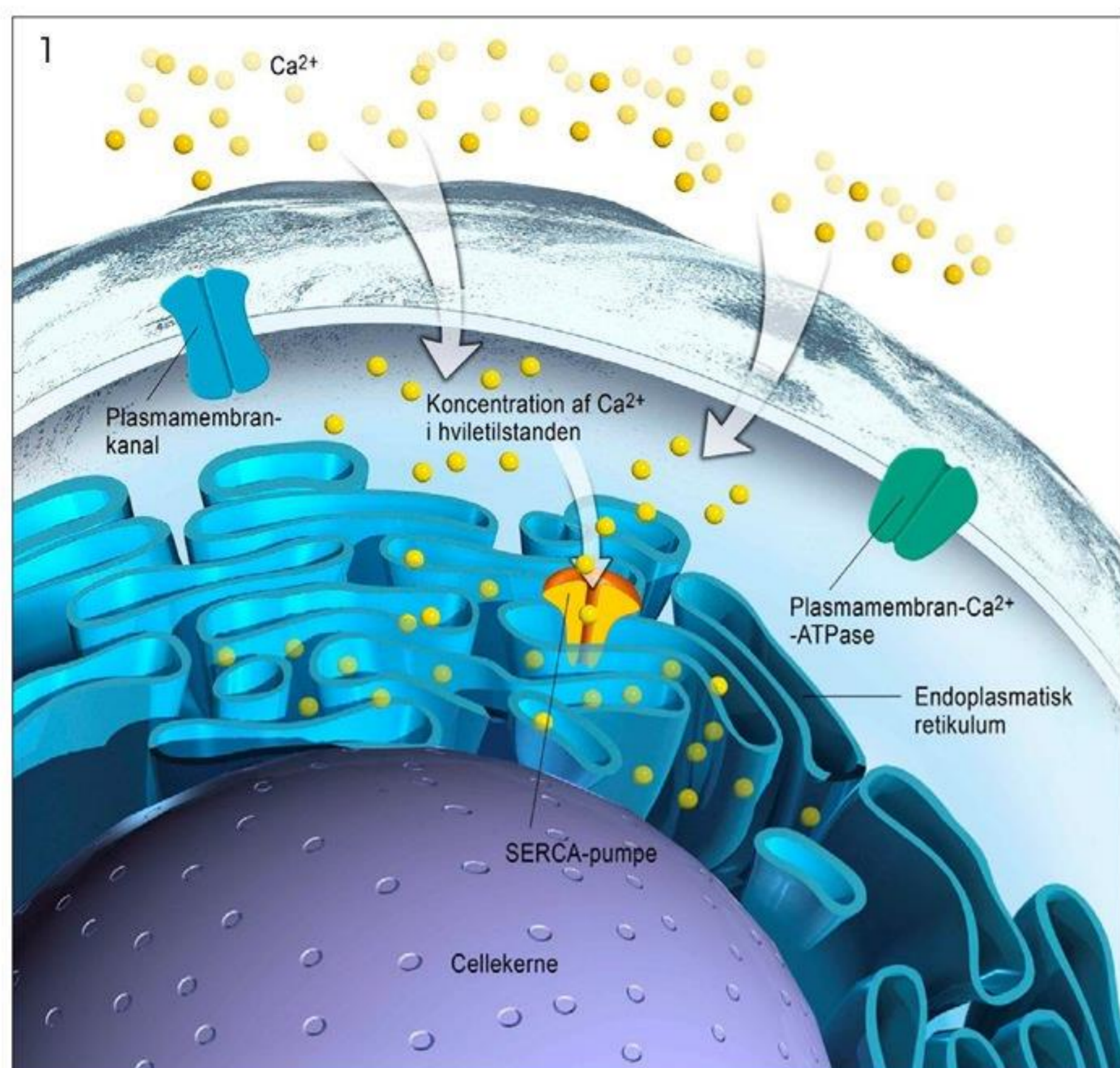


### Akkrediteret kalibrering af ledningsevnesensorer til ultra-rent vand



**G**ratist informationsmøder  
 Få viden om målemetoder, nye  
 måleopstillinger, akkrediterede ydelser,  
 nye forskningsresultater eller et indblik i  
 metrologien som en konkurrenceparameter.

