

Problematiske proteiner

Proteiner er en af de stofgrupper, der har størst potentiale som fremtidens lægemidler. Men proteiner er af natur grænsefladeaktive, hvorfor det ikke altid er en nem opgave at formulere dem som lægemidler

Af cand.pharm., ph.d.-stud. Susanne Møllmann¹, ph.d. Jens Thostrup Bukrinsky², professor, ph.d. Sven Frøkjær¹ og ph.d. Ulla Elofsson³

¹Danmarks Farmaceutiske Universitet, ²Novo Nordisk A/S, ³Ytkemiska Institutet AB

At lave en simpel tablet med et protein som lægemiddelstof er oftest umuligt. Proteiner nedbrydes i mave-tarmkanalen, og tabletten er derfor uvirksom, hvis den indtages oralt (gennem munden). I stedet indgives langt de fleste proteiner i dag parenteralt (ved injektion), som det f.eks. er tilfældet for insulin.

Proteiner formuleres som en opløsning, som en suspension eller som et frysetørret lægemiddel beregnet til rekonstitution før anvendelse. Mange af de proteiner, der i dag bruges som lægemidler, er stoffer kroppen selv danner (f.eks. enzymer eller hormoner), og lægemidlerne har derfor selv ved lave koncentrationer en meget specifik virkning. Fordi der anvendes lave koncentrationer, er det væsentligt, at patienten får den tilsigtede mængde lægemiddelstof, og at proteinet er biologisk aktivt. Derfor gøres der ved udvikling af lægemidlet store anstrengelser for at sikre tilgængeligheden af den rette mængde aktivt protein på rette sted. Arbejdet kan vanskeliggøres af, at proteiner generelt har dårlig kemisk og fysisk stabilitet i opløsning, men også af interaktionen med f.eks. emballage og andre grænseflader. For injektionspræparater er der flere problematiske grænseflader i det færdige produkt: mellem væske og emballage og mellem væske og luft. Interaktion med grænsefladerne kan ændre proteinets fysiske stabilitet, og det er årsagen til, at adsorption af proteiner ikke er et velset fænomen i udviklingen af nye lægemidler.



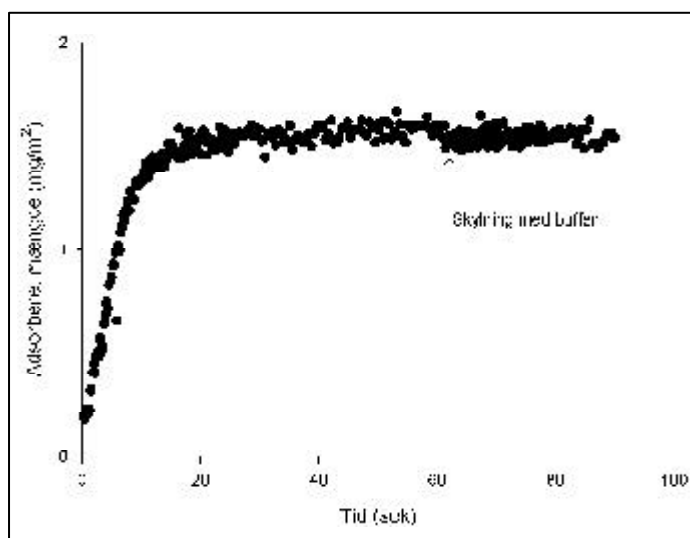
Figur 1. Skematisk oversigt over ellipsometerets opbygning.

