

Tentamen Octrooigemachtigden

Tentamen “Opstellen van een octrooiaanvraag” (deel A)

chemie

7 oktober 2019

13.30 – 17.30 uur

TENTAMENOPGAVE 'OPSTELLEN VAN EEN OCTROOIAANVRAAG' (A) CHEMIE 2019

Disclaimer: Dit is een examen; hoewel de wetenschap substantieel overeenkomt met de werkelijkheid, zijn veel zaken vereenvoudigd om niet te veel af te leiden.

5 =====

Beste Octrooigemachtigde,

10 Een onderzoeker van mijn universiteit heeft weer een mooie nieuwe vinding gedaan, en we willen graag proberen daar octrooi op te krijgen. Zou je zoals gebruikelijk een set van hooguit 15 conclusies willen maken, met een bijbehorende beschrijvingsinleiding? Het gebruikelijke formulier waarmee de uitvinding intern aan mij is gemeld vindt je onder deze brief. Bespaar maar kosten waar mogelijk, bijvoorbeeld door er maximaal 4 uur aan te besteden.

Groeten,

15 T. Theo,
Valorisatie-medewerker

=====

Nieuwe-vindingen-formulier

Uitvinders:

20 B. Thoven
S. Joppin
R. O. Niflecz

Afdeling:

Synthetisch Organische Chemie in samenwerking met Tumor-Immunologie

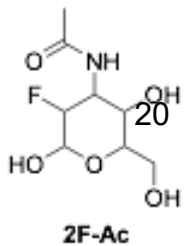
25 Beschrijving van de uitvinding:

Zoals je weet werken we al sinds jaar en dag aan suikers. Onze chemische vaardigheden combineren we steeds vaker met vragen vanuit de afdeling Tumor-Immunologie. Dit komt doordat een belangrijk thema uit de tumor-immunologie te maken heeft met hoe cellen hun glycanen optuigen.

30 Glycanen zijn de suikerketens, of suikerbomen, die een cel op zijn oppervlakte heeft. Deze glycanen spelen een rol in herkenning tussen cellen. Zo is een glycaan die eindigt met een siaalzuur (siaalzuur is een bijzondere suikereenheid), vaak lichaamseigen. De meeste bacteriën missen zulke glycanen en zo kan het immuunsysteem ze van lichaamseigen materiaal

onderscheiden. Wij noemen glycanen met een terminale siaalzuur daarom 'eigen glycanen'; zonder zo'n terminale siaalzuurgroep noemen we ze 'vreemde glycanen'.

- 5 De collegae bij Tumor-Immunologie hebben een serie publicaties gedaan waarin ze beschrijven hoeveel tumoren overactief zijn in het produceren van eigen glycanen. Hierdoor krijgen de kankercellen een sterk geladen oppervlak, waardoor ze elkaar afstoten. Dit werkt metastase, uitzaaiing van kankercellen, in de hand. Pogingen om de tumorcellen van hun eigen glycanen te ontdoen bleken dubbel effectief te zijn: naast het remmen van de metastase bleek dat immuuncellen er steeds beter in slaagden om de tumoren op te ruimen naarmate zij minder eigen glycanen konden maken.
- 10 De laatste stap in de biosynthese van eigen glycanen is het vastzetten van siaalzuur op een glycaan-in-aanbouw. Dit gebeurt door het enzym sialyltransferase (ST). Je zou kunnen zeggen dat op een vreemde glycaan een siaalzuur wordt gezet, om zo een eigen glycaan te vormen. Alle soorten glycanen worden daarna vanzelf door de cel naar de buitenkant van het membraan getransporteerd. Als ST niet meer werkt in een cel, dan krijgt die cel alleen nog maar vreemde
- 15 glycanen. Zo'n cel zal snel door het eigen immuunsysteem worden opgeruimd, zodat ST inhibitie mogelijkheden biedt voor de behandeling van kanker.



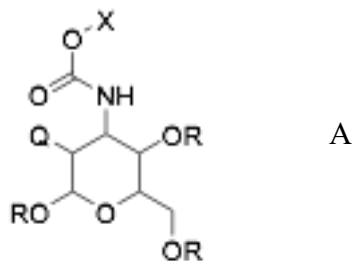
- In het verleden hebben we veel succes behaald met onze alom bekende ST-inhibitor 2F-Ac. Dit is een analoog van siaalzuur, die herkend wordt door ST en in de active site van dat enzym bindt. Daar eenmaal gebonden, raakt ST geïnhibeerd omdat de lokatie waar siaalzuur gewoonlijk aan de glycaan gekoppeld wordt, geblokkeerd is door een halogeenatoom, bij 2F-Ac het fluoratoom. Zo kan de benodigde suiker-suiker verbinding niet gevormd worden, wat bekend is uit document D1, waarvan de conclusies zijn bijgevoegd. Dat deze middelen specifiek voor tumorcellen zijn, komt door het verhoogde metabolisme in
- 25 tumorcellen.

- 2F-Ac was eigenlijk de enige stof uit D1 met een activiteit in een bruikbaar bereik. We hebben nu gevonden dat de azijnzuuramidegroep $-NH-C(=O)-CH_3$ van 2F-Ac, welke groep in het natuurlijke siaalzuur ook aanwezig is, blijkbaar vervangen kan worden. We waren bezig met een ontwikkelingsprogramma om het fluorideatoom te vervangen door verdere blokkerende groepen,
- 30 maar een onoplettende student had per ongeluk een carbamaat gemaakt in plaats van een azijnzuuramide. Toen hij deze fout pas ontdekte nadat de enzym-studie al gedaan was, bleek dat er juist bijzonder goede ST inhibitie was!

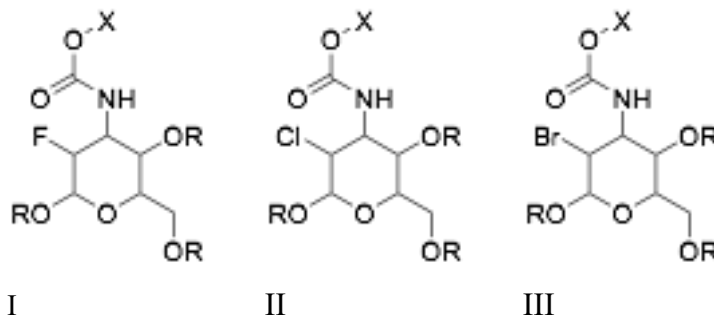
Enzyminhibitie drukken we uit in μM , als IC_{50} waarde. Dit is de concentratie waarop de helft van het maximaal haalbare effect wordt bereikt. Een lagere IC_{50} betekent dus dat een inhibitor potenter is. Waarden boven de $100 \mu\text{M}$ zijn niet meer relevant; niet alleen is dit klinisch niet realistisch, het is zelfs in vitro moeilijk om met zulke doses te werken wegens

5 oplosbaarheidsproblemen. De bekende 2F-Ac heeft een IC_{50} van rond de $25 \mu\text{M}$. Dit is werkbaar, maar het was indertijd vooral een doorbraak omdat er geen alternatieven waren. Echt nuttige inhibitors zouden idealiter een waarde van onder de $1 \mu\text{M}$ hebben, hoewel alles onder de $10 \mu\text{M}$ al nuttig is. Eigenlijk is elke verbetering op 2F-Ac gewoon welkom.

10 De uitvinding gaat over een verbinding van algemene formule A, waarin we variaties hebben gemaakt in halogeen Q, in groep X op het carbamaatdeel ($-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OX}$), en in groep R op de alcoholen van de suiker. Niet elke R hoeft trouwens hetzelfde te zijn binnen de formule, dus elke R kan afzonderlijk gekozen worden.



15 Q is een halogeen, maar geen jood of astat. We hebben bioinformatische modelleringen gedaan, en hiermee hebben we voorspeld dat halogenen groter dan broom zeker geen kans maken voor Q. Als Q te groot is, zal de inhibitor niet meer in de active site van ST passen. Hierom hebben we voor Q alleen fluor (F), chloor (Cl), en broom (Br) gebruikt, omdat die wel kunnen werken. Deze families kun je weergeven als algemene formules I, II, en III.