Besøg [www.dfm.dk](http://www.dfm.dk) for mere  
 info om informationsmøderne.



Figur 3. Den sarco-endoplasmatiske  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA) er en P-pumpe, der ved hydrolyse af ATP til ADP opretholder en koncentrationsgradient over membranen mellem cytosol og det endo- eller sarcoplasmatiske retikulum. Hvis pumpen blokeres, f.eks. ved tilsætning af thapsigargin, er cellen ikke i stand til at opretholde en lav koncentration af  $\text{Ca}^{2+}$  i cytosol. Under normale omstændigheder vil en forøget  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentration medføre, at cellen åbner en  $\text{Ca}^{2+}$ -kanal i cellemembranen, således at  $\text{Ca}^{2+}$ -ioner kan trænge ind i cellen ad andre veje. I første omgang forsøger cellen at modvirke effekten af en vedvarende høj  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentration i cytosol ved at aktivere plasmamembran ATPasen, men denne pumpe kan ikke over flere timer opretholde den fornødne gradient. Derfor vil en vedvarende blokering af SERCA medføre, at cellen efter nogen tid begår selvmord (apoptosis).

vildfarelse blev dog korrigeret af en telefonopringning fra John Isaacs (Johns Hopkins University, Baltimore). Han havde sammen med Samuel R. Denmeade og Hans Lilja observeret, at flere cancerceller eller nydannede blodkar i cancertumorer danner enzymer med en usædvanlig substratspecificitet. Han foreslog et forskningssamarbejde, hvor vi skulle designe og



fremstille analoger af thapsigargin, som kunne konjugeres med peptider. De herved fremstillede prodrugs skulle spaltes af proteolytiske enzymer, der var karakteristiske for kræftceller eller tumorer. Et prodrug er en forbindelse, der i sig selv ingen biologisk aktivitet har, men som spaltes i patienten ved f.eks. kræftceller, hvorved der frigøres et aktivt lægemiddel, i dette tilfælde en cellegift. En i denne sammenhæng god egenskab ved thapsigargin er, at dette stof er så lipofilt, at det omgående vil blive optaget i det væv, hvor det er frigivet fra prodrugget. Thapsigargin er yderligere interessant i denne sammenhæng, fordi det er så cytotoxisk, at det kan dræbe de nærliggende celler, selvom det er en begrænset mængde cellegift, der frigøres fra prodrugget. To af enzymerne, prostate specific antigen (PSA) og prostate specific membrane antigen (PSMA), havde de ønskede egenskaber. PSA udskilles fra prostataceller og prostatakæftceller og kan derfor anvendes til at målrette lægemidler mod prostatakæft. Denne kræftform udvikler sig meget langsomt. Derfor kan de fleste kemoterapeutika ikke anvendes, idet deres selektivitet beror på, at kræftceller deler sig hurtigt og derfor er mere følsomme over for stoffer, der hæmmer celledeling. PSA er kun aktivt i umiddelbar nærhed af de celler, der udskiller det, da det proteinbindes i blodet og derfor inaktiveres. Da PSA også vil spalte G115 (figur 4) i prostata vil dette medføre, at også celler i prostata dræbes. Da mænd, der får prostatakæft, typisk er ældre mænd med forstørret prostata vurderes dette ikke at være et problem.

PSMA er til trods for navnet ikke specifikt for prostata, men sidder på endotelceller i de nydannede blodkar (de neovaskulære celler) i mange tumorer. Ødelæggelse af disse blodkar vil kvæle tumoren. Denmeade og Lilja udviklede peptider, der selektivt spaltes af PSA eller PSMA.

Vores del af projektet bestod i at designe og fremstille et derivat af thapsigargin, der kunne konjugeres med de udviklede peptider. Vi vidste, at en fleksibel gruppe ved O8 ikke ville nedsætte aktiviteten væsentligt. Samtidig havde vi udviklet kemien, så vi selektivt kunne indføre en lang aminoacyl gruppe ved O8 (skema 2). Studier af PSA og PSMA viste, at det aktive sted i enzymerne lå inde i enzymet. Molekylerne blev tilføjet en lang linker, for at den peptidbinding, der skulle spaltes, kunne

nå ind til det aktive sted. Det tricykliske skelet i thapsigargin forventedes ikke at kunne trænge ind i enzymet. På basis af disse overvejelser blev de to prodrug G115 og G202 fremstillet. *In vitro*-forsøg viste, at G115 var et substrat for PSA, og at G202 hurtigt blev spaltet af PSMA (figur 4). Ved inkubering af celler med de to forbindelser kunne det vises, at G115 kun kunne dræbe celler, der dannede PSA. G202 kunne ligeledes kun dræbe celler, der lavede PSMA.