Proteinadsorption til grænseflader

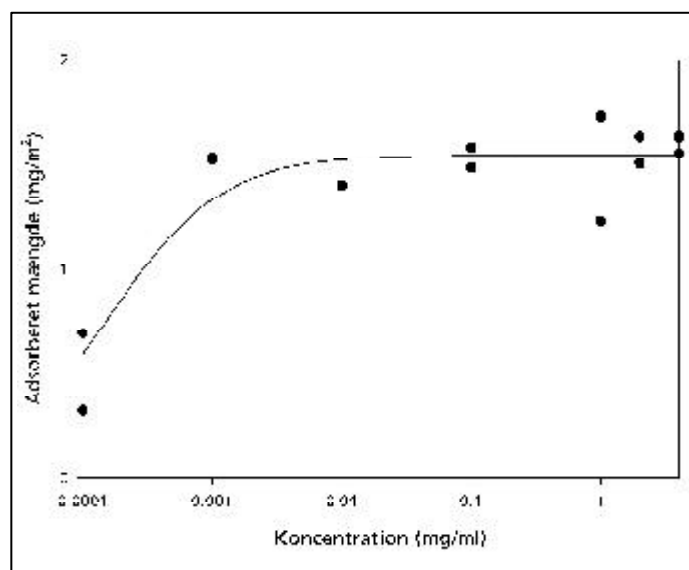
En grænseflade opstår, når to forskellige faser kommer i indbyrdes kontakt. For at nedsætte grænsefladespændingen mellem de to faser søger proteiner i opløsning under mange omstændigheder mod sådanne grænseflader og akkumulerer sig her (adsorption). Det skyldes, at proteiner er amfifile stoffer med både hydrofile og hydrofobe aminosyrer. Interaktionen mellem protein og grænseflade er normalt stærkest ved meget hydrofobe grænseflader som luft, silicone eller teflon. Ladninger på hhv. protein og grænseflade spiller dog også en afgørende rolle for, hvor stærk interaktionen er [1].

Udfoldning og aggregering

I forbindelse med adsorptionen kan der ske strukturelle ændringer i proteinet, f.eks. når det udfoldes, som følge af interaktionen med grænsefladen. Herved kan proteinets sekundære og tertiære struktur ændres, hvilket ofte fører til ændringer i den biologiske aktivitet [2]. I værste fald kan udfoldning af nogle få proteiner på en grænseflade have autokatalytisk virkning på resten af proteinerne i opløsningen, så størsteparten af molekylerne ændrer struktur inden for kort tid. Det kan i sidste ende føre til dannelse af større aggregater af proteiner. Aggregater er uønskede i lægemidler til injektion, ikke blot fordi de ofte er biologisk inaktive, men også fordi de kan tilstoppe nåle og katetre. Det kan desuden give anledning til bivirkninger, f.eks. ved at kroppens immunforsvar aktiveres som reaktion på den ukendte form af proteinet. Det vil være en katastrofe for en person med diabetes.



Figur 2. Adsorption af 0,001 mg/ml human insulin målt ved ellipsometri.



Figur 3. Adsorptionsisoterm for human insulin.

Studier af proteinadsorption

Undersøgelser af proteiners adsorption til grænseflader involverer ret specielle optiske teknikker.

En af disse teknikker er ellipsometri, hvor ændringen i polariseringen af elliptisk polariseret lys efter refleksion fra en overflade måles (figur 1). Polariseringen af lyset afhænger af den overflade, lyset reflekteres fra, idet brydningsindekset er forskelligt for overflader med og uden protein. Ændringen i polarisering kan omsættes til et kvantitativt mål for mængden af adsorberet protein. I figur 2 ses en ellipsometri-måling af insulinadsorption til en teflon-lignende overflade ved pH 7,4. Adsorptionen forløber meget hurtigt, hvilket tyder på, at insulin har høj affinitet til overfladen. Efter ca. 15 min øges mængden af adsorberet protein ikke yderligere, hvilket svarer til, at der ikke er mere insulin tilgængeligt i opløsningen, eller at der er opstået en ligevægt mellem adsorberet og frit insulin. Efter 60 min skylles med buffer, og det giver ikke anledning til nogen desorption. Det indikerer, at insulinen er irreversibelt bundet til overfladen, og at ligevægten i så fald er forskudt mod den adsorberede form.

Figur 3 viser en adsorptionsisoterm for human insulin. Ved koncentrationer på 0.1 mg/ml eller derover nås en plateauværdi for adsorptionen svarende til ca. 1.5 mg/m². Den opnåede plateauværdi formodes at svare til et enkelt lag insulin.