20 In diezelfde studies hebben we gezien dat er redelijk wat ruimte is rond X. Waar het natuurlijke substraat daar alleen maar een azijnzuuramidegroep (NAc) heeft, blijkt er flink wat speling te zijn in de relevante 'binding pocket' van de active site van ST. Die pocket blijkt nogal hydrofoob te

zijn, dus het leek ons kansrijk om de pocket verder op te vullen met alkaan om zo de affiniteit te verhogen. Omdat ST nogal amorf is qua structuur, hebben we geen onverzadigingen geprobeerd, omdat die al snel te star zijn. Ook is de pocket scherp begrensd, en blijkt uit de modellering dat alkaangroepen met vijf C atomen al te groot zijn.

- 5 X is daarom een C_{1-4} alkaan. De C_{1-4} alkanen zijn methyl, ethyl, *n*-propyl, isopropyl, cyclopropyl, *n*-butyl, *sec*-butyl, isobutyl, *tert*-butyl, en cyclobutyl. C_5 alkanen lijken ons niet actief, op basis van de model-studies. Er is een spanning tussen de wens om veel C atomen te hebben, en de strakke bovengrens. Kortere groepen van alkanen zoals C_{1-3} alkanen (methyl, ethyl, *n*-propyl, isopropyl, en cyclopropyl) zullen goed functioneren, maar mogelijk minder goed dan C_4 alkanen.
- 10 De hierboven beschreven verbindingen van algemene formule A zijn veelbelovend als geneesmiddel, namelijk als inhibitors van ST, omdat ST inhibitie de behandeling van kanker mogelijk maakt. Als elke R H is, dan is de ST inhibitor goed wateroplosbaar, en dan zal deze zich goed in vivo kunnen verplaatsen om bij de tumorcellen terecht te komen.
- De onoplettende student die de carbamaten ontdekt had, heeft het goed gemaakt door te beredeneren dat inhibitie van ST ook kan helpen om bacteriën te doden. Dit werkt omdat
- 15 bepaalde typen bacteriën zich als het ware vermommen door sialzuur op hun glycanen te plakken. Als bacteriën dit niet meer kunnen, bijvoorbeeld door het enzym ST te inhiberen, dan worden ze meteen door het immuunsysteem herkend en opgeruimd. De wateroplosbare ST inhibitors werden alleen niet door bacteriën opgenomen - gelukkig gebeurde dat wél zodra we
- 20 de alcoholen op de inhibitor beschermd hadden met azijnzuur, dus wanneer elke R een acetylgroep (AC oftewel een azijnzurrest) was. Deze stof werd goed door bacteriën opgenomen, waarna deze intern door metabole activiteit alsnog tot de actieve verbinding waarbij R is H werd omgezet. Zo hebben we dus ook deze ST inhibitor voor gebruik in de behandeling van bacteriële infecties.
- 25 De verbinding waarbij R is Ac is zelf niet effectief, maar wordt dus intern omgezet naar de actieve variant. Dit gebeurt niet alleen in bacteriën, maar ook in mensen. Dat komt doordat de AcO-groep in het lichaam vanzelf hydrolyseert tot een OH-groep naarmate de tijd verstrijkt. Dit gebeurt met een voorspelbare kinetiek, waardoor een bekende hoeveelheid Ac-groep bevattende inhibitor zich over de tijd omzet in een voorspelbare hoeveelheid vrije inhibitor. De
- 30 carbamaatgroep is overigens net als de amide van 2F-Ac veel minder labiel, en zal dus niet hydrolyseren.

We hebben bijzondere interesse in een samenstelling omvattende de verbinding van algemene formule A, waarin de samenstelling is geformuleerd als depot-injectie. Een depot-injectie blijft onderhuids als reservoir aanwezig totdat deze volledig geresorbeerd is. Met R is H zal de ST inhibitor binnen een dag resorberen, en wordt door depot-injectie het equivalent bereikt van een dag lang aan het infuus liggen. Dit biedt groot voordeel omdat een patiënt geen hele dag meer kwijt is, maar slechts 1 injectie behoeft. Zo'n samenstelling omvat altijd een farmaceutisch aanvaardbaar draagmiddel (die middelen zijn zo bekend dat geen verdere specificatie nodig is).

Met R is Ac is het moeilijk om depot-injecties te krijgen met een dosis die voldoende hoog is om tumoren goed te bestrijden. Dit is jammer, omdat we dan zouden profiteren van de langzame afgifte van ST inhibitor. We hebben veel soorten surfactant gebruikt, maar alleen met de alom bekende TweenTM lukte het soms om een goede homogene formulering te krijgen. Tween is een merknaam voor polysorbaat. Hiermee konden we depot-injectie doen die tot wel een week of zelfs langer voor consistente afgifte zorgden. Jammer genoeg is Tween best duur, en denken we dat het daarom misschien niet verder onderzocht hoeft te worden.

Hieronder volgen experimenten. Zelf heb ik de resultaten nog niet goed bekeken, maar toen ik zag hoe goed de C₄ alkanen het deden, heb ik meteen dit formulier ingevuld.

Experimenten:

De syntheses van de stoffen zijn allemaal volgens bekende en beproefde methoden verlopen. We hebben werkelijk alle analogen gemaakt, maar degene die in tabel 1 staan waren het best zuiver te krijgen, waardoor we ze zijn gaan gebruiken voor de tests.

Als eerste test hebben we de verbindingen gebruikt in een in vitro methode voor het inhiberen van sialyltransferase (ST), waarin de methode de stap omvat van het in contact brengen van de sialyltransferase met een verbinding uit de tabel. Na de inhibitie hebben we de restactiviteit van de ST bepaald via de daarvoor bekende assays, en de resultaten staan ook in tabel 1. We weten uit onze vorige studies dat IC₅₀ rechtstreeks correleert met anti-tumor activiteit.

tabel 1 - carbamaten volgens de uitvinding met hun IC₅₀ waarden

Nummer	Q	X	R	IC ₅₀ (µM)
1	F	methyl	H	8,3
2	Cl	methyl	H	123,2
3	Br	methyl	H	859,3
4	F	ethyl	Ac	11,15
5	Cl	ethyl	Ac	112,2
6	F	ethyl	H	5,33
7	Cl	ethyl	H	101,8
8	F	isopropyl	H	5,09
9	F	<i>n</i> -butyl	H	1,01
10	F	cyclobutyl	H	17,93
11	F	<i>tert</i> -butyl	Ac	0,56
12	Cl	<i>tert</i> -butyl	Ac	103,6
13	F	<i>tert</i> -butyl	H	0,54
14	Cl	<i>tert</i> -butyl	H	99,2
15	F	<i>n</i> -pentyl	H	720,7
16	<i>2F-Ac, ter vergelijking</i>			26,79

5 Hierna hebben we verschillende formuleringen gemaakt, en als depot-injectie bij muismodellen met tumor grafts ingebracht. Eens per week werd een nieuwe depot-injectie gedaan, tenzij anders aangegeven. Daarna hebben we de overlevingsgraad van de muizen bepaald, en nog wat verdere metingen gedaan. Omdat muis-studies duur zijn, hebben we als ST-inhibitor alleen verbindingen 11 en 13 gebruikt, omdat die qua activiteit voor R is H en voor R is Ac steeds dicht bij elkaar lagen. De resultaten staan in tabel 2. We hadden trouwens nog één muis over voor een andere stof, waardoor we met deze ene muis ook stof 4 in vivo hebben kunnen testen.

tabel 2 - formuleringen voor depot-injectie en overlevingspercentage (10 muizen per test)

#	Stof	Tween (gew.-%)	Percentage nog in leven na:			Opmerking
			1 week	1 maand	3 maanden	
1	2F-Ac	0,3	80	50	30	Positieve controle ^a
2	geen	0,3	40	10	0	Negatieve controle ^a
3	11	0	50	20	10	
4	13	0	100	90	80	
5	11	0,05	50	30	10	
6	13	0,05	100	90	80	
7	11	0,1	100	100	90	
8	13	0,1	100	90	80	
9	11	0,3	100	100	100	
10	13	0,3	100	100	90	
11	11	0,5	100	100	90	
12	13	0,5	100	90	80	
13	11	1	50	30	10	
14	13	1	100	90	80	
15	11	0,3	100	100	100	1 injectie per maand
16	13	0,3	90	40	20	1 injectie per maand
17	4	0,3	100	100	0	slechts 1 muis

a: alleen bij deze populaties werd metastase aangetroffen

Voordelen boven de stand der techniek:

- 5 Onze carbamaten werken veel beter dan de bekende amides, en dat terwijl de amides al pionierend waren. Een bijkomend voordeel is dat je de carbamaat maar eens per maand hoeft toe te dienen. Deze inhibitors zijn zelfs potent genoeg voor nuttige in vivo, in vitro of ex vivo toepassingen waarin het nodig is om ST te inhiberen; hier ben ik nu een onderzoeksplan voor aan het schrijven. Zulk remmen van ST heeft veel mogelijke toepassingen en is een nuttig doel.

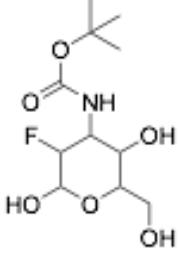
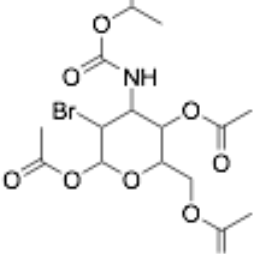
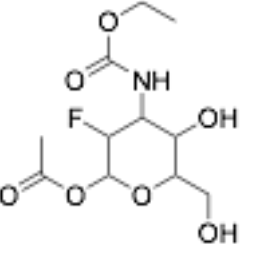
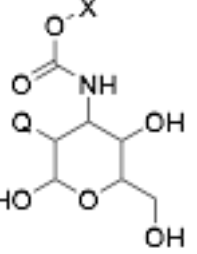
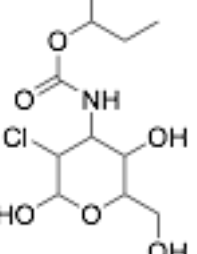
Valorisatiemogelijkheden:

Het voorkomen van metastase is een hot topic, daar zijn weinig middelen voor op de markt. En de depot-injectie is erg veelbelovend. Ik wil een disclaimer toevoegen als het mag: ik ben maar
5 een wetenschapper, en geen econoom.

Bekende stand der techniek:

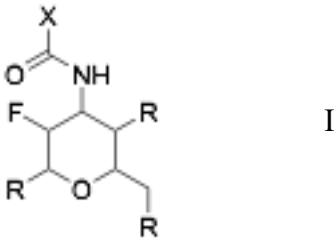
Eigenlijk ligt ons eigen vorige verhaal beschreven in D1 hier het dichtst bij, waarin we ontdekten dat de fluor überhaupt werkt op het natuurlijk voorkomende siaalzuur. Als herinnering voeg ik als
10 D1 de conclusies bij die we toen verleend hebben gekregen. Er speelden daar wel wat zaken die hier niet spelen, maar dat weet je vast nog wel. Zo hadden we toen nog niet door dat er maar 1 halogeen nodig is, omdat we het mechanisme van inhibitie nog niet begrepen. We kwamen daarnaast een artikel uit de populaire serie “reacties met *n*-butylchloroformaat” tegen. In aflevering 42 maken ze een carbamaat van een fluor-suiker dat we zelf voor de lol
15 hadden ingestuurd. We zijn grote fans van de serie. Dit artikel heb ik bijgevoegd als D2. Verder is er niets te vinden, terwijl we uitputtend onderzoek hebben gedaan.

Hieronder staan wat structuren ter illustratie, want er is nog ruimte op het formulier. De
20 middelste kan het resultaat zijn van slordige synthese, maar er is geen reden om aan te nemen dat zo een tussenvorm niet functioneel zou zijn.

				
Q is F; elke R is H; X is <i>tert</i> -butyl (nr. 13)	Q is Br; elke R is Ac; X is isopropyl	Q is F; 1 R is Ac, 2 zijn H; X is ethyl	Elke R is H, handig voor snelle werking	Q is Cl; elke R is H; X is <i>sec</i> -butyl

D1 - verleende EP claims van een vorige aanvraag van dezelfde uitvinders

1. Verbinding volgens formule I



- 5 waarin X een C₁₋₈ alkaan is;
 waarin elke R afzonderlijk gekozen is uit OH of F;
 met de voorwaarde dat de verbinding tenminste twee OH groepen heeft.
2. Verbinding volgens conclusie 1, waarin X methyl is, bij voorkeur waarin elke R OH is.
3. Verbinding volgens conclusie 1, waarin de verbinding is gekozen uit verbindingen volgens formule I, waarin:
- 10 X methyl is, en elke R OH is;
 X isopropyl is, en elke R OH is;
 X cyclohexyl is, en elke R OH is; of
 X 2,2,4-trimethylpentyl is, en elke R OH is.
4. Verbinding volgens een van conclusies 1-3, voor gebruik als geneesmiddel, bij voorkeur
- 15 voor toepassing bij de behandeling van kanker.
5. Verbinding voor gebruik volgens conclusie 4, voor het voorkomen of verminderen van aan kanker geassocieerde fenomenen.
6. Samenstelling omvattende een verbinding volgens een van de conclusies 1-3 en een farmaceutisch aanvaardbaar draagmiddel.
- 20 7. Samenstelling volgens conclusie 6, waarin de samenstelling is geformuleerd voor orale toediening, bij voorkeur waarin de samenstelling drie keer per dag wordt toegediend.
8. Samenstelling volgens conclusie 6 of 7, verder omvattende 0,05-0,1 vol.-% smaakstof.
9. Samenstelling volgens een van conclusies 6-8, voor gebruik als geneesmiddel.

D2

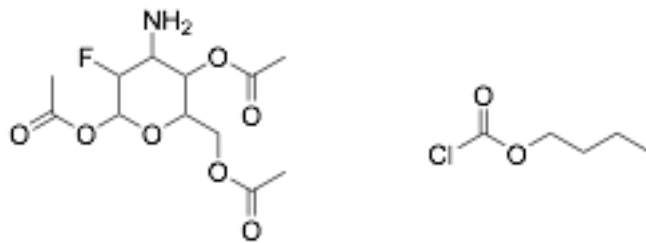
Reacties met *n*-butylchloroformaat, aflevering 42:

6-(acetoxymethyl)-4-amino-3-fluortetrahydro-2H-pyraan-2,5-diyldiacetaat

M. Mathers, O. Jackson, C. Broadus, Dr. A. Young

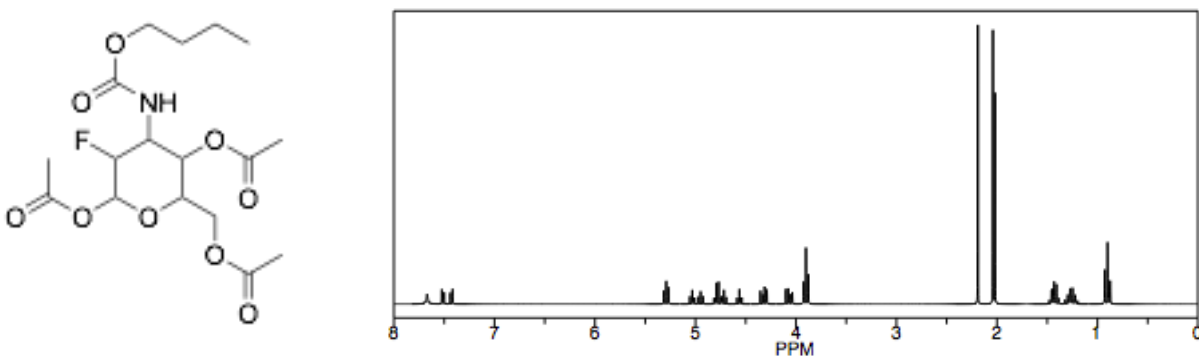
5

Welkom bij aflevering 42 van dit systematische onderzoek naar de reactiviteit van *n*-butylchloroformaat. Deze keer heeft een lezer een vreemde suiker ingestuurd waarvan we geen idee hebben waar die goed voor is. Maar dat kan ons niet schelen, want onze enige interesse is: reageert het met *n*-butylchloroformaat?



10

De suiker staat hierboven weergegeven, naast de hoofdpersoon van deze serie. We hebben 30 mg suiker opgelost in 10 mL ethyl acetaat met 1 equivalent base (DiPEA), en daarna 14 mg (1,1 equivalent) chloroformaat toegevoegd. Na geschud met de scheitrechter (zie afleveringen 1, 3, en 12) kregen we het prachtige molecuul hier beneden, met NMR-spectrum er naast (CDCl₃).



15

Het werkt dus! Elke vakman zal nu verwachten dat daarom alle C₁₋₈-chloroformaten zullen reageren met dit vreemde molecuul. Tot de volgende keer. En zoals altijd kun je ons je moleculen sturen, wie weet testen we in een volgende aflevering de jouwe.