

Uw cliënt is een farmaceutisch bedrijf dat zich bezig houdt met het ontwikkelen en het verkopen van preparaten voor geneesmiddelen met verlengde afgifte. Uw cliënt vraagt u een set conclusies en een beschrijving op te stellen, die samen een octrooiaanvraag vormen, welke octrooiaanvraag in het licht van de bijgaande stand der techniek direct verleenbaar moet zijn.

Geneesmiddelen voor intraveneuze toediening of voor toediening met een infuus bestaan meestal uit een oplossing of een suspensie van de werkzame stof in water, in een fysiologisch aanvaardbare zoutoplossing of buffer, of in een fysiologisch aanvaardbare olie (zoals een plantaardige olie, bijvoorbeeld sesamolie).

Dergelijke gebruikelijke preparaten vertonen geen verlengde afgifte. De maximale concentratie van de werkzame stof in de bloedsomloop wordt direct na het toedienen bereikt. Deze concentratie neemt vervolgens af naarmate de werkzame stof door de lever wordt afgebroken en/of door de nieren wordt verwijderd, en valt doorgaans binnen enkele uren terug tot onder het niveau waarbij de gewenste geneeskundige werking wordt verkregen.

Wanneer men de gewenste geneeskundige werking gedurende langere tijd (bijvoorbeeld meerdere dagen) in stand wil houden, dan moeten deze gebruikelijke preparaten een of meerdere malen per dag worden geïnjecteerd, of anders continu worden toegediend, bijvoorbeeld met een infuus. Dit vormt een zware belasting voor de patiënt.

Bij preparaten voor verlengde afgifte wordt de werkzame stof van het geneesmiddel ingesloten in een drager voor verlengde afgifte, zoals een gel, een polymere matrix of een liposoom. Nadat een dergelijk preparaat aan een patiënt is toegediend, meestal als een intraveneuze injectie of met een infuus, wordt de werkzame stof langzaam uit de drager aan de bloedsomloop afgegeven, bijvoorbeeld gedurende een periode van twee tot vier weken. Hierdoor wordt een langdurige werking van het geneesmiddel verkregen, vergeleken met het toedienen van de werkzame stof zonder de drager.

Preparaten voor verlengde afgifte hoeven derhalve slechts een maal per week of een maal per maand te worden toegediend. Dit is aanzienlijk minder belastend voor de patiënt.

Een nadeel van de bekende preparaten voor verlengde afgifte is dat het soms niet eenvoudig is om de werkzame stof goed in de drager op te nemen. Hierdoor is het soms moeilijk om deze bekende preparaten te bereiden.

Een andere belangrijke overweging voor preparaten met verlengde afgifte - naast de verlengde werking en het gemak van bereiden - is de houdbaarheid. Farmaceutische preparaten voor verlengde afgifte moeten namelijk gedurende enige weken of enige maanden kunnen worden bewaard zonder dat de werkzame stof uit de drager “lekt”, waardoor de gewenste verlengde werking verloren zou gaan. Deze “stabiliteit onder opslag” is essentieel voor een handelsproduct dat na het bereiden ervan in een
 10 farmaceutische fabriek naar een apotheek of ziekenhuis moet worden vervoerd en daar vaak nog enige tijd wordt bewaard, voordat het wordt gebruikt.

Uw cliënt heeft nu een nieuw soort preparaten voor verlengde afgifte ontwikkeld, die bestaan uit holle buizen van op elkaar gestapelde cyclische peptiden van afwisselende L- en D- aminozuren. Deze preparaten kunnen zeer eenvoudig worden bereid, vergeleken met de bekende preparaten voor verlengde afgifte op basis van een gel of van een polymeer.

Een voorbeeld van een dergelijk cyclisch peptide is het in Figuur 1 weergegeven cyclische peptide, dat uit afwisselende D-glycineresten en L-alanineresten is opgebouwd
 20 (8 aminozuurresten in totaal).

Uw cliënt heeft met name gevonden dat wanneer dergelijke cyclische peptiden in een oplossing met een pH van minder dan 7,0 worden gebracht, zij zich spontaan samenvoegen tot holle buisvormige structuren, waarin de cyclische peptiden bijeen worden gehouden door waterstofbruggen tussen de naast elkaar gelegen cyclische peptiden, zoals schematisch weergegeven in Figuur 2 voor een peptidebuis die uit 12 cyclische peptiden bestaat.