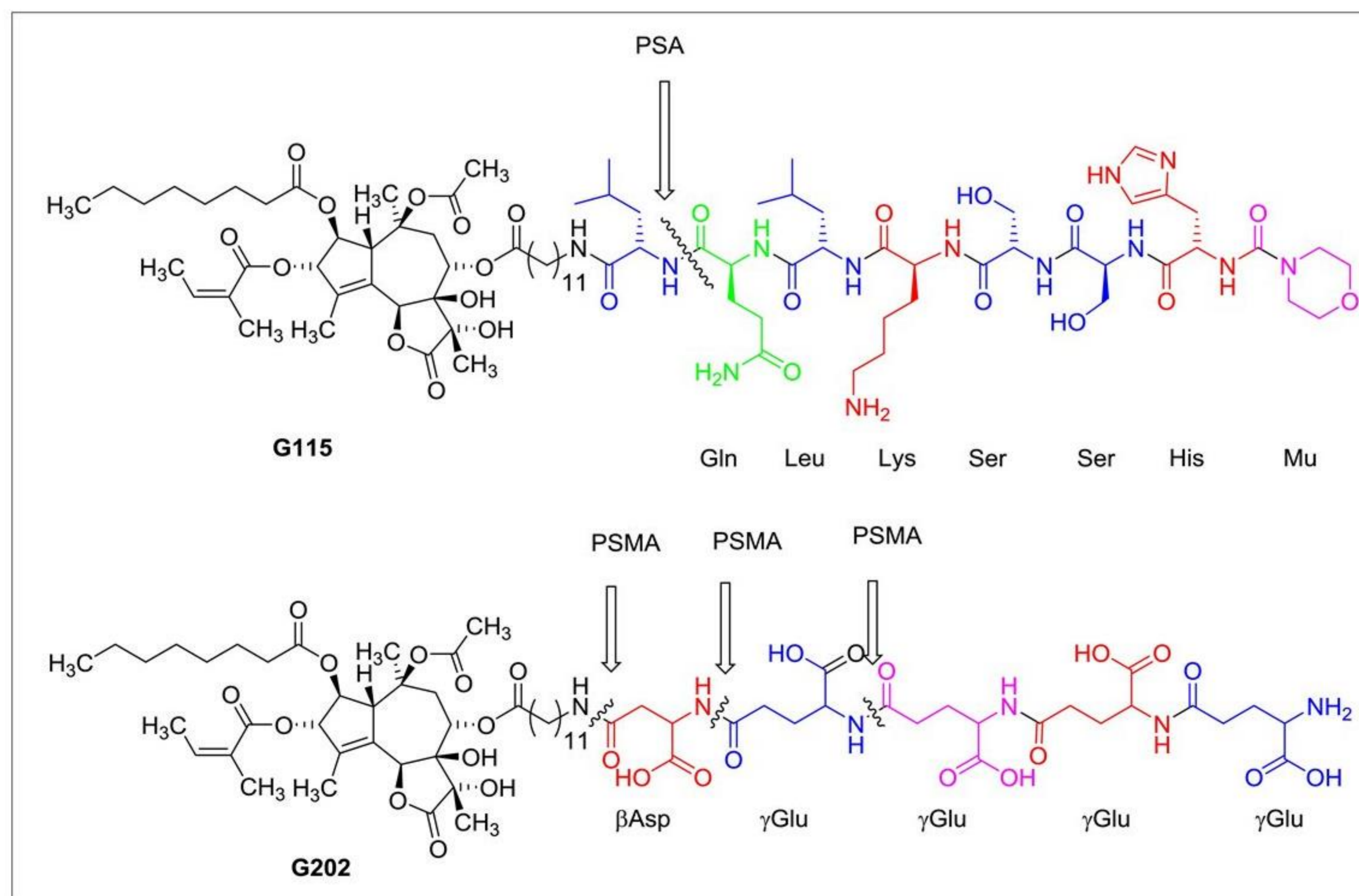
## Studier i dyremodeller

Denmeade og Isaacs har en række dyremodeller, hvori de to stoffer kunne afprøves. F.eks. kan tumorer inokuleres på nøgne mus. Ved behandling af disse tumorer med G115 og G202 observeredes, at i behandlede mus svandt tumorerne ind, hvori-mod de groede uhindret på ubehandlede mus. Et andet lovende resultat fra museforsøgene var, at prodrugene kun spaltedes i tumorerne. Dette resultat kunne bekræftes i abeforsøg, hvor de to prodrug ikke blev nedbrudt. Dette resultat var vigtigt, idet det viste, at prodrugene ikke ville frigøre cellegiftene ukontrolleret i organismen. Det konkluderedes derfor, at de kun ville påvirke kræftceller.

## Kliniske forsøg

På et tidligt tidspunkt i udviklingen af disse prodrug var Craig Dionne blevet interesseret i projektet. Han stiftede firmaet GenSpera og skaffede venture-kapital, så der dels kunne tages patenter på ideerne i projektet og dels kunne planlægges kliniske forsøg. Da alle prækliniske forsøg forløb med tilfredsstillende resultater, blev der indleveret en ansøgning til FDA om at gennemføre forsøg på mennesker. Denne ansøgning blev imødekommet i 2009. Pga. begrænsede ressourcer blev det i første omgang besluttet at fokusere på G202.

I klinisk fase 1 fik en række patienter med uhelbredelige kræftsygdomme injiceret G202. I begyndelsen fik patienterne kun meget små doser, men over ca. 1 år blev doserne forøget, indtil de havde en størrelse, hvor man ville forvente at se en effekt. Til trods for at disse forsøg var designet mhp. at se, om der kom uacceptable bivirkninger af stoffet, blev der faktisk observeret en effekt i nogle patienter med leverkræft. Da leverkræft



Figur 4. Strukturerne af de udviklede prodrugs: **G115** spaltes selektivt af prostate specific antigen og er derfor designet til at anvendes mod prostatakæft. **G202** spaltes af prostate specific membrane antigen og er designet til at spaltes i neovaskulært væv i tumorer. Det er i figuren angivet, hvor de to enzymer fortrinsvis vil spalte de to prodrug. Det fraspaltede thapsigarginderivat er så lipofilt, at det penetrerer cellemembranen i de celler, der er i nærheden, blokerer SERCA og derved dræber cellen. Bemærk at i peptidet i G202 er peptidbindingerne dannet mellem  $\beta$ - eller  $\gamma$ -carboxylsyernerne i hhv. asparaginsyre og glutaminsyre.



er en af de kræfttyper, hvor der dannes PSMA i tumorerne, bekræftede dette resultat den opstillede hypotese for virkningsmekanismen af G202. Det antal patienter, der udviste en positiv effekt, er imidlertid så lille, at der ikke kan drages holdbare konklusioner. Det positive resultat ved forsøget var, at ingen patienter fik uacceptable bivirkninger ved terapeutisk interessante doser. Forsøgene bliver i øjeblikket gentaget i et klinisk fase 2 forsøg, hvor forsøget gennemføres på et så stort antal patienter, at der vil kunne drages holdbare konklusioner vedrørende den helbredende effekt.

En anden ondartet kræftform er glioblastoma multiforme (en form for hjernekræft, hvor kun 30% af patienterne lever 1 år efter at diagnosen er stillet og efter 5 år kun 3%). Der er også påvist PSMA i neovaskulært væv i tumorer fra sådanne patienter. Mange kemoterapeutika kan ikke anvendes i centralnervesystemet, da de ikke kan passere blod-hjerne-barrieren. Virkningsmekanismen for G202 er derfor interessant, idet det ikke vil være nødvendigt for dette molekyle, at passere blod-hjerne-barrieren, da stoffet forventes at kvæle tumoren ved at ødelægge blodkarrene. De kliniske forsøg mod hjernekræft blev startet her i foråret 2014.

