

UITWERKING OEFEN Tentamen blok FA-308 (cursus 2007/2008)

LET OP!

- Dit tentamen bevat 5 vragen, de vierde vraag telt ook mee voor “rekenvaardigheden”
- Alle vragen op een apart vel maken (i.v.m. het snel nakijken door diverse docenten)
- Bij dit tentamen (het laatste vel) zit ook ruitjespapier. Dit kun je gebruiken voor vraag 3. Vergeet het niet bij de antwoorden bij te sluiten.
- Bijlage:
 - a. Bijlage I: Kinetiekformules
 - b. Bijlage II: statistiekformules
 - c. Bijlage III: statistiektabellen
 - d. Bijlage IV: IB-tekst Anafranil tabletten
- Er wordt aanbevolen het tentamen eerst globaal door te lezen: de vragen kunnen wat betreft moeilijkheidsgraad verschillend zijn.
- Er zijn in totaal 100 punten te verdienen
- Geef duidelijk maar bondig antwoord op de gestelde vragen respectievelijk opdrachten. Bij de beoordeling en becijfering wordt gelet op volledigheid van het antwoord, op de afwezigheid van overbodige en niet ter zake doende informatie en op de juistheid en precisie van de formulering van het antwoord. Beargumenteer uw antwoord altijd. De uitslag wordt bekend gemaakt via studiezaken en op WebCt. Inkijken van het tentamen is alleen mogelijk na het maken van een afspraak. Zet op elk vel, dat je inlevert, je naam, studentnummer en plaatsnummer.

<opmerking m.b.t. het oefententamen: Per cursusjaar 2007/2008 is het blok herzien. Een aantal onderdelen van dit tentamen worden niet meer behandeld en zullen dus ook niet in nieuwe toetsen gevraagd worden. Andere onderdelen hebben een sterkere nadruk gekregen. Er zullen dus ook ander soort vragen gesteld gaan worden.>

Vraag 1

Insuline is een zgn. peptide geneesmiddel, wat gebruikt wordt voor diabetes patiënten.

Leg uit wat een peptide geneesmiddel is. Beschrijf globaal hoe insuline opgebouwd is.

- A. De sterkte van Insuline wordt vaak nog uitgedrukt in IE of units. Waarom is dit het geval, waarvoor staat de afkorting IE.
- B. De werkingduur van een insuline injectie kan beïnvloed worden door de gemaakte formulering. Geef aan via welke mechanismen dit kan gebeuren, en hoe de werkingsduur van insuline in de farmacotherapie ingedeeld is (=hoeveel uren worden de diverse vormen geacht te werken).
- C. Voor de herkomst van de grondstof insuline zijn drie bronnen, noem deze drie bronnen en motiveer welke je het liefst zou gebruiken voor een insuline bereiding.
- D. Insuline heeft een IEP van 5.3-5.4. Waarvoor staan de letters IEP en wat is de betekenis hiervan voor de formulering.
- E. Insuline wordt toegediend als subcutane injectie. Omschrijf de eisen t.a.v de osmotische waarde, de pH, de buffercapaciteit, de pyrogenen en deeltjes.
- F. Voor een injectie geldt de eis steriliteit. Hoeveel micro-organismen mogen er maximaal in de injectie aanwezig zijn? Wat verstaan we onder de eis steriel, zoals die door apothekers gebruikt wordt? Insuline zit vaak in herbruikbare vials (=flesjes). Noem een conserveermiddel waarvan mogelijk gebruik gemaakt zou kunnen worden om steriliteit ook bij meerdere keren gebruik te garanderen.

<Het bovenstaande onderdeel wordt niet meer getoetst in FA308 m.i.v. de cursus 2007/2008.>

Vraag 2

U krijgt opdracht om een analyse van een nieuw geneesmiddel in biologische monsters (m.n. plasma) te ontwikkelen. Er wordt besloten om 2 verschillende benaderingen te onderzoeken om uiteindelijk daaruit de beste te kunnen kiezen.

Enige eigenschappen van het nieuwe geneesmiddel :

$pK_a(\text{COOH}) = 4,0$; $\epsilon_{\text{max}} = 5000$ bij $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$; $MW = 284 \text{ D}$

A De eerste benadering zou gebaseerd moeten zijn op **RP-HPLC met UV detectie met gebruik van SPE**. Bespreek alle stappen (met een korte toelichting) die u moet volgen om op systematische wijze de HPLC methode voor de analyse van het nieuwe geneesmiddel in plasma te ontwikkelen. Betrek daarbij ook de mogelijke aanwezigheid van gevormde metabolieten.

We hebben een RP-HPLC systeem b.v. een 10-cm C18 kolom met 5 μm deeltjes ; een fixed-loop van b.v. 5 μl ; we gaan meten bij $\lambda = 254 \text{ nm}$; samenstelling eluens (zie Stap 1a) ; flow rate 0,5-1,0 ml/min ; hieronder is de procedure beschreven als geen interne standaard wordt toegevoegd.

Met een interne standaard is het iets gecompliceerder : de interne standaard moet op het geneesmiddel lijken d.w.z. hetzelfde extractie- en detectiegedrag hebben maar moet een andere retentietijd bezitten

Stap 1a : ontwikkel een HPLC systeem waarbij het nieuwe geneesmiddel een redelijke retentietijd krijgt (capaciteitsfactor k' van 2-8) ; eluens zou b.v. kunnen zijn 30% AN/water met een lage pH b.v. pH = 2,0 (geneesmiddel is dan redelijk, voor 99%, ongeladen)

Stap 1b : ontwikkel een SPE systeem, C18 materiaal (activeren, monster/geneesmiddel opbrengen in zuur milieu b.v. pH = 1, wassen (verwijderen van verontreinigingen), desorberen van geneesmiddel met een (vluchtig) oplosmiddel of pH eluens verhogen, droogdampen onder N_2 , opnemen in eluens)

Stap 2 : welke concentraties zijn te verwachten in plasma b.v. 0,1-10 $\mu\text{g/ml}$; maak een ijklijn (in eluens) in het 0,02-50 $\mu\text{g/ml}$ gebied (dus iets ruimer) door het injecteren van "academische" standaarden in de HPLC

Stap 3 : herhaal Stap 2 maar nu met SPE ; door het inbrengen van de SPE stap zal de helling van de ijklijn iets kleiner worden t.g.v. verlies bij de SPE

Stap 4 : herhaal Stap 3 (met SPE) maar nu met gespiked plasma (eiwitten worden verwijderd en het geneesmiddel gevangen) ; de helling van de ijklijn zal wederom iets kleiner zijn dan bij Stap 3 door het werken met plasma (de overall recovery kan worden berekend)

Stap 5 : meet echte plasma-monsters na SPE, bereken de echte concentraties en construeer b.v. een farmacokinetische curve

Metabolieten (zijn polairder) zullen altijd vóór de parent piek in het chromatogram liggen en zullen zeer vermoedelijk bij 254 nm detecteerbaar zijn.

B Bij de andere benadering is gekozen voor een **competitieve immunoassay**, waarbij dus gebruik wordt gemaakt van antilichamen. Bespreek alle stappen (met een korte toelichting) die u moet volgen om op systematische wijze deze methode voor de analyse van het nieuwe geneesmiddel in plasma te ontwikkelen. Betrek daarbij ook de mogelijke aanwezigheid van gevormde metabolieten.

We hebben nodig een Ab tegen het haptene Hp (=nieuwe geneesmiddel), gelabeld haptene (Hp); zou een fluorescentie label kunnen zijn; antilichamen opwekken door het haptene te koppelen aan een groot eiwit (gedraagt zich dan als immunogeen/antigeen): inspuiten bij een dier om polyclonale antilichamen op te wekken; daarna de Abs isoleren: de haptene-specifieke antilichamen selecteren b.v. met immunoaffiniteits purification; er kan direct worden gemeten in plasma: er is geen monstervoorbewerking nodig; tijdens de metingen b.v. in een 96-wells microtiterplaat wordt er een ijklijn (direct in plasma) gemaakt en worden echte monsters extra meegenomen door deze b.v. 10x en 100x te verdunnen*

Stap 1 : immobiliseer het Ab (tegen Hp) in de wells van een microtiterplaat (blokken van open plaatsen met b.v. caseïne en wassen)

Stap 2 : maak een “competitieve ijklijn” door plasma te spiken met een bekende [Hp] en een bekende [Hp*] toe te voegen ; er treedt competitie op om een beperkte hoeveelheid bindingsplaatsen van de antilichamen ; sigmoïde ijklijn met een groot signaal bij lage concentraties [Hp] en een laag signaal bij hoge [Hp]

Stap 3 : voeg toe aan een echt monster met een onbekende concentratie [Hp] in de well een bekende concentratie [Hp*] toe ; wacht tot er evenwicht is opgetreden (b.v. na enkele uren) ; daarna wassen

Stap 4 : meet b.v. in een microtiterplaat reader de hoeveelheid gelabeld [Hp*] die gebonden is ; als [Hp] klein is, is er veel [Hp*] gebonden en is dus het signaal groot

Metabolieten : het is mogelijk dat bij de immunoassay ook metabolieten worden gemeten als ze dezelfde epitooop bezitten

C Maak een sterkte-zwakte analyse door beide methoden kritisch met elkaar te vergelijken te vergelijken en maak duidelijk op grond van welke argumenten u voorkeur voor één van de methoden zou kunnen hebben.

HPLC met SPE : bewerkelijk maar grotendeels automatiseerbaar ; SPE kolommetjes gebruiken om te onteiwitten en te isoleren ; deze zijn relatief duur ; iedere analyse duurt b.v. 5-15 min ; meerdere metingen tegelijk is niet mogelijk ; metabolieten altijd te zien ; detectiegrens vermoedelijk in het ng/ml gebied ($\epsilon_{\max} = 5000$).

Competitieve immunoassay : geen voorbereiding nodig ; duurt enige tijd voor er gemeten kan worden ; vermoedelijke detectielimiet ng/ml ; antilichamen zijn duur ; kwaliteit van polyclonale antilichamen kan variëren ; meerdere metingen tegelijk is mogelijk ; metabolieten kunnen kruisreactief zijn

Tijdens de ontwikkelingsfase van het geneesmiddelen zou de voorkeur HPLC kunnen zijn (geringe aantallen monsters)

In een ziekenhuis (met grotere aantallen monsters) zou de immunoassay de voorkeur kunnen hebben.

Vraag 3

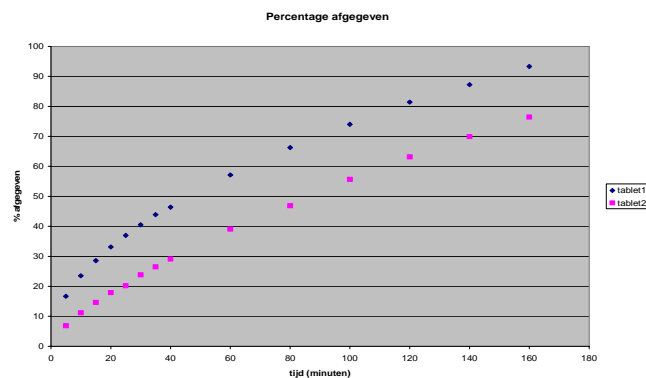
De firma Keunijnepil N.V. overweegt een nieuw tablet op de markt brengen. Het gaat om tabletten met vertraagde afgifte voor grote konijnen (Vlaamse reuzen).

A Noem minimaal 3 nadelen voor het gebruik van tabletten t.o.v andere toedieningsvormen.

- Slikproblemen
- Misselijkheid en braken
- Moeilijke aanpassing van de dosering

De productie van de tabletten is momenteel in een experimenteel stadium. Men wil onderzoeken volgens welke kinetiek de vertraagde afgifte van de experimentele tabletten verloopt. Van twee verschillende preformuleringen wordt de afgifte in vitro bepaald. (Beide tabletten bevatten 125mg Itrosamab)

De resultaten zijn in de onderstaande tabel en figuur uitgewerkt. Let goed op de assen!



	Tablet 2	Tablet 1
Tijd (minuten)	%afgegeven	%afgegeven
5	6.882113	16.71155
10	11.18003	23.51757
15	14.64491	28.56438
20	17.91198	33.13515
25	20.2	36.9926
30	23.8462	40.54498
35	26.50149	43.9039
40	29.0981	46.39039
60	39.09791	57.12877
80	46.85562	66.2703
100	55.64775	74.03699
120	63.14987	81.4
140	69.93785	87.24471
160	76.45408	93.31045
180	83.71392	99.28142

B Welke tablet heeft de snelste afgifte?

Tablet 1: deze lijn heeft over het hele tijdsbestek meer afgegeven

C Van welke tablet is de afgifte zuiver Ficks? Om deze vraag te beantwoorden kan men eventueel gebruik maken van het ruitjespapier. Vergeet dit niet in te leveren samen met de antwoorden.

Tablet 1: de tablet waarvan de afgifte volgens een rechte verloopt (indien de afgifte wortel-t wordt uitgezet) of helling 0.5 (indien de logafgifte-logtijd wordt uitgezet)

D De eerder genoemde tabletten met vertraagde afgifte zijn uiteindelijk toch niet op markt gekomen. Veel konijnen kregen n.l. last van darmirritaties. Besloten wordt om de experimentele verbinding te vervangen voor een pro-drug (Pre-itrosamab), zodat de kans op deze bijwerking wordt verkleind. Noem 5 andere **algemene** redenen voor de keuze van een prodrug.

Farmaceutisch

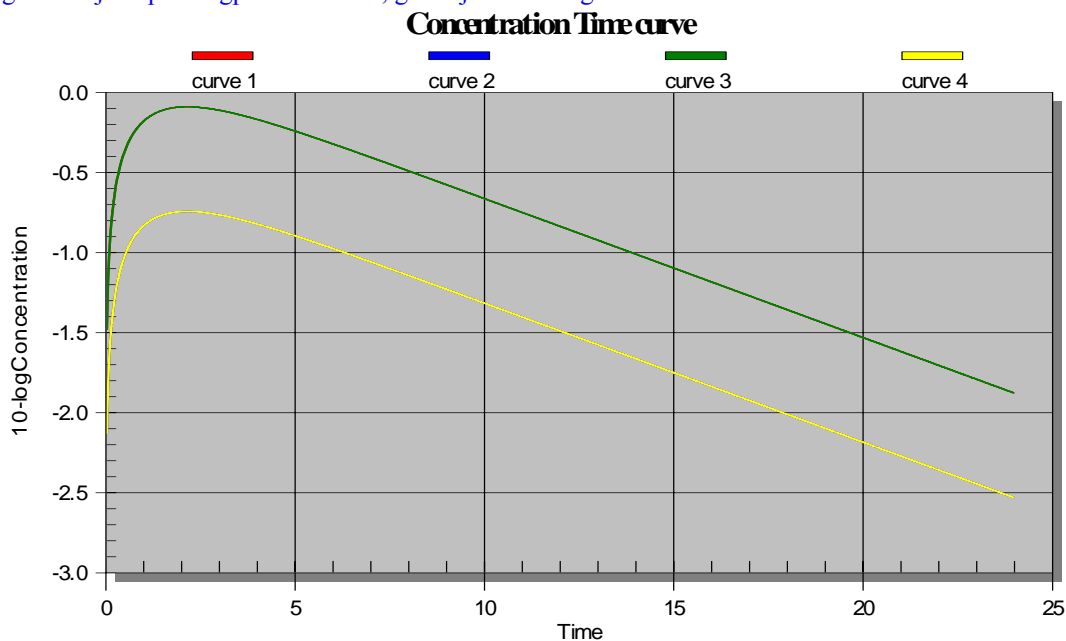
- Onaangename smaak
- Pijn op plaats van injectie
- Slechte oplosbaarheid
- Instabiel
- Langzame oplossnelheid

Farmacokinetisch

- Slechte beschikbaarheid
- Te korte werkingsduur
- First pass effect
- Toxiciteit, bijwerkingen

E Het Pre-itrosamab (de prodrug dus van Itrosamab) wordt verder onderzocht. Er worden testen gedaan. Onderstaande figuur geeft het Pre-itrosamab-plasmaverloop weer na toediening van een Pre-itrosamabtablett aan een konijn. Let op dit is een logaritmische schaal! De dosis was 125 mg, $V_d=100L$, K_a is 0.9 per uur en de K_e is voor Pre-Itrosamab 0.2 per uur. Pre-itrosamab wordt voor 100% gemetaboliseerd tot Itrosamab. Het verdeelingsvolume van Itrosamab is hetzelfde als dat van Pre-itrosamab. De K_e van itrosamab is echter veel groter (0.90 per uur). De K_f van itrosamab is hetzelfde als de K_e van Pre-Itrosamab. Alle Pre-Itrosamab wordt omgezet in Itrosamab. Neem onderstaande figuur over en schets daarin het Itrosamab-plasma verloop na toediening van een tablet Pre-Itrosamab aan een konijn. Geef duidelijk aan welke parameters en hoe die parameters veranderen. Verklaar u antwoord duidelijk.

groene lijn is prodrugpre-itrosamab; gele lijn is de drug itrosamab.



Er is bij konijnen sprake van FRLE (formation rate limited elimination)... De curve voor itrosamab (geel) wordt lager, de K_e blijft hetzelfde. (Evenwijdige lijnen!)

opmerking: FRLE is niet behandeld in de cursus van sept2007-jan2008

F

In dit voorbeeld zijn de verdeelingsvolumina van de metaboliet (Itrosamab) en de prodrug (Pre-itrosamab) even groot. Geef een verklaring voor het feit dat in de praktijk na levermetabolisme het verdeelingsvolume van de metaboliet vaak kleiner is dan het verdeelingsvolume van de prodrug .

Het doel van levermetabolisme is in het algemeen het hydrofieler maken van het farmacon om de renale terugresorptie te verminderen. In dien een stof hydrofieler wordt (hydroxylering, demethylering etc.) zal het verdeelingsvolume in het algemeen kleiner worden. (Minder verdeling naar het vet...)

Vraag 4

Wordt **ook** afzonderlijk beoordeeld voor het portfolio (rekenvaardigheid). Laat duidelijk de logische gang van de berekening zien. Let ook op de significante cijfers. Zie ook bijlage II en III!

A. Uit een grote hoeveelheid nieuw gemaakte tabletten wordt door persoon A op basis van 20 tabletten het 95%-betrouwbaarheidsinterval voor het gemiddelde gehalte van de stof statistizepam berekend op 235,1-245,3 mg. Persoon B meet de gehalten van 10 andere tabletten die uit dezelfde voorraad komen en vindt o.a. dat drie tabletten gehalten hebben van 225, 255 en 258 mg. Persoon B concludeert dat persoon A waarschijnlijk een *verkeerde berekening* heeft gemaakt. Heeft hij gelijk? Licht toe.

(3 punten)

Nee, dat kan niet geconcludeerd worden. Persoon B kijkt naar *individuele* tabletten terwijl een betrouwbaarheidsinterval betrekking heeft op het gemiddelde. Het is heel normaal dat afzonderlijke tabletten waarden hebben die ver buiten het 95%-bhi liggen.

B. Persoon A constateert dat het gemiddelde van 240,2 in het betrouwbaarheidsinterval ligt en daarom de afwijking van gedeclareerd *niet significant* is. Heeft hij gelijk? Licht toe.

(2 punten)

Nee, om daarover een uitspraak te doen moet je kijken of het *gedeclareerde* gehalte binnen het 95%-bhi ligt en niet het *gevonden* gemiddelde (ligt *altijd* in het 95%-bhi)

C. Persoon B vindt in de 10 tabletten een gehalten spreiding die iets kleiner is dan die in de 20 tabletten van persoon A en is daarover niet verbaasd. Persoon A denkt dat persoon B een *grotere* spreiding had moeten vinden en bij de gehaltenbepalingen mogelijk fouten heeft gemaakt. Wie heeft gelijk? Licht toe.

(3 punten)

Persoon B heeft gelijk. Beide steekproeven zijn uit dezelfde voorraad en in beide steekproeven wordt een schatting gemaakt van dezelfde grootte, namelijk de werkelijke gehalten spreiding. Met 10 tabletten verwacht je gemiddeld genomen dus een *even grote* gehalten spreiding als met 20 tabletten. Met 20 tabletten is de schatting over het algemeen beter, maar niet noodzakelijkerwijs kleiner of groter. (*Vaak wordt foutief gedacht dat de sd kleiner wordt bij grotere steekproeven, maardat geldt voor de sem.*)

D. Er worden voor de zekerheid twee nieuwe steekproeven tabletten genomen uit dezelfde voorraad en alle gehalten worden bepaald door persoon C. Als met een betrouwbaarheid van 95% getoetst wordt, hoe groot is dan de kans dat met de *F*-toets een *significant verschil* in gehalten spreidingen tussen beide nieuwe steekproeven wordt gevonden? Licht toe.

(2 punten)

Die kans is 5%. In werkelijkheid is er geen verschil en als getoetst wordt met $\alpha=5\%$, betekent dit dat in 5% van de toetsen een significant verschil gevonden wordt dat er in werkelijkheid niet is.

Vraag 5

Anafranil tabletten

in de IB-tekst (wetenschappelijke bijsluiter) kunt u informatie vinden over de samenstelling van geneesmiddelen. De bijlage (IV) toont u deze informatie van Anafranil tabletten.

A. Benoem de functie van de hulpstoffen van de Anafranil 10 mg tabletten. Licht het antwoord toe, en geef aan of alle belangrijke hulpstoffen aanwezig zijn in de formulering.

goede antwoorden

vulmiddelen: lactose, sucrose

desintegratiemiddelen: maiszetmeel, cellulose, copovidon

bindmiddel: copovidon, hypromellose, macrogol

glijmiddel: magnesium stearaat, colloidaal silicium dioxide

smeermiddel: magnesium stearaat, talk

anti-adhesiemiddel: Mgstearaat, talk, zetmeel, cellulose

omhulling: macrogol, povidon, copovidon

kleurstoffen: titaandioxide, geel ijzeroxide

alles zit er

B. Anafranil Retard tabletten bevatten het copolymeer van ethylacrylaat en methyl-metacrylaat. Beschrijf hoe de toevoeging van zo'n soort polymeer aan de tabletformulering kan leiden tot een tablet met gereguleerde afgifte.

elementen in een goed antwoord: toevoeging van polymeer voorkomt uiteenvallen van tablet, en vormt een gelachtige massa in/rond de tablet, oplossen en diffusie van farmacon vanuit de tablet wordt vertraagd, daarmee wordt uiteindelijk bereikt dat de afgiftesnelheid veel langzamer is en daarmee uiteindelijk ook de absorptiesnelheid van het farmacon vanuit de darm-> circulatie.

C. De afgifte van Anafranil uit de tabletten kan bepaald worden met een dissolutietest. Welke keuzes zou u maken als u de afgifte uit Anafranil retard tabletten gaat onderzoeken? Beschrijf uw criteria voor belangrijke randvoorwaarden in zo'n test, zoals type test, samenstelling v/h incubatiemedium, duur van het experiment, en afgifte-criteria. Geef een korte toelichting bij de door u genoemde aspecten.

belangrijke elementen v/h antwoord:

type test: meerdere antwoorden mogelijk, vaak wordt doorstroom test aanbevolen voor CR ivm sinkcondities (bij slecht oplosbare farmaca).

pH: vertraagde afgifte vindt vaak grotendeels plaats bij hogere pH (<1h: in de maag, dus lage pH is representatief; >1h: pH 6.8 of zo iets)

duur v/h experiment: langduriger testen, dus niet 45min zoals bij Immediate release tabletten.

afgifte criteria: er wordt een eis gesteld aan de afgifte op einde van de studie, bijvoorbeeld >75%, maar ook een eis aan mbt maximale afgifte op vroeg tijdstip, (afgifte<Q). Meestal wordt de afgifte gerelateerd aan streefwaardes op 3 tijdstippen die door fabrikant gespecificeerd zijn.

04 JAN 2007

 NOVARTIS

SmPC
Anafranil®

3 januari 2007
pagina 1

1. Naam van het geneesmiddel

ANAFRANIL[®], omhulde tabletten 10 mg

ANAFRANIL[®], omhulde tabletten 25 mg

ANAFRANIL[®] Retard 75, deelbare tabletten met gereguleerde afgifte 75 mg



2. Kwalitatieve en kwantitatieve samenstelling

Het werkzame bestanddeel is clomipraminehydrochloride.

Eén omhulde tablet bevat 10 mg of 25 mg clomipraminehydrochloride.

Eén tablet met gereguleerde afgifte bevat 75 mg clomipraminehydrochloride.

Voor een volledige lijst van hulpstoffen, zie rubriek 6.1.

3. Farmaceutische vorm

Anafranil, omhulde tabletten 10 mg:

Omhulde tablet

Licht geel, driehoekvormig, biconvex.

Anafranil, omhulde tabletten 25 mg:

Omhulde tablet

Licht geel, rond, biconvex, één zijde bedrukt met "CG", de andere zijde bedrukt met "FH" in bruine inkt.

Anafranil Retard 75, deelbare tabletten met gereguleerde afgifte 75 mg:

Tabletten met gereguleerde afgifte.

Roze, in vorm van capsule, biconvex, deelstreep aan beide zijdes, één zijde bedrukt met "CG", de andere zijde bedrukt met "GD".

6. Farmaceutische gegevens

6.1. Lijst van hulpstoffen

Anafranil, omhulde tabletten 10 mg:

lactosemonohydraat, maïszetmeel, siliciumdioxide (colloïdaal) (E551), talk (E553B), magnesiumstearaat (E470B), hypromellose (E464), copovidon, cellulose (microkristallijn) (E460), titaandioxide (E171), geel ijzeroxide (E172), macrogol 8000, povidon (E1201), sucrose.

Anafranil, omhulde tabletten 25 mg:

lactosemonohydraat, maïszetmeel, stearinezuur (E570), siliciumdioxide (colloïdaal) (E551), talk (E553B), magnesiumstearaat (E470B), hypromellose (E464), copovidon, cellulose (microkristallijn) (E460), titaandioxide (E171), geel ijzeroxide (E172), macrogol 8000, povidon (E1201), sucrose, glycerol (E422), bruine printinkt.

Anafranil Retard 75, deelbare tabletten met gereguleerde afgifte 75 mg:

siliciumdioxide (colloïdaal) (E551), calciumfosfaat (E341), calciumstearaat (E470A), copolymeer van ethylacrylaat en methyl-methacrylaat, hypromellose (E464), macrogolglycerol hydroxystearaat, rood ijzeroxide (E172), titaandioxide (E171) en talk (E553B).

toelichting op hulpstoffen:

-hypromellose (=hydroxypropylmethylcellulose), copovidon, macrogol en povidon zijn polymeren