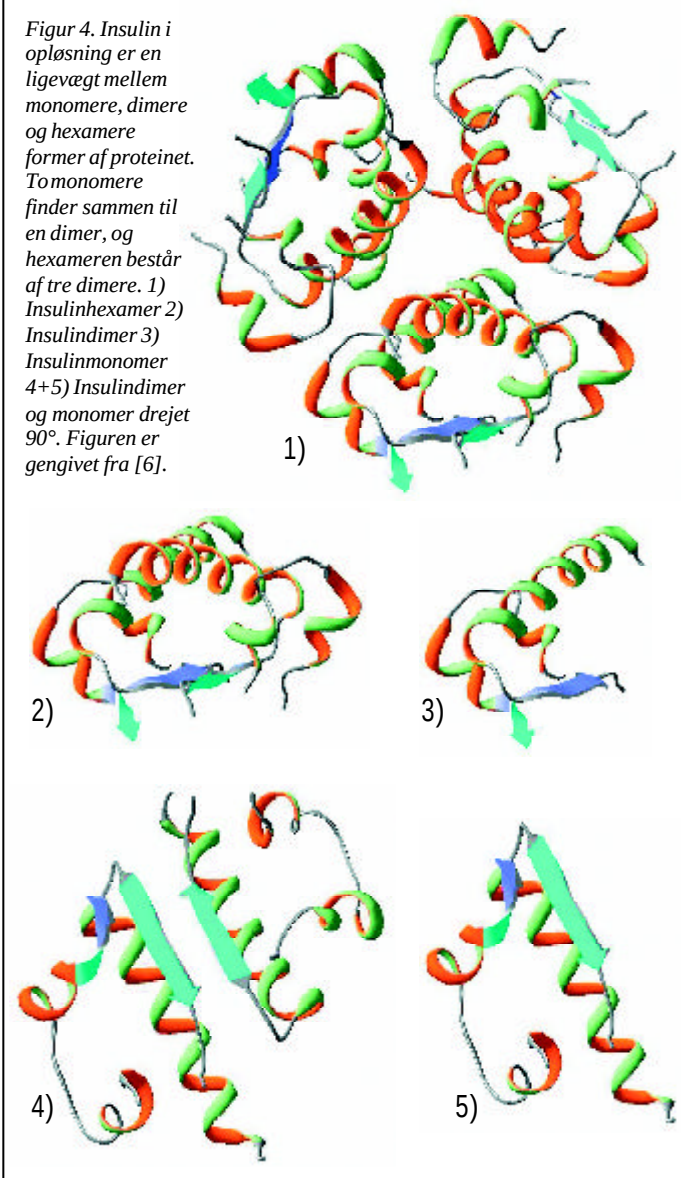
Insulin i opløsning er en ligevægt mellem monomere, dimere og hexamere former af insulin (figur 4). Monomeren er den mest hydrofobe form, fordi hydrofobe aminosyrer eksponeres på overfladen. Denne er der dog relativt lidt af i en opløsning, da monomere hurtigt finder sammen og danner dimere, fordi det er energimæssigt mere favorabelt. Hexameren er den mest hydrofile form, da de hydrofobe aminosyrer gemmes i kompleksets indre. I en vandig opløsning ved neutral pH er hexameren pga. beskyttelsen af de hydrofobe aminosyrer den mest stabile form. Derfor er det sandsynligt, at det primært er monomer- eller dimerformen af insulin, som adsorberes til grænseflader (figur 5) [3]. Ved beregning kan det vises, at monolag af de forskellige former svarer til 1.1 mg/m², 2.2 mg/m² og 2.7 mg/m² for monomere, dimere og hexamere former (figur 5) [4]. Beregningerne beror dog på den antagelse, at der ikke sker en udfoldning af insulin på overfladen. Målingerne er i overensstemmelse med antagelsen om, at monomer- og dimerformen adsorberes i størst mængde til overfladen. Med et større kendskab til adsorptionsmekanismen kan man målrette indsatsen for at forhindre insulinadsorption.

Hvordan forhindres proteinadsorption?

Proteinadsorption har været kendt helt tilbage til forrige århundrede, men da proteiner er meget forskellige, har det endnu ikke været muligt at opstille generelle regler for proteinadsorption, og det samme gælder for de optimale omstændigheder til forhindring af adsorption.

Tidligere brugte man ofte et overskud bovint serum albumin (BSA, serum albumin fra kvæg) til at coate faste overflader, som f.eks. glas, med. BSA er et protein, der har stor affinitet for overflader, og det konkurrerer derfor med det protein, der

Figur 4. Insulin i opløsning er en ligevægt mellem monomere, dimere og hexamere former af proteinet. Tomonomere finder sammen til en dimer, og hexameren består af tre dimere. 1) Insulinhexamer 2) Insulindimer 3) Insulinmonomer 4+5) Insulindimer og monomer drejet 90°. Figuren er gengivet fra [6].