### Konklusion

Fyrre års arbejde med thapsigargin har ført til en lægemiddelkandidat, der i øjeblikket afprøves i klinikken som potentielt lægemiddel. Det helt åbenbare spørgsmål er: har vi været heldige? Vi var heldige! Men det at være heldig er ikke nok for at lave god forskning. Man skal også opdage, at man har været heldig og være indstillet på at forfølge sit held. En ren grundvidenskabelig undersøgelse af en effekt af en plante førte til et molekyle med egenskaber, der kunne anvendes til udvikling af et lægemiddel. Det der primært adskiller dette projekt fra andre, jeg kender til, var, at vi, da vi opdagede, at vi havde en potent stof, fortsatte vore undersøgelser mhp. dels at forstå struktur-aktivitetssammenhænge og dels at forstå stoffets kemi. Samtidig lykkedes det os at engagere andre i projektet, således at virkningsmekanismen for stoffet blev afklaret. Vi fik etableret et samarbejde med røntgenkristallografer og computational chemists, så vi kunne bekræfte vores opstillede modeller for farmakoforer. Endelig kom vi i kontakt med onkologer, der kunne opstille arbejdshypoteser, så vi kunne fremstille stoffer med et lægemiddelpotentiale. Kronen på værket blev samarbejdet med en person fra medicinalindustrien, der vidste 1) hvorledes opdagelserne skulle patenteres, så opfindelsen kunne danne basis for et lægemiddel, 2) hvorledes man skulle etablere en biotek-virksomhed, således at stoffet kunne formuleres i en lægemiddelform, som 3) kunne indsamle de prækliniske data, der skal overbevise myndighederne om, at stoffet kan og bør afprøves klinisk, og som 4) kunne skaffe kapital til de kliniske studier. Fra at have været et grundvidenskabeligt projekt udviklede det sig til at blive et interdisciplinært projekt, der involverede kemikere, farmakologer, onkologer, strukturkemikere og ikke mindst personer med indblik i, hvorledes data indsamles og ressourcer skaffes, så kliniske forsøg kan gennemføres. Umiddelbart kunne dette projekt så bekræfte de vinde, der blæser i øjeblikket, at al forskning skal gøres tværvideenskabelig og strategisk. Min konklusion er den modsatte. Dette projekt lykkedes, fordi der var involveret en række personer, der hver for sig var dybt specialiserede, og som var indstillet på at samarbejde interdisciplinært. Min konklusion er ikke, at alle skal uddannes, så de kan lidt af hvert, men at vi tværtimod skal uddanne højt specialiserede personer. Jeg er dybt bekymret over den tendens, der er fremherskende i gymnasier og på universiteter, at alle skal være tværvideenskabelige. Det er vigtigt, at forskellige discipliner kan samarbejde, men et samarbejde

kan kun føre til gode resultater, hvis de personer, der samarbejder, hver har en dybdegående ekspertise inden for hver deres relevante felt.

### Yderligere information:

Resultaterne fra dette projekt er publiceret i et stort antal artikler. Nogle oversigtsartikler er:

1. Christensen, S. B.; Andersen, A.; Smitt, U. W. Sesquiterpenoids from *Thapsia* Species and Medicinal Chemistry of the Thapsigargin. *Progr. Chem. Natl. Prod.* **1997**, *71*, 131-167.
2. Christensen, S. B.; Skytte, D. M.; Denmeade, S. R.; Dionne, C.; Møller, J. V.; Nissen, P.; Isaacs, J. T. A Trojan Horse in Drug Development: Targeting of Thapsigargin Towards Prostate Cancer Cells. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 276-294.
3. Denmeade, S. R.; Mhaka, A. M.; Rosen, D. M.; Brennen, W. N.; Dalrymple, S.; Dach, I.; Olesen, C.; Gurel, B.; Demarzo, A. M.; Wilding, G.; Carducci, M. A.; Dionne, C. A.; Møller, J. V.; Nissen, P.; Christensen, S. B.; Isaacs, J. T. Engineering a prostate-specific membrane antigen-activated tumor endothelial cell prodrug for cancer therapy. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 140ra86.

En let tilgængelig video, der viser virkningsmekanismen for G202, kan findes på [GenSpera.com](http://GenSpera.com), Investors, Presentations, The GenSpera story.

