



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0715317-1 A2



* B R P I 0 7 1 5 3 1 7 A 2 *

(22) Data de Depósito: 28/09/2007

(43) Data da Publicação: 09/07/2013
(RPI 2218)

(51) Int.Cl.:

C07K 14/785

A61P 11/00

A61K 38/16

(54) Título: SURFACTANTES RECONSTITUÍDOS COM
PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS

(30) Prioridade Unionista: 13/10/2006 EP EP 06021521.7

(73) Titular(es): CHIESI FARMACEUTICI S.P.A

(72) Inventor(es): Bengt Robertson, Jan Johansson, Tore
Curstedt

(74) Procurador(es): CARLOS VICENTE DA SILVA
NOGUEIRA

(86) Pedido Internacional: PCT IB2007002841 de 28/09/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/044109de
17/04/2008

(57) Resumo: SURFACTANTES RECONSTITUÍDOS COM
PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS. A presente invenção consiste
de um surfactante reconstituído englobando um carreador lipídico e
uma combinação de um análogo peptídico específico do surfactante
natural SP-C com um análogo peptídico específico do surfactante
natural SP-B. A invenção também trata dos referidos compostos
farmacêuticos e de seu uso para o tratamento ou profilaxia da SDRe
outras patologias pulmonares.

SURFACTANTES RECONSTITUÍDOS COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção consiste de um surfactante reconstituído englobando um carreador lipídico e uma combinação de um análogo peptídico específico do surfactante natural SP-C com um análogo peptídico específico do surfactante natural SP-B.

A invenção também trata dos referidos compostos farmacêuticos e de seu uso para o tratamento ou profilaxia da SDR e outras patologias pulmonares.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

O pulmão humano é composto por um grande número de pequenos sacos aéreos denominados alvéolos, nos quais ocorre troca gasosa entre o sangue e as cavidades aéreas dos pulmões. Em indivíduos saudáveis, esta troca é mediada pela presença de um complexo de surfactante contendo proteína que evita o colapso dos pulmões ao final da expiração.

O complexo de surfactante pulmonar é composto primariamente de lipídeo e contém quantidades menores de várias proteínas. A ausência de níveis adequados de surfactante resulta em mau funcionamento pulmonar. Esta síndrome é denominada síndrome de desconforto respiratório (SDR) e comumente afeta recém-nascidos pré-termo.

A referida síndrome é tratada efetivamente com preparações de surfactante natural modificado extraídas de pulmões de animais.

As preparações de surfactante modificado disponíveis comercialmente são, por exemplo, Curosurf, derivado de pulmões de porcos; Infasurf, extraído de lavado pulmonar de bezerros; e Survanta, um extrato pulmonar natural bovino modificado quimicamente.

Os constituintes principais desses surfactantes são fosfolipídeos, tais como a 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina, comumente conhecida como dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), o fosfatidilglicerol (PG) e as proteínas hidrofóbicas surfactantes B e C (SP-B e SP-C).

Devido às desvantagens das preparações de surfactantes derivadas de tecidos animais, como complicações nos processos de produção e esterilização e a possível indução de reações imunomediadas, têm sido desenvolvidos surfactantes sintéticos que mimetizam a composição dos surfactantes naturais. Tais surfactantes são denominados surfactantes reconstituídos.

No entanto, o desenvolvimento de surfactantes reconstituídos clinicamente ativos tem se tornado um processo complicado, uma vez que as proteínas hidrofóbicas naturais são grandes demais para serem sintetizadas, são estruturalmente complexas e instáveis em sua forma pura.

No intuito de substituir as referidas proteínas hidrofóbicas naturais, alguns polipeptídeos sintéticos parcialmente correspondentes a suas seqüências e análogos das

mesmas foram propostos em estudos prévios e são apresentados, por exemplo, nas patentes WO 89/06657, WO 92/22315, WO 98/49191, WO 95/32992, US 6.660.833, EP 413.957 e WO 91/18015.

A patente WO 00/47623 apresentou polipeptídeos sintéticos que são análogos da proteína SP-C, em que: i) os resíduos de cisteína nas posições 5 e 6 foram substituídos por resíduos de Ser; ii) os resíduos de Val da 'região central' da SP-C foram substituídos por outros resíduos neutros e hidrofóbicos selecionados do grupo da Leu, Ile e norleucina (nL); iii) alguns dos aminoácidos neutros presentes na 'região central' da SP-C foram substituídos por resíduos volumosos ou polares selecionados a partir do grupo formado por Lys, Try, Phe, Tyr e Ornitina.

Tais polipeptídeos artificiais são caracterizados por serem capazes de se enovelar, assim como a proteína natural SP-C e, com isso, interagir adequadamente com os lipídeos surfactantes e não dar origem a auto-oligomerização.

A patente WO 00/76535 refere-se genericamente a preparações de surfactantes pulmonares contendo ao menos uma modificação da proteína SP-B associada a pelo menos uma modificação da proteína SP-C.

Em Waring AJ et al. (resumo apresentado na Reunião Anual da Sociedade da Academia de Pediatria, realizada em São Francisco de 29 de abril a 2 de maio de 2006), um estudo foi conduzido visando a examinar a atividade de um surfactante sintético constituído da SP-Cff, que mimetiza a SP-C e que é uma proteína SP-C sintética de 34 resíduos em que a fenilalanina toma o lugar da cisteína nas posições 4 e 5, e a SP mini-B, que mimetiza a SP-B.

No entanto, de acordo com a literatura disponível, em estudos animais, o tratamento com surfactantes reconstituídos dá origem a volumes reduzidos de gases pulmonares e baixos graus de abertura alveolar ao fim da expiração, sendo necessária ventilação mecânica com pressão positiva expiratória final (PEEP) com o fim de atingir uma atividade in vivo comparável àquela obtida com surfactantes naturais modificados (Johansson J et al. J Appl Physiol, 2003 (95), 2055-2063; Davis AJ et al. Am J Respir Crit Care Med, 1998 (157), 553-559). As preparações de surfactante reconstituído não são de fato capazes de formar uma película fosfolipídica estável nos alvéolos ao fim da expiração. Todos os documentos acima mencionados não se pronunciam sobre o problema da abertura alveolar ao fim da expiração e sobre o efeito das preparações por eles apresentadas.

Assim sendo, há ainda uma necessidade não contemplada de um surfactante reconstituído com propriedades aperfeiçoadas em termos de complacência pulmonar.

Em especial, há necessidade de uma preparação de surfactante reconstituído que seja capaz de garantir estabilidade alveolar e, com isso, manter a abertura alveolar ao fim da expiração sem requerer o uso de ventilação mecânica com PEEP.

Descobriu-se atualmente, e este é o objeto da presente invenção, que análogos específicos da proteína natural SP-C, e preferencialmente os polipeptídeos da patente WO 00/47623, podem ser combinados com vantagem a análogos específicos da proteína SP-B com o propósito de fornecer uma preparação de surfactante reconstituído com propriedades aperfeiçoadas em termos de complacência pulmonar e, em especial, com capacidade de manter de maneira eficaz a abertura dos alvéolos ao fim da expiração sem requerer o uso de ventilação mecânica com PEEP.

Descobriu-se, particularmente, que, em um modelo de SDR em que os recém-nascidos imaturos foram tratados com preparações de surfactante exógeno sem uso concomitante de PEEP, uma combinação dos referidos análogos específicos das proteínas SP-B e SP-C age nos volumes de gases pulmonares, o que serve de índice da abertura alveolar ao fim da expiração.

RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção consiste de um surfactante reconstituído compreendendo um carreador lipídico e uma combinação entre um análogo polipeptídico específico da proteína surfactante natural SP-C e um análogo polipeptídico específico da proteína surfactante natural SP-B.

A invenção é particularmente dirigida a um surfactante reconstituído englobando:

a) um carreador lipídico;

b) um polipeptídeo com ao menos 20 resíduos de aminoácidos e não mais que 40 resíduos de aminoácidos que apresente a seqüência representada pela fórmula geral (I):

$F_e G_e I_f P_f S_g SPVHLKRX_a BX_b (BX_c)_n GALL_n \Omega_p G_p L_p$ (I)

em que:

- X** é um resíduo de aminoácido selecionado independentemente a partir do grupo formado por I, L e nL;
- B** é um resíduo de aminoácido selecionado independentemente a partir do grupo formado por K, R, H, W, F e Y e Orn;
- S** é substituído opcionalmente com grupos acil contendo 12-22 átomos de carbono, preferencialmente 16 átomos de carbono, ligados à cadeia lateral por uma ponte éster;
- Ω** é um aminoácido selecionado do grupo formado por M ou M oxidado no átomo de enxofre, I, L e nL;
- a** é um número inteiro com valor compreendido entre 1 e 8;

- b** é um número inteiro com valor compreendido entre 1 e 19;
c é um número inteiro com valor independentemente selecionado entre 3 e 8;
e, f, g e p são números inteiros com valor compreendido entre 0 e 1;
n é um número inteiro com valor compreendido entre 0 e 3;

e com a condição de que $X_a B X_b (B X_c)_n$ seja uma seqüência contendo no máximo 22 aminoácidos.

c) um polipeptídeo representado pela formula geral (II):



5 em que:

- Δ** é um resíduo de aminoácido selecionado independentemente a partir do grupo formado por W e L
 Ω é um resíduo de aminoácido selecionado independentemente a partir do grupo formado por M, I, L e nL;
 Φ é um resíduo de aminoácido selecionado independentemente a partir do grupo formado por R e T, preferencialmente R; e
f é um número inteiro com valor compreendido entre 0 e 1.

A invenção também inclui os sais farmacologicamente aceitáveis dos referidos polipeptídeos e seus derivados N- e C-terminais, e.g. via acetilação e amidação.

A invenção é também dirigida aos compostos farmacêuticos referidos e a seu uso para a profilaxia e tratamento de síndrome de desconforto respiratório (SDR) e outras
 10 patologias respiratórias.

Ademais, a invenção se dirige ao uso dos polipeptídeos de fórmula geral (II) para a preparação de um surfactante reconstituído para melhorar a abertura alveolar ao fim da expiração.

Por fim, a invenção fornece um método para a profilaxia e/ou tratamento da
 15 síndrome de desconforto respiratório (SDR) e outras patologias respiratórias, método este que envolve administrar a um paciente que requeira tal tratamento uma quantidade terapeuticamente efetiva de um surfactante reconstituído contendo um carreador lipídico, um polipeptídeo da fórmula geral (I) e um polipeptídeo da fórmula geral (II).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

20 A figura 1 mostra a seqüência da proteína humana SP-C. Os resíduos de Cys são palmitoilados na proteína natural SP-C.

A figura 2 mostra a seqüência da proteína humana SP-B.

A figura 3 mostra os resultados em termos de volumes de gases pulmonares (ml/kg).

A figura 1 mostra os resultados em termos de volumes correntes (ml/kg) como uma
 25 função de tempo/pressão.

DEFINIÇÕES

A função respiratória após um tratamento *in vivo* com as preparações de surfactante exógeno é avaliada medindo-se dois parâmetros:

- i) o volume corrente, que é um índice da complacência pulmonar; e
- 5 ii) o volume de gases pulmonares, que é um índice da expansão de ar alveolar (ou abertura) ao fim da expiração e, desta forma, da capacidade de formar uma película de fosfolípide estável nos alvéolos ao fim da expiração.

Na presente aplicação, o termo "surfactante reconstituído" significa um carreador lipídico ao qual foram acrescentados análogos polipeptídicos das proteínas surfactantes
10 através de tecnologia recombinante ou métodos sintéticos.

O termo "carreador lipídico" significa uma mistura de fosfolípidos e opcionalmente outros componentes lipídicos como, por exemplo, lípidos neutros, tais como os triacilgliceróis, os ácidos graxos livres e/ou o colesterol.

O termo "análogos polipeptídicos da proteína surfactante natural SP-C" inclui
15 polipeptídeos com uma sequência de aminoácidos em que, comparando-se às proteínas naturais, um ou mais aminoácidos estão ausentes ou foram substituídos por outros aminoácidos, de forma que os polipeptídeos, em uma mistura com um carreador lipídico, apresentam atividade surfactante.

O termo "análogos polipeptídicos da proteína surfactante natural SP-B" inclui
20 peptídeos com uma sequência de aminoácidos em que, comparando-se às proteínas naturais, um ou mais aminoácidos estão ausentes, de forma que os polipeptídeos, em uma mistura com um carreador lipídico, apresentam atividade surfactante.

O termo "mini-B" significa um polipeptídeo com 34 resíduos baseado nos resíduos 8-
25 N-terminais e nos resíduos 63-78 C-terminais da proteína natural SP-B, cuja estrutura foi divulgada genericamente pela primeira vez em uma apresentação retirada do website do Instituto NanoSystems da Califórnia. Sua sequência completa foi apresentada subsequentemente no Banco de Dados de Proteínas RCSB.

Em Waring AJ *et al*, J Peptide Res 2005, 66, 364-374, foram descritas mais informações sobre sua estrutura e atividade.

30 O termo "variantes" significa análogos polipeptídicos do peptídeo Mini-B apresentando uma sequência de aminoácidos em que um ou mais aminoácidos foram substituídos por outros aminoácidos, de forma que os peptídeos, em uma mistura com um carreador lipídico, retêm a atividade da Mini-B.

As sequências de aminoácidos são apresentadas usando-se o código de três letras,
35 com o aminoácido que carrega o grupo amino livre posicionado na extremidade esquerda

(terminal amino) e o aminoácido que carrega o grupo carboxílico livre na extremidade direita (terminal carbóxi).

O termo "sinérgico" significa que a efetividade dos dois polipeptídeos é maior do que seria esperado pela soma de suas respectivas efetividades individuais em um dado estudo.

Todos os resíduos de aminoácidos identificados neste estudo estão em sua configuração natural L e as seqüências aqui identificadas são descritas de acordo com abreviaturas padrão para resíduos de aminoácidos, como mostra a Tabela de Correspondência a seguir:

10

TABELA DE CORRESPONDÊNCIA

Aminoácido	Símbolos	
	Uma letra	Três letras
Glicina	G	Gly
L-prolina	P	Pro
L-isoleucina	I	Ile
L-leucina	L	Leu
L-tirosina	Y	Tyr
L-cisteína	C	Cys
L-triptofano	W	Trp
L-alanina	A	Ala
L-lisina	K	Lys
L-arginina	R	Arg
L-glutamina	Q	Glu
L-metionina	M	Met
L-serina	S	Ser
L-valina	V	Val

L-aspargina	N	Asn
L-ácido aspártico	D	Asp
L-ácido glutâmico	E	Gln
L-histidina	H	His
L-treonina	T	Thr
L-fenilalanina	F	Phe
L-norleucina	-	nLeu
L-ornitina	-	Orn

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção consiste de um surfactante reconstituído compreendendo um carreador lipídico e uma combinação de análogos polipeptídicos específicos da proteína surfactante natural SP-C e análogos polipeptídicos específicos da proteína surfactante natural SP-B, incluindo o peptídeo Mini-B e suas variantes.

Nós descobrimos de fato que, em um modelo de SDR em que o recém-nascido imaturo foi tratado com preparações de surfactante exógeno sem emprego de PEEP, uma associação de um polipeptídeo de fórmula geral (I) com um polipeptídeo de fórmula geral (II) atua positivamente sobre a complacência pulmonar.

Em particular, evidenciou-se que a combinação dos dois polipeptídeos atua de maneira sinérgica nos volumes de gases pulmonares, o que é um índice da abertura alveolar ao fim da expiração.

Tal resultado demonstra que o surfactante reconstituído da invenção é capaz de estabilizar a película de fosfolípide nos alvéolos ao fim da expiração de uma maneira melhor que um surfactante reconstituído compreendendo apenas um análogo da proteína SP-C ou um análogo da proteína SP-B.

Além disso, a preparação de surfactante reconstituído desta reivindicação mostrou melhorar a função respiratória, conforme expresso pelos volumes correntes, em grau comparável ou mesmo discretamente maior que o alcançado após a administração de um surfactante natural modificado.

De preferência, o análogo da proteína natural SP-C é um polipeptídeo com ao menos 20 resíduos de aminoácidos e não mais que 40 resíduos de aminoácidos, contendo a sequência representada pela fórmula geral (I).



em que:

X é um resíduo de aminoácido selecionado independentemente do grupo formado por I, L e nL;

B é um resíduo de aminoácido selecionado independentemente do grupo formado por K, R, H, W, F, Y e Orn;

S é opcionalmente substituído com grupos acil contendo 12-22 átomos de carbono, preferencialmente 16 átomos de carbono, ligados à cadeia lateral por meio de uma ponte éster;

Ω é um resíduo de aminoácido selecionado do grupo formado por M ou M oxidado no átomo de enxofre, I, L e nL;

a é um número inteiro com valor entre 1 e 8;

b é um número inteiro com valor entre 1 e 19;

c é um número inteiro com valor selecionado independentemente entre 3 e 8;

e, f, g e p são números inteiros com valor 0 ou 1;

n é um número inteiro com valor entre 0 e 3;

e com a condição de que $X_aBX_b(BX_c)_n$ seja uma seqüência contendo no máximo 22 aminoácidos, preferencialmente compreendendo entre 10 e 22 aminoácidos.

Preferencialmente, o polipeptídeo de fórmula geral (I) consiste de ao menos 30 e não mais que 35 aminoácidos, mais preferencialmente não mais que 33 aminoácidos.

Em apresentações específicas, os polipeptídeos de fórmula geral (I) consistem de 30 ou 33 ou 35 aminoácidos.

Preferencialmente, o análogo polipeptídico da proteína SP-C é representado pela fórmula geral (Ia), em que e e n são 0, e g é 1



em que::

X, B X, B and Ω são como acima dispostos;

a está entre 1 e 8, preferencialmente entre 1 e 3; mais preferencialmente, 1;

b está entre 1 e 19, preferencialmente entre 5 e 15; mais preferencialmente, 14;

f e p são 0 ou 1.

Mais preferencialmente, o análogo polipeptídico da proteína SP-C é representado pela fórmula geral (Ib), em que f é 1



em que:

X, B, Ω , a e b são como acima dispostos;

p é 0 ou 1.

Mais preferencialmente, o análogo polipeptídico da proteína SP-C é representado pela fórmula geral (Ic)



em que:

Ω é como acima disposto;

p é 0 ou 1.

Exemplos de polipeptídeos da fórmula (Ic) são discriminados abaixo:

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLMGL (Id) (SEQ ID:1)

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLIGL (Ie) (SEQ ID:2)

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLLGL (If) (SEQ ID:3)

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALL n LGL (Ig) (SEQ ID:4)

10 **IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALL (Ih) (SEQ ID:5)**

O polipeptídeo (Id) foi também descrito no estudo prévio como SP-C33.

Mais preferencialmente, o análogo da SP-C é um polipeptídeo selecionado a partir do grupo de polipeptídeos com fórmulas (Ie), (If), (Ig) e (Ih).

Em uma apresentação preferencial da invenção, o polipeptídeo de fórmula geral
15 (I) é o polipeptídeo (If), doravante denominado SP-C33(Leu)³¹.

Favoravelmente, o análogo da proteína natural SP-B consiste de duas porções correspondentes aos resíduos 8-25 do terminal-N e aos resíduos 63-78 do terminal-C da proteína natural SP-B (denominado peptídeo Mini-B) ou uma variante deste.

Mais favoravelmente, o análogo da proteína SP-B é um polipeptídeo representado
20 pela fórmula geral (II):



em que:

Δ é um resíduo de aminoácido selecionado do grupo formado por W e L;

Ω é um resíduo de aminoácido selecionado independentemente do grupo
25 formado por M, I, L e nL;

Φ é um resíduo de aminoácido selecionado do grupo formado por R e T, preferencialmente R; e f é um numero inteiro entre 0 or 1.

Em uma apresentação preferencial da invenção, o análogo de SP-B é um polipeptídeo representado pela fórmula (IIa)

CWLCRALIKRIQAMIPKGGRLPQLVCRLVLRCS (IIa) (SEQ ID:6)

Em outras apresentações da invenção, o análogo de SP-B é selecionado dentre os que apresentam as seguintes fórmulas

CLLCRALIKRIQAMIPKGGRLPQLVCRLVLRCS (IIb) (SEQ ID:7)

CWLCRALIKRIQALIPKGGRLPQLVCRLVLRCS (IIc) (SEQ ID:8)

CLLCRALIKRIQALIPKGGRLPQLVCRLVLRCS (IId) (SEQ ID:9)

5 Em uma apresentação preferencial, os polipeptídeos (IIa), (IIb), (IIc) e (IId) podem estar sob a forma de molécula ligada a um dissulfeto, em que a ligação intramolecular de dissulfeto está entre os dois resíduos Cys nas posições 1 e 33 e/ou entre os dois resíduos Cys nas posições 4 e 27.

O polipeptídeo ligado ao dissulfeto (IIa) foi descrito no estudo como Mini-B oxidado
10 (ox Mini-B).

O polipeptídeo (IIc) é doravante denominado Mini-B (Leu) e sua forma ligada a dissulfeto como ox Mini-B (Leu),

Os polipeptídeos de fórmulas gerais (I) e (II) podem ser preparados por métodos sintéticos ou técnicas recombinantes bem conhecidos pelos profissionais com experiência
15 na área.

Um excelente resumo das muitas técnicas disponíveis pode ser encontrado em Steward JM, Young JD. *Solid Phase Peptide Synthesis*. W.H. Freeman Co., San Francisco, 1969; e Meienhofer, J. *Hormonal Proteins and Peptides*. Vol.2, p. 46, Academic Press (New York), 1983, para síntese de peptídeos de fase sólida; e Schroder E, Kubke K. *The Peptides*.
20 Vol. 1, Academic Press (New York), 1965, para síntese clássica de soluções. Os polipeptídeos da invenção podem também ser preparados usando a técnica de síntese de fase sólida inicialmente descrita por Merrifield, em J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154 (1963). Outras técnicas de síntese de polipeptídeos podem ser encontradas, por exemplo, em Bodanszky M *et al.* "Peptide Synthesis". John Wiley & Sons, 2nd ed, (1976), assim como em outros
25 trabalhos de referência conhecidos dos profissionais com experiência na área.

Grupos de proteção adequados para uso em tais sínteses podem ser encontrados nos textos acima, bem como em McOmie, JFW. *Protective Groups in Organic Chemistry*. Plenum Press, New York, NY (1973).

À guisa de exemplo, os polipeptídeos de fórmula geral (I) podem ser preparados
30 segundo o método apresentado na patente WO 00/47623, ao passo que os polipeptídeos de fórmula geral (II) podem ser preparados segundo o método descrito em Waring AJ, *et al.* J Peptide Res 2005, 66, 364-374.

A invenção também inclui os sais farmacologicamente aceitáveis dos polipeptídeos de fórmulas gerais (I) e (II) e seus derivados bloqueados N- e/ou C-terminais, e.g. via acetilação e amidação.

Os sais farmacologicamente aceitáveis incluem, por exemplo, sais de ácido
5 clorídrico, ácido acético e ácido trifluoroacético.

O surfactante reconstituído da invenção pode ser preparado misturando-se uma solução ou suspensão dos polipeptídeos de fórmula geral (I) e (II) a lipídeos e subsequente-mente secando-se a mistura; eles podem, de outra forma, ser preparados por liofilização ou secagem por atomização.

10 Preferencialmente, os polipeptídeos de fórmula geral (I) e os polipeptídeos de fórmula geral (II) estão presentes nos surfactantes reconstituídos da invenção em uma quantidade fixa e com uma relação quantitativa fixa na forma de uma combinação fixa.

A proporção relativa dos polipeptídeos de fórmulas gerais (I) e (II) no surfactante reconstituído pode variar. Favoravelmente, cada polipeptídeo pode estar presente em
15 uma quantidade compreendida entre 0,5 e 10% do peso do surfactante (p/p), preferencialmente entre 1 e 5%, mais preferencialmente entre 1 e 3%.

Em uma apresentação preferencial, o surfactante reconstituído compreende de 1 a 3% por peso do polipeptídeo (If), de 1 a 3% por peso do polipeptídeo (IIa), preferencialmente na forma oxidada.

20 Em outra apresentação preferencial, o surfactante reconstituído compreende de 1 a 3% por peso do polipeptídeo (If), de 1 a 3% por peso do polipeptídeo (IIc), preferencialmente na forma oxidada.

Favoravelmente, o carreador lipídico compreende os fosfolípidios que estão presentes nas preparações de surfactante pulmonar natural, por exemplo, fosfatidilcolinas
25 (PC), tais como a dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) e o palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC); e fosfatidilgliceróis (PG), como o palmitoil-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG) e o dipalmitoil-fosfatidilglicerol (DPPG).

Outros fosfolípidios que podem ser favoravelmente usados são os fosfatidilinositóis (PI), as fosfatidiletanolaminas (PE), as fosfatidilserinas e as esfingomielinas (SM).

30 Em uma apresentação preferencial, o "carreador lipídico" pode abranger componentes adicionais, por exemplo, lipídeos neutros, tais como os triacilgliceróis, os ácidos graxos livres e/ou o colesterol.

Favoravelmente, o surfactante reconstituído de acordo com a invenção compreende 90 a 99% por peso de um carreador lipídico, preferencialmente 92 a 98%, mais
35 preferencialmente 94 a 96%; e 1 a 10% por peso da soma de ambos os peptídeos, preferencialmente 2 a 8%, mais preferencialmente 4 a 6%.

Em uma das apresentações da invenção, o surfactante reconstituído compreende 96% por peso de um carreador lipídico, 2% por peso de um polipeptídeo de fórmula geral (I) e 2% por peso de um polipeptídeo de fórmula geral (II).

Em uma apresentação preferencial, o carreador lipídico consiste apenas de fosfolipídios, mais preferencialmente de uma mistura de DPPC e um palmitoil-oleil-fosfolipídio selecionado a partir de POPG ou uma mistura deste com POPC em razões de peso que vão de 95:5 a 50:50, preferencialmente de 80:20 a 60:40.

A razão de peso entre DPPC e POPG estende-se preferencialmente desde 75:25 a 65:35, e está mais preferencialmente em 68:31. No caso de misturas DPPC:POPG:POPC, os fosfolipídeos são utilizados preferencialmente em razões de peso de 60:20:20 ou 68:15:16.

Em outra apresentação, o carreador lipídico pode consistir de DPPC, DPPG e colesterol.

Em uma apresentação preferencial da invenção, o surfactante reconstituído compreende de 1 a 5% por peso de um dos polipeptídeos de fórmula geral (Ia), de 1 a 5% por peso de um dos polipeptídeos de fórmula geral (II) e uma mistura de DPPC e POPG em uma razão de peso de 68:31.

A administração do surfactante reconstituído da invenção é realizada com uma técnica conhecida pelo profissional com experiência na área, preferencialmente por instilação por via endotraqueal (infusão ou "em bolo") ou por nebulização.

A presente invenção também diz respeito a compostos farmacêuticos compreendendo o surfactante reconstituído da invenção. Tais compostos são administrados de maneira vantajosa na forma de solução, dispersão, suspensão ou pó seco. Preferencialmente, tais compostos compreendem o surfactante reconstituído dissolvido, ou em suspensão, em um solvente ou meio de ressuspensão adequados.

Preferencialmente, tais compostos são dispensados em suspensão em uma solução aquosa de soro fisiológico tamponado em frascos de vidro de uso único.

Favoravelmente, a concentração do surfactante reconstituído (expressa como conteúdo de fosfolipídeos) está dentro da faixa de cerca de 2 até aproximadamente 160 mg de surfactante por ml, preferencialmente entre 10 e 100 mg/ml, mais preferencialmente entre 20 e 80 mg/ml.

Tais compostos podem ainda apresentar em sua fórmula eletrólitos, como cálcio, magnésio e/ou sais de sódio, preferencialmente cloreto de cálcio.

Os compostos farmacêuticos, de acordo com a invenção, são adequados para profilaxia e/ou tratamento da síndrome de desconforto respiratório (SDR) em recém-nascidos prematuros ou para outras doenças relacionadas a deficiência ou disfunção do

surfactante, incluindo SDR em adultos (SARA), síndrome de aspiração meconial (SAM) e displasia broncopulmonar (DBP).

Eles podem também ser úteis na profilaxia e/ou tratamento de outras patologias pulmonares tais como pneumonia, bronquite, DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica), asma e mucoviscidose (fibrose cística), assim como para o tratamento de otite média serosa.

Os exemplos que se seguem ilustram a invenção com mais detalhes.

EXEMPLOS

Exemplo 1 – Síntese e purificação dos polipeptídeos SP-C33(Leu)³¹ e SP-C33.

10 O polipeptídeo SP-C33(Leu)³¹ foi preparado através de métodos padrão de síntese de peptídeos de fase sólida (SPPS) baseados na química de Fmoc¹ e clivagens consecutivas com TFA².

No total, foram obtidas 186,0 g de SP-C33(Leu)³¹ em estado natural.

15 O polipeptídeo foi purificado submetendo-se o material a distribuição em contracorrente (CCD) usando-se H₂O/n-BuOH/AcOEt/AcOH 4:1:4:1 como sistema solvente bifásico.

A purificação rendeu 78,9 g de SP-C33(Leu)³¹, com um grau de pureza > 60%.

20 A purificação final foi realizada por HPLC preparatória usando-se PLRP-S como fase estacionária em uma coluna de aço de 50 x 300 mm, aplicando-se um gradiente linear de 25% B a 100% B em 75 minutos. A fase móvel consistia do tampão A = 0.1% TFA in ACN/H₂O 1:4 e do tampão B = 0.1% TFA em IPA³.

O polipeptídeo foi dissolvido em 90% de AcOH e passado através de uma coluna revestida com resina de troca iônica Dowex (acetato) para fornecer, após liofilização, 5,8 g (= 5,4%) do produto final como acetato.

25 O polipeptídeo SP-C33 foi preparado de maneira análoga.

Legenda

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
AcOH	Acido acético
Boc	t-Butiloxicarbonil
n-	n-Butanol
BuOH	
Fmoc	9-Fluorenilmeil-oxicarbonil

¹ Fmoc = sigla do grupo químico protetor Fluorenilmetil-oxicarbonil

² TFA = ácido trifluoroacético

³ IPA = álcool isopropílico.

IPA Álcool isopropílico
TFA Ácido trifluoroacético

Exemplo 2 – Síntese e purificação dos polipeptídeos ox Mini-B(Leu) e ox-Mini-B.

O polipeptídeo **ox Mini-B(Leu)** foi preparado através de métodos padrão de síntese de peptídeos de fase sólida (SPPS) baseados na química de Fmoc e clivagens consecutivas com TFA.

5 O polipeptídeo em estado natural foi purificado por HPLC preparatória usando-se um sistema de TFA, e isolado por liofilização.

A oxidação por ar do peptídeo purificado rendeu a seqüência monocíclica com a ponte dissulfeto entre Cys¹ e Cys³³. O peptídeo monocíclico foi purificado por HPLC preparatória usando-se um sistema de TFA, e isolado por liofilização.

10 A segunda ponte dissulfeto entre Cys⁴ e Cys²⁷ foi formada utilizando-se iodo.

Após oxidação, o produto foi purificado por HPLC preparatória usando-se um sistema de TFA, e isolado por liofilização. 1.12 g (= 1.7%) do composto final foram isolados com pureza >89%.

O polipeptídeo ox Mini-B foi preparado de maneira análoga.

15 **Exemplo 3 - Experimentos *in vivo* com um surfactante reconstituído baseado na ox Mini-B e na SP-C33**

As preparações de surfactante foram estudadas em coelhos recém-nascidos prematuros obtidos por histerectomia em uma idade gestacional de 27 dias. Os experimentos foram realizados sem o emprego de pressão positiva expiratória final (PEEP).

20 Como análogo da SP-C, utilizou-se o polipeptídeo denominado SP-C33, que foi preparado conforme descrito no Exemplo 1.

Como análogo da proteína SP-B, utilizou-se o polipeptídeo Mini-B oxidado (ox Mini-B), o qual foi preparado conforme descrito no Exemplo 2.

Os animais foram tratados ao nascimento com preparações de surfactante reconstituído contendo, como carreador lipídico, a mistura de fosfolipídeos DPPC:POPG em
25 uma relação 68:31 p/p. Os fosfolipídeos foram misturados com 2 a 4 p/p SPC-33, 2% p/p ox Mini-B ou 2% p/p SPC-33 mais 2% p/p ox Mini-B.

Alguns animais receberam dose semelhante de Curosurf® e serviram como controles positivos, e filhotes não-tratados da mesma ninhada, como controles negativos.

30 Todas as preparações de surfactante foram administradas em uma concentração de 80 mg/ml e em uma dose padrão de 2,5 ml/kg.

Os coelhos recém-nascidos imaturos receberam ventilação mecânica em paralelo com uma seqüência padronizada de pressões de insuflação de pico. Para abrir os pulmões, a pressão foi inicialmente ajustada em 35 cmH₂O por 1 minuto. Após essa manobra de

recrutamento de vias aéreas, a pressão foi reduzida para 25 cm H₂O por 15 minutos e, na evolução, para 20 e 15 cm H₂O. Por fim, a pressão foi elevada novamente para 25 cm H₂O por 5 minutos, após o que os pulmões foram ventilados por mais 5 minutos com nitrogênio e então excisados para medições de volumes de gases.

- 5 Foram medidos tanto os volumes de gases pulmonares quanto os volumes correntes, expressos em ml/kg, e seus resultados foram expressos como valores de mediana, conforme descrito nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Na Fig. 3 pode ser visto que os animais tratados com a preparação de surfactante reconstituído contendo 2% p/p de ox Mini-B tiveram menores volumes de gases pulmonares
10 que os animais que receberam 2% p/p de SP-C33 (cerca de 2 ml/kg vs aproximadamente 4 ml/kg).

A adição de 2% p/p de ox Mini-B à SP-C33 produziu um incremento significativamente maior nos volumes de gases pulmonares que qualquer peptídeo isoladamente (8 ml/kg vs aproximadamente 6 ml/kg).

- 15 Como mostrado na Fig. 4, observou-se uma tendência similar para os volumes correntes e, após a administração dos peptídeos associadamente, uma melhora comparável ou mesmo ligeiramente superior à atingida após a administração de Curosurf® foi observada.

Foi também evidenciado que o aumento no conteúdo de SP-C33 2 a 4% p/p não
20 aumentou os volumes de gases pulmonares, indicando que o efeito estabilizador da película de fosfolípidos nos alvéolos ao fim da expiração é devido à adição de ox Mini-B.

Tais resultados demonstram que o surfactante reconstituído da invenção é capaz de estabilizar a película de fosfolípidos nos alvéolos ao fim da expiração de uma maneira melhor que um surfactante