Meer in detail toont Figuur 2 een stapel van 12 cyclische peptiden volgens Figuur 1. In het rechterdeel van Figuur 2 worden 4 van deze cyclische peptiden door middel van structuurformules weergegeven, waarbij de waterstofbruggen -H····O- voor de onderlinge
 30 verbinding van de afzonderlijke cyclische peptiden zorgen.

Wanneer tijdens het vormen van de buizen tevens een werkzame stof in de oplossing aanwezig is, dan wordt deze werkzame stof vanzelf in de gevormde peptidebuizen ingesloten.

Het is gebleken dat dergelijke peptidebuizen in een waterige oplossing met een pH van minder dan 7,0 gedurende ten minste 12 maanden intact blijven. Na toedienen aan de patiënt vallen de peptidebuizen echter langzaam in de bloedsomloop uiteen tot de afzonderlijke cyclische peptiden, gedurende een periode van enkele dagen tot enkele weken, waardoor de werkzame stof die in de peptidebuizen is opgenomen langzaam vrijkomt en aan de bloedsomloop wordt afgegeven.

10 Uw cliënt heeft verschillende cyclische peptiden van afwisselende D- en L-aminozuren onderzocht.

Hierbij is gebleken dat cyclische peptiden met 4 aminozuren in de ring (de kleinste ring die kan worden gevormd) niet in staat zijn om een peptidebuis te vormen, omdat deze kleine ringen een te hoge ringspanning hebben, hetgeen de vorming van een stabiele peptidebuis voorkomt. Cyclische peptiden met in totaal 14 of meer aminozuurresten in de ring zijn ook niet in staat om een stabiele peptidebuis te vormen, omdat zij te groot zijn om goed op elkaar gestapeld te worden.

Verder heeft uw cliënt gevonden dat wanneer cyclische peptiden worden gebruikt die aminozuren met ioniseerbare zijketens (zoals arginine, lysine, glutaminezuur, 20 asparaginezuur, histidine en cysteïne) bevatten, dat dan elektrostatistische interacties tussen de geladen zijketens kunnen optreden, hetgeen de vorming van een stabiele peptidebuis in de weg kan staan.

Voor farmaceutisch gebruik moeten de peptidebuizen derhalve worden opgebouwd uit cyclische peptiden van afwisselende D- en L-aminozuren die uitsluitend niet-ioniseerbare zijketens bevatten. Deze D- en L-aminozuren moeten worden gekozen uit de reeks D- of L-glycine (Gly), D- of L-alanine (Ala), D- of L-valine (Val), D- of L-leucine (Leu), D- of L-isoleucine (Ile), D- of L-phenylalanine (Phe), D- of L-tyrosine (Tyr), D- of L-tryptofaan (Trp), D- of L-serine (Ser) of D- of L-threonine (Thr); dat wil zeggen dat de D-aminozuren worden gekozen uit D-glycine (D-Gly), D-alanine (D-Ala), 30 D-valine (D-Val), D-leucine (D-Leu), D-isoleucine (D-Ile), D-phenylalanine (D-Phe), D-tyrosine (D-Tyr), D-tryptofaan (D-Trp), D-serine (D-Ser) en D-threonine (D-Thr) en dat

de L-aminozuren worden gekozen uit L-glycine (L-Gly), L-alanine (L-Ala), L-valine (L-Val), L-leucine (L-Leu), L-isoleucine (L-Ile), L-phenylalanine (L-Phe), L-tyrosine (L-Tyr), L-tryptofaan (L-Trp), L-serine (L-Ser) of L-threonine (L-Thr). Andere aminozuren zijn niet geschikt.

De voorkeur wordt gegeven aan respectievelijk D-glycine (D-Gly), D-alanine (D-Ala), D-valine (D-Val), D-leucine (D-Leu) en D-isoleucine (D-Ile) voor de D-aminozuren en L-glycine (L-Gly), L-alanine (L-Ala), L-valine (L-Val), L-leucine (L-Leu) en L-isoleucine (Ile) voor de L-aminozuren.

De cyclische peptiden kunnen uit de D-vorm en de L-vorm van hetzelfde
10 aminozuur bestaan, zoals bijvoorbeeld een ring van afwisselende D- en L-valineresten of een ring van afwisselende D- en L-glycineresten. De cyclische peptiden kunnen ook uit verschillende D- en L-aminozuurresten bestaan, zoals bijvoorbeeld een ring van afwisselende D-glycineresten en L-leucineresten. Wel moet het gebruik van cyclische peptiden die meer dan een soort D-aminozuurrest bevatten en/of die meer dan een soort L-aminozuurrest bevatten worden vermeden, omdat dit tot problemen kan leiden bij het op de juiste wijze “stapelen” van de cyclische peptiden.

De cyclische peptiden kunnen volgens algemeen bekende procedures worden bereid.

De peptidebuizen kunnen als volgt uit de cyclische peptiden worden gevormd. De
20 cyclische peptiden worden in water of in een waterig medium met een pH van meer dan 7,5 gebracht. Daarna wordt de oplossing met een geschikt zuur aangezuurd tot een pH van minder dan 7,0, waarbij de cyclische peptiden zich spontaan tot peptidebuizen samenvoegen.

Voor gebruik bij het bereiden van preparaten voor verlengde afgifte moeten de peptidebuizen groot genoeg zijn om de werkzame stof te kunnen bevatten. Hierbij spelen zowel de “binnendiameter” als de “lengte” van de peptidebuis een rol.

Gebleken is dat peptidebuizen die uit cyclische peptiden met 6 aminozuurresten in de ring bestaan een te kleine binnendiameter hebben om een werkzame stof te kunnen bevatten. Voor preparaten met verlengde afgifte kunnen derhalve alleen cyclische
30 peptiden worden gebruikt die 8 aminozuurresten of meer bevatten (dat wil zeggen ten minste 4 L-aminozuurresten en ten minste 4 D-aminozuurresten).

Verder moet een peptidebuis uit tenminste 6 op elkaar gestapelde cyclische peptiden bestaan. Hoewel de maximale lengte van de peptidebuizen niet essentieel is, blijkt het in de praktijk niet mogelijk om peptidebuizen te vormen die uit meer dan 14 cyclische peptiden zijn opgebouwd. Langere peptidebuizen zijn in oplossing niet stabiel en vallen vanzelf in kortere buizen uiteen.

De lengte van de peptidebuizen kan worden geregeld door de molverhouding van de cyclische peptiden en de werkzame stof op gepaste wijze te kiezen. Om peptidebuizen met een lengte van ten minste 6 cyclische peptiden te vormen moet ten minste 6 mol van het cyclische peptide worden gebruikt per mol van de werkzame stof. In de
10 farmaceutische praktijk moet echter een kleine overmaat van het cyclische peptide ten opzichte van deze minimale hoeveelheid worden gebruikt, dat wil zeggen 8-12 mol van het cyclische peptide per mol van de werkzame stof. Dit leidt tot een statistische verdeling van de lengte van de peptidebuizen, waarbij > 99% van de peptidebuizen uit 6 of meer aminozuren bestaan. Dit is voldoende voor praktische toepassing als geneesmiddel met verlengde afgifte.

Om de peptidebuizen met de werkzame stof te vormen kunnen de peptidebuizen op de hierboven beschreven wijze worden gevormd in de aanwezigheid van de werkzame stof. De cyclische peptiden worden in een steriele waterige oplossing van de werkzame stof met een pH van meer dan 7,5 gebracht, waarbij de concentratie van het cyclische
20 peptide 8-12 maal de concentratie van de werkzame stof is. Daarna wordt de oplossing met een farmaceutisch aanvaardbaar zuur aangezuurd tot een pH van minder dan 7,0, waarbij de cyclische peptiden zich spontaan tot de peptidebuizen samenvoegen, en de werkzame stof vanzelf in de peptidebuizen wordt ingesloten. Het aldus verkregen steriele waterige preparaat is klaar voor toedienen aan een patiënt.

Uw cliënt heeft klinisch onderzoek gedaan met een aantal verschillende cyclische peptiden met 4, 6, 8, 10, 12 en 14 aminozuurresten. Hierbij werd steeds het ontstekingsremmende geneesmiddel ibuprofen als de werkzame stof gebruikt.

Peptidebuizen uit cyclische peptiden met 8, 10 of 12 afwisselende D- en L-
30 aminozuurresten in de ring en met de hierboven vermelde "lengte" van de peptidebuis leidden steeds tot de gewenste verlengde afgifte van de werkzame stof. Zo bleek dat, na

eenmaal intraveneus toedienen van een geschikte dosis, na twee weken nog steeds voldoende ibuprofen in de bloedsomloop aanwezig was om de gewenste geneeskundige werking te bereiken.

Uw cliënt heeft ook de stabiliteit onder opslag van deze peptidebuizen onderzocht. Deze bleek niet voldoende te zijn voor gebruik als een farmaceutisch handelsproduct. Zo is gebleken dat, wanneer de peptidebuizen met ibuprofen als een oplossing in water in een koelkast bij 4°C worden opgeslagen, na 6 weken meer dan 5 % van de werkzame stof uit de peptidebuizen is “weggelekt”, met name via de “open” uiteinden van de peptidebuizen.

10 Uw cliënt heeft echter tevens gevonden dat wanneer naast de bovenstaande cyclische peptiden ook de overeenkomstige N-gealkyleerde derivaten van de cyclische peptiden worden toegevoegd, deze N-gealkyleerde derivaten een “deksel” op de uiteinden van de peptidebuizen kunnen vormen.

Dit deksel sluit de uiteinden van de peptidebuis af, waardoor wordt voorkomen dat de werkzame stof tijdens opslag langzaam via de uiteinden van de peptidebuis weglekt. Verder kunnen deze N-gealkyleerde derivaten slechts aan één zijde van de ring waterstofbruggen met andere cyclische peptiden ondergaan, zodat geen verdere cyclische peptiden meer aan de peptidebuis kunnen binden wanneer het deksel eenmaal is gebonden. De aanwezigheid van deze “deksels” heeft verder geen invloed op de
20 verlengde afgifte van de werkzame stof uit de peptidebuis, nadat het preparaat aan een patiënt wordt toegediend.

Een en ander is schematisch weergegeven in Figuur 3. Figuur 3 toont de peptidebuis van Figuur 2 en 2 cyclische peptiden die gealkyleerd zijn en daardoor een deksel kunnen vormen.

Om als deksel werkzaam te zijn moeten de alkylgroepen van de N-gealkyleerde cyclische peptiden een onvertakte alkylgroep met 2 tot en met 6 koolstofatomen bevatten, zoals een onvertakte ethyl-, propyl-, butyl-, pentyl- of hexylgroep. N-gealkyleerde cyclische peptiden met 7 of meer koolstofatomen in de N-alkylgroep zijn onvoldoende oplosbaar in water om te worden gebruikt. Bij N-gemethyleerde cyclische peptiden zijn
30 de methylgroepen te klein om de buis goed af te sluiten, waardoor de gewenste houdbaarheid niet wordt verkregen.

Om goed op de peptidebuis te “passen” moeten de als deksel gebruikte N-gealkyleerde derivaten uit evenveel en dezelfde D-aminozuren en L-aminozuren bestaan als de cyclische peptiden die de peptidebuis vormen. Zo kan een cyclisch peptide dat uit afwisselend N-gepropyleerde D-valineresten en N-gepropyleerde L-glycineresten bestaat worden gebruikt om een peptidebuis af te sluiten die uit cyclische peptiden van afwisselend D-valineresten en L-glycineresten is opgebouwd, maar niet om een peptidebuis af te sluiten die bijvoorbeeld uit cyclische peptiden met 2 aminozuurresten meer is opgebouwd, en ook niet om een peptidebuis af te sluiten die uit afwisselend D-alanineresten en L-glycineresten is opgebouwd of die uit afwisselend L-valineresten en D-glycineresten is opgebouwd.

Verder moeten de N-gealkyleerde derivaten worden gebruikt in een verhouding van ten minste 2 mol van het N-gealkyleerde derivaat per mol van de werkzame stof. In de farmaceutische praktijk moet echter een kleine overmaat van het cyclische peptide ten opzichte van deze minimale hoeveelheid worden gebruikt, dat wil zeggen 2,2-2,5 mol van het cyclische peptide per mol van de werkzame stof. Dit leidt tot een statistische verdeling van de lengte van de peptidebuizen, waarbij > 99% van de peptidebuizen bij beide uiteinden zijn afgesloten. Wanneer meer dan 2,5 mol van het cyclische peptide per mol van de werkzame stof wordt gebruikt, dan is teveel van het “deksel” aanwezig ten opzichte van de cyclische peptiden die de peptidebuis vormen, waardoor de “lengte” van de peptidebuizen te kort wordt. Verder moet, om er zeker van te zijn dat de gewenste statistische verdeling van de lengte van de peptidebuizen wordt verkregen, het deksel worden toegevoegd nadat de peptidebuis op de bovenstaande wijze in oplossing is gevormd.

Voor het bereiden van farmaceutische preparaten met verlengde afgifte en met een goede stabiliteit onder opslag moeten derhalve 8-12 mol van het cyclische peptide en 2,2-2,5 mol van het overeenkomstige N-gealkyleerde derivaat worden gebruikt per mol van de werkzame stof.

Om de peptidebuizen met de werkzame stof en het deksel te vormen worden de cyclische peptiden in een waterige oplossing van de werkzame stof met een pH van meer dan 7,5 gebracht, waarbij de concentratie van het cyclische peptide 8-12 maal de concentratie van de werkzame stof is. Daarna wordt de oplossing met een farmaceutisch

aanvaardbaar zuur aangezuurd tot een pH van minder dan 7,0, waarbij de cyclische peptiden zich spontaan tot de peptidebuizen samenvoegen, en de werkzame stof vanzelf in de peptidebuizen wordt ingesloten. Nadat men deze oplossing ten minste 5 minuten, maar niet langer dan ongeveer 15 minuten, heeft laten staan om zo op evenwicht te komen, wordt 2,2 tot 2,5 mol van het overeenkomstige N-gealkyleerde derivaat van het cyclische peptide toegevoegd.

Deze werkwijze omvat derhalve de volgende stappen:

- (a) het verschaffen van een steriele waterige oplossing van een geneeskundig werkzame stof met een pH van meer dan 7,5;
- 10 (b) het toevoegen aan deze oplossing van 8-12 mol van het bovenstaande cyclische peptide per mol van de geneeskundig werkzame stof;
- (c) het aanzuren van deze oplossing met een farmaceutisch aanvaardbaar zuur tot een pH van minder dan 7,0.
- (d) het gedurende 5-15 minuten laten staan van deze oplossing;
- (e) het toevoegen van 2,2-2,5 mol van het overeenkomstige N-gealkyleerde derivaat van het cyclische peptide.

Deze stappen (a) t/m (e) leiden tot een preparaat met de gewenste verlengde afgifte van de werkzame stof, dat een stabiliteit onder opslag heeft van ten minste 6 maanden, en vaak van 12 maanden of meer.

- 20 De stappen (a) t/m (e) worden uitgevoerd in een geschikte houder, zoals in een bekersglas, bij een temperatuur tussen 10°C en 50 °C. Onder 10°C verloopt de vorming van de peptidebuizen te langzaam, en boven 50 °C vallen de gevormde peptidebuizen door de te hoge temperatuur uiteen.

Bij stap (a) wordt steriel water voor injectie gebruikt, of een steriele waterige oplossing die geschikt is voor intraveneuze toediening, zoals een steriele fysiologisch aanvaardbare zoutoplossing.

- 30 De concentratie van de werkzame stof bij stap (a) ligt bij voorkeur in het traject van 0,001 M tot 1,0 M, zoals ongeveer 0,01-0,1 M. Beneden 0,001 M verloopt de vorming van de peptidebuizen te langzaam, en boven 1,0 M ontstaan er problemen met de oplosbaarheid van de verschillende bestanddelen.

De pH van de oplossing van de werkzame stof moet hoger zijn dan 7,5, en ligt bij voorkeur in het traject van 7,5 tot 9,0. Een hogere pH kan soms de werkzame stof aantasten.

Het volgens de bovenbeschreven werkwijze verkregen waterige preparaat is klaar voor toediening aan een patiënt. Dit preparaat bevat buizen van het cyclische peptide, waarbij > 99% van de peptidebuizen een lengte van 6 tot en met 12 cyclische peptiden heeft en aan de twee uiteinden met het N-gealkyleerde derivaat is afgesloten (zodat de totale peptidebuis, inclusief de twee N-gealkyleerde “deksels”, uit 8 tot en met 14 cyclische peptiden bestaat). Ook is meer dan 99% van de oorspronkelijke hoeveelheid
10 ibuprofen in de buizen opgenomen.

De waterige oplossingen van de peptidebuizen kunnen in flacons, ampullen of zakken voor een infuus worden gebracht, die vervolgens worden afgesloten. In deze vorm kunnen de preparaten gedurende ten minste 6 maanden in een koelkast bij 4°C worden bewaard, zonder dat de gewenste verlengde afgifte verloren gaat. De preparaten met de deksels zijn echter niet geschikt voor vriesdrogen.

De peptidebuizen volgens de uitvinding kunnen worden gebruikt voor de verlengde afgifte van iedere gewenste in water oplosbare werkzame stof. Een aantal niet-beperkende voorbeelden zijn onder meer ontsteking remmende middelen, pijnstillende middelen en antibiotica.

20 De preparaten kunnen worden toegediend door middel van intraveneuze injectie of met een infuus, bijvoorbeeld een maal per week of een maal per maand. De toegediende dosis is afhankelijk van de werkzame stof en van de te behandelen aandoening, en kan door de behandelend arts worden gekozen. In het algemeen kan de toegediende dosis bijvoorbeeld tussen 0,0001 en 0,01 mg van de werkzame stof per kg lichaamsgewicht van de patiënt liggen. De behandelend arts kan echter een andere dosis of een ander toedieningsregime kiezen.

Voorbeeld 1: Verlengde afgifte van ibuprofen uit buizen van cyclische peptiden

30 Preparaten voor verlengde afgifte van ibuprofen uit verschillende buizen van cyclische peptiden werden als volgt bereid.

100 ml van een 0,05 M oplossing van ibuprofen in een steriele zoutoplossing voor injectie met een pH van 7,5 werd in een bekersglas gebracht. Hieraan werd bij kamertemperatuur in één keer 0,05 mol (een tienvoudige overmaat ten opzichte van de totale hoeveelheid ibuprofen in de oplossing) van het cyclische peptide toegevoegd, waarna kort werd geroerd. Vervolgens werd de pH met een 0,1 M oplossing van citroenzuur op 6,5 ingesteld.

De aldus verkregen oplossingen werden onderzocht op de duur van de verlengde afgifte. De resultaten zijn samengevat in de onderstaande tabellen 1 en 2. Cyclische peptiden met 6 aminozuurresten in de ring waren wel in staat om buizen te vormen, maar deze buizen hadden een te kleine binnendiameter om de ibuprofen op te nemen, zodat geen verlengde afgifte werd verkregen. Er waren verder geen verschillen tussen de verkregen resultaten.

Tabel 1: Cyclische peptiden uit L-Valineresten en D-Valineresten

Cyclische peptide:	Aantal aminozuurresten in de ring	Vorming van een peptidebuis	Duur van de verlengde afgifte
[(L-Val-D-Val) ₂]	4	Nee	Niet van toepassing
[(L-Val-D-Val) ₃]	6	Ja	Geen
[(L-Val-D-Val) ₄]	8	Ja	3 weken
[(L-Val-D-Val) ₅]	10	Ja	3 weken
[(L-Val-D-Val) ₆]	12	Ja	3 weken
[(L-Val-D-Val) ₇]	14	Nee	Niet van toepassing

Tabel 2: Cyclische peptiden uit L-Leucineresten en D-Isoleucineresten

Cyclische peptide:	Aantal aminozuurresten in de ring	Vorming van een peptidebuis	Duur van de verlengde afgifte
[(L-Leu-D-Ile) ₂]	4	Nee	Niet van toepassing
[(L-Leu-D-Ile) ₃]	6	Ja	Geen
[(L-Leu-D-Ile) ₄]	8	Ja	3 weken
[(L-Leu-D-Ile) ₅]	10	Ja	3 weken
[(L-Leu-D-Ile) ₆]	12	Ja	3 weken
[(L-Leu-D-Ile) ₇]	14	Nee	Niet van toepassing

Voorbeeld 2: Houdbaarheid van preparaten voor verlengde afgifte van ibuprofen uit buizen van cyclische peptiden.

10 Preparaten voor verlengde afgifte van ibuprofen werden op de in Voorbeeld 1 beschreven wijze bereid uit cyclische peptiden met 8, 10 of 12 aminozuren in de ring.

De concentratie aan “vrije” ibuprofen (d.w.z. ibuprofen die niet in de buizen was ingesloten) in de verkregen oplossing werd bepaald en bleek < 0,0005 M te zijn (d.w.z. minder dan 1% van de concentratie aan ibuprofen in de oorspronkelijk bij Voorbeeld 1 gebruikte oplossing).

De preparaten werden bij 4°C in de koelkast opgeslagen. Iedere week werd een monster genomen, waarna de concentratie aan “vrije” ibuprofen in het monster werd bepaald. Het preparaat was houdbaar zolang de concentratie aan vrije ibuprofen minder was dan 0,0025 M (d.w.z. dat minder dan < 5% van de ibuprofen uit de buizen was gelect). De resultaten zijn vermeld in Tabel 3.

Tabel 3:

Cyclische peptide:	Aantal aminozuur-resten in de ring	Houdbaarheid (*)
[(L-Val-D-Val) ₄]	8	6 weken
[(L-Val-D-Val) ₅]	10	6 weken
[(L-Val-D-Val) ₆]	12	6 weken
[(L-Leu-D-Ile) ₄]	8	6 weken
[(L-Leu-D-Ile) ₅]	10	6 weken
[(L-Leu-D-Ile) ₆]	12	6 weken

(*) Concentratie aan “vrije” ibuprofen < 0,0025 M

Voorbeeld 3: Houdbaarheid van preparaten voor verlengde afgifte van ibuprofen uit buizen van cyclische peptiden, die zijn afgesloten met N-propylderivaten.

10

Preparaten voor verlengde afgifte van ibuprofen werden op de in Voorbeeld 1 beschreven wijze bereid uit cyclische peptiden met 8, 10 of 12 aminozuren in de ring.

Nadat de pH van de oplossing op 6,5 was ingesteld, liet men de oplossing gedurende 10 minuten staan, waarna steeds 0,012 mol (een 2,4-voudige overmaat ten opzichte van de totale hoeveelheid ibuprofen in de oplossing) van het overeenkomstige N-propyl derivaat van het cyclische peptide werd toegevoegd, en kort werd geroerd.

De aldus verkregen preparaten werden onderzocht op de duur van de verlengde afgifte en op de houdbaarheid. De resultaten zijn vermeld in Tabel 4.

Tabel 4:

Cyclische peptide:	Duur van de verlengde afgifte	Houdbaarheid (*)
[(L-Val-D-Val) ₄] + N-propyl derivaat	3 weken	12 maanden
[(L-Val-D-Val) ₅] + N-propyl derivaat	3 weken	12 maanden
[(L-Val-D-Val) ₆] + N-propyl derivaat	3 weken	12 maanden
[(L-Leu-D-Ile) ₄] + N-propyl derivaat	3 weken	12 maanden
[(L-Leu-D-Ile) ₅] + N-propyl derivaat	3 weken	12 maanden
[(L-Leu-D-Ile) ₆] + N-propyl derivaat	3 weken	12 maanden

(*) Concentratie aan “vrije” ibuprofen < 0,0025 M

Uw cliënt heeft volgende publicatie gevonden. Als gezegd wordt u gevraagd een set conclusies en een beschrijving op te stellen rekening houdend met deze publicatie. Indien de set conclusies meer dan een uitvinding betreft, dient u dit gemotiveerd aan te geven.

Document 1: Journal of Antibiotics, augustus 2004, blz. 110-112.

Wij hebben onderzocht of cyclische peptiden die uit afwisselende D- en L-aminozuren bestaan buisvormige structuren kunnen vormen, en of deze buisvormige structuren werkzaam zijn als antibioticum.

Als een model hebben wij verschillende cyclische peptiden onderzocht die zijn opgebouwd uit afwisselend L-glycineresten (L-Gly) en D-alanineresten (D-Ala). Om de peptidebuizen te vormen werden deze cyclische peptiden in een waterige oplossing met een pH van minder dan 7,0 opgelost. Hierbij vormen de cyclische peptiden uit zichzelf
10 buisvormige structuren.

De onderzochte cyclische peptiden en de resultaten zijn vermeld in de onderstaande Tabel. Cyclische peptiden met minder dan 6 aminozuren in de ring en cyclische peptiden met meer dan 12 aminozuren in de ring bleken niet in staat om peptidebuizen te vormen.

Om te bepalen welke groepen op het cyclische peptide betrokken zijn bij het vormen van de peptidebuizen hebben wij verder ook een N-gepropyleerd derivaat van het cyclische peptide [(L-Gly-D-Ala)₆] gesynthetiseerd en onderzocht. In dit N-gepropyleerde derivaat zijn de N-H groepen op een zijde van de ring vervangen door N-propyl-groepen. Hierdoor kan dit derivaat alleen op de tegenoverstelde zijde van de ring
20 waterstofbruggen met ander cyclische peptiden ondergaan.

Dit N-gealkyleerde cyclische peptide bleek niet in staat om een peptidebuis te vormen, maar leidde in plaats hiervan tot de vorming van een “sandwich” van twee N-gepropyleerde cyclische peptiden, die geen verdere interacties met andere cyclische peptiden kon ondergaan. Hieruit blijkt dat het vormen van waterstofbruggen aan beide zijden van het cyclische peptide essentieel is voor het opbouwen van buizen die uit meer dan twee cyclische peptiden bestaan.

De hierin beschreven peptidebuizen kunnen worden gebruikt als antibioticum. Zoals blijkt uit de onderstaande Tabel waren alle cyclische peptiden die in staat waren om een buis te vormen tevens werkzaam als antibioticum in een *in vitro* bepaling tegen *S. aureus*.
30 Uit nader onderzoek met een fluorescentiemicroscoop is gebleken dat de peptidebuizen door het celmembran van bacterien worden opgenomen. Hierbij vormen

deze peptidebuizen een open kanaal dat door het celmembraan van de bacterie heen gaat, waarlangs ionen uit de bacteriecel kunnen weglekken. Hierdoor wordt de bacteriecel gedood. Een soortgelijk werkingsmechanisme is reeds in de literatuur beschreven voor de werking van het antibioticum Gramacidine A, een linear peptide van 50 aminozuren dat zich tot een helixstructuur kan vouwen en zo een kanaal voor ionen door het celmembraan van een bacterie kan vormen. Echter, anders dan Gramacidine A zijn de hierin beschreven peptidebuizen niet giftig wanneer zij aan mensen worden toegediend.

Formule:	Aantal aminozuren in de ring	Vorming van een peptidebuis	Werking tegen <i>S. aureus</i>
[(L-Gly-D-Ala) ₂]	4	Nee	Nee
[(L-Gly-D-Ala) ₃]	6	Ja	Ja
[(L-Gly-D-Ala) ₄]	8	Ja	Ja
[(L-Gly-D-Ala) ₅]	10	Ja	Ja
[(L-Gly-D-Ala) ₆]	12	Ja	Ja
[(L-Gly-D-Ala) ₇]	14	Nee	Nee
[(L-Gly-D-Ala) ₈]	16	Nee	Nee
N-propyl derivaat van [(L-Gly-D- Ala) ₆]	12	Nee (“sandwich”)	Nee

- 10 Voor farmaceutisch gebruik kan bijvoorbeeld [(L-Gly-D-Ala)₆] in een fysiologische zoutoplossing met een pH van 7,5 worden opgelost, waarna de pH tot 6,5 wordt verlaagd met een farmaceutisch aanvaardbaar zuur zoals azijnzuur. Op deze wijze kan een oplossing van de peptidebuizen van [(L-Gly-D-Ala)₆] voor intraveneuze injectie worden gevormd, die aan patiënten kan worden toegediend voor het behandelen van bacterie-infecties.

Eventueel kan de antibacteriële werking nog verder worden versterkt door tijdens het vormen van de oplossing van de peptidebuizen een klein in water oplosbaar molecuul toe te voegen dat werkzaam is als antibioticum, bijvoorbeeld in een verhouding van 1 mol van het antibioticum tot 10 mol van het cyclische peptide. De oplossing met het

antibioticum moet echter snel na het bereiden worden gebruikt, omdat de aanvankelijk heldere oplossing na ongeveer 7-14 dagen bewaren in de koelkast troebel wordt, door de vorming van een neerslag van het antibioticum.

10

20

Figuren: zie bijlagen achter pagina 16 van de tentamenopgave op papier.

Figuur 2

x 12 → QuickTime™ and a
F (LZW) decompressor
needed to see this picture.



Figuur 3