E-mail

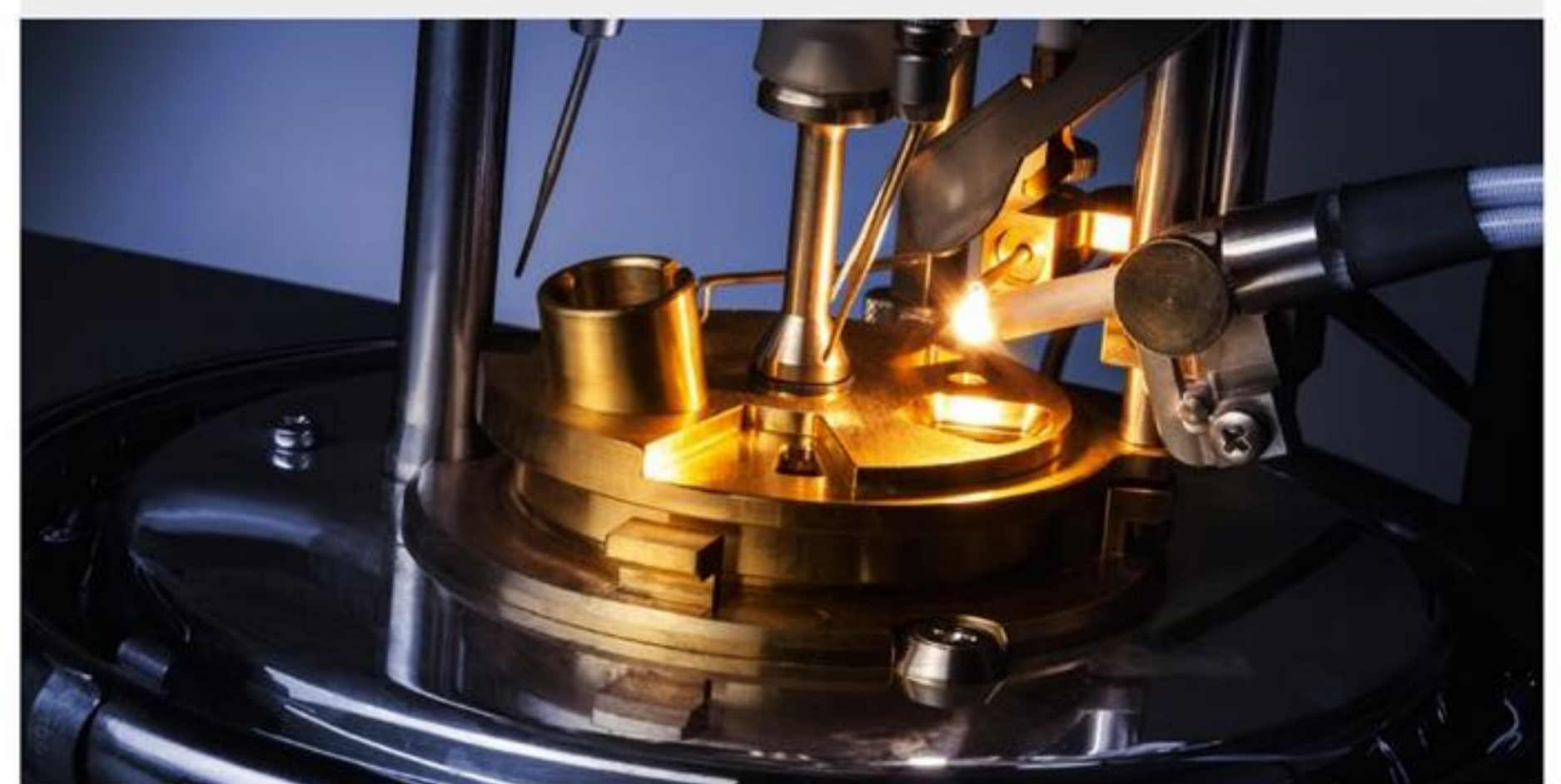
Søren Brøgger Christensen: [soren.christensen@sund.ku.dk](mailto:soren.christensen@sund.ku.dk)



**Anton Paar**

## PMA 5 - Safe & Convenient Flash Point Detection

The automatic closed cup Pensky-Martens flash point tester improves user and lab safety by an integrated fire extinguishing system.



[info.dk@anton-paar.com](mailto:info.dk@anton-paar.com) | [www.anton-paar.com](http://www.anton-paar.com)