ønskes anvendt som lægemiddel, om at adsorbere til overfladen. Efter man blev opmærksom på, at der igennem BSA er en teoretisk risiko for at overføre BSE fra kvæg, har man dog forsøgt at substituere BSA med andre hjælpestoffer.

En anden mulighed for at forhindre adsorption, der fungerer efter samme princip som BSA, er brugen af surfaktanter. Hjælpestofferne har en høj grænsefladeaktivitet og er derfor effektive til at fortrænge proteiner fra grænseflader. Kun ganske få surfaktanter er i dag godkendt til brug i lægemidler. Ønsker man at anvende surfaktanter, der endnu ikke er godkendt, skal der af hensyn til patientsikkerheden, gennemføres omfattende toksikologiske studier på stoffet før en eventuel godkendelse. Da stofferne også skal være kompatible med andre hjælpestoffer og lægemidlets emballage, er der ofte kun få frihedsgrader for valget af surfaktanter.

Ud fra ellipsometri-målinger, der medvirker til at give en bedre forståelse af mekanismen for adsorptionsprocesser, kan man udlede nye formuleringsalternativer for specifikke proteiner. F.eks. kan det opklares hvilke materialeegenskaber, der er specielt kritiske for lige netop det protein, der benyttes. Det giver mulighed for mere kompetente valg mht. f.eks. emballage. Det kunne f.eks. være mere hydrofile materialer med samme ladning som proteinet.

Specielt for insulin giver resultaterne en anden løsningsmulighed, der tager udgangspunkt i viden om, at det formentlig er



monomer- og dimerformen af insulin, som primært adsorberes. Resultaterne indikerer, at hvis det var muligt at forskyde ligevægten mellem de forskellige former af insulin mod den mere stabile hexamer, kunne det sandsynligvis mindske adsorptionen. Rent faktisk har insulin bindingssteder for forskellige ligander (f.eks. zink-ioner og phenol), der stabiliserer insulinhexameren, og nye hjælpstoffer kan derfor identificeres vha. ellipsometri.

Ellipsometri

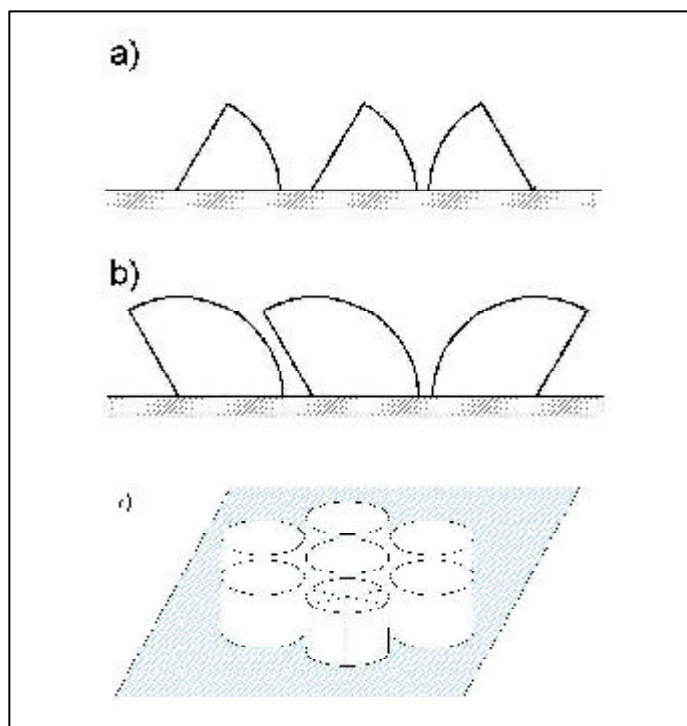
Når lys reflekteres fra en overflade, ændres polariseringen af lyset. Ved at måle på ændringen i polariseringen er det muligt at få informationer om overfladens optiske egenskaber.

Der er flere metoder til at måle på ændringen i polarisering. En af disse er nul-ellipsometri, for hvilken den eksperimentielle opstilling er angivet i figur 1.

Lys med bølglængden 4015 Å fra en Xenon-lampe passerer gennem en polarisator, hvorved lyset bliver lineært polariseret. Vha. kompensatoren laves et fase-skift, så man får elliptisk polariseret lys. Når lyset reflekteres fra overfladen induceres en ændring i polariseringen (både i fase og amplitude). Denne ændring kompenseres der for med polarisatoren, så det reflekterede lys også er lineært polariseret. Det reflekterede lys minimeres nu af analysatoren, så mindst muligt lys når detektoren, derfor navnet nul-ellipsometri. Ud fra målingerne beregnes det adsorberede lags refraktive index og tykkelse. Disse værdier kan bruges til at beregne massedensiteten på overfladen vha. forskellige beregningsmodeller. Metoden er meget følsom og kan detektere protein på overflader ned til µg-skala [5].

En af teknikens ulemper er kravene til de anvendte overflader. De skal helst ikke være transparente, skal have gode optiske egenskaber i form af god refleksion af lys, og de skal være meget ensartede. Selv små ujævnheder på overfladen giver større usikkerhed på målingerne.

Normalt anvendes spejlblanke silicaoverflader til målingerne. De opfylder ovenstående krav, samtidig med at det er muligt at modificere silica med et væld af polymerer, så overfladens fysiske egenskaber ligner det materiale, man oprindeligt ønskede data for.



Figur 5. Modeller for insulins adsorption til overflader. a) adsorberet insulinmonomer. b) adsorberet insulin dimer. c) adsorberet insulinhexamer. Figuren er modificeret fra [4].

E-mail-adresse:

Susanne Møllmann: smnh@novonordisk.com

Referencer

1. Norde, W. and J. Lyklema. 1991. Why proteins prefer interfaces. *J Biomater Sci Polym Ed* 2:183-202.
2. Maste, M.C., W. Norde, and A.J. Visser. 1997. Adsorption-induced conformational changes in the serine proteinase savinase: A tryptophan fluorescence and circular dichroism study. *J.Coll.I.S.C.* 196:224-230.
3. Nilsson, P., T. Nylander, and S. Havelund. 1991. Adsorption of insulin on solid surfaces in relation to the surface properties of the monomeric and oligomeric forms. *J.Coll.I.S.C.* 144:145-152.
4. Arnebrant, T. and T. Nylander. 1988. Adsorption of insulin on metal surfaces in relation to association behaviour. *J.Coll.I.S.C.* 122:557-566.
5. Elwing, H. 1998. Protein absorption and ellipsometry in biomaterial research. *Biomaterial* :397-406.
6. Smith, G. D., Ciszak, E., Magrum, L. A., Pangborn, W. A., Blessing, R. H.: R6 Hexameric Insulin Complexed with M-Cresol or Resorcinol *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 56 pp. 1541 (2000). Pdb entry 1ev6.pdb

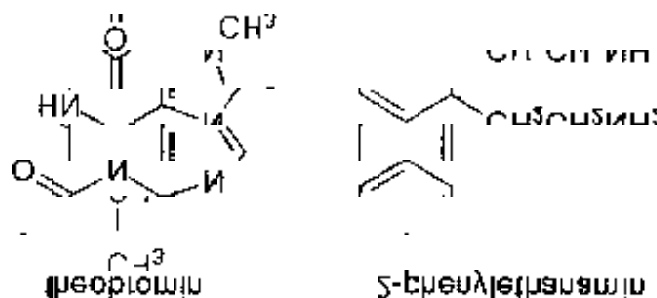
Nyt om...

hunden - menneskets bedste ven

At stryge familiens hund beroliger tydeligvis den stressede forretningsmand, men beroliger det også hunden? En sydafrikansk forsker udtog blodprøver af hund og menneske under strygningen. Det viste sig, at koncentrationen af stoffer, der indikerer »en lykkelig, afslappet sindstilstand«, fordobledes hos begge. Han konstaterede også, at koncentrationen steg af 2-phenylethanamin (β-phenethylamin), der menes, at være et pheromon for kvinder. Det findes bl.a. i chokolade.

Hunde kan imidlertid ikke tåle chokolade i større mængder pga. dens indhold af theobromin. Så klø hunden og giv chokoladen til pigen.

Carl Th.



Neurophysiological Correlates of Affiliative Behaviour between Humans and Dogs, *Veterinary Journal*, 165, 2003, side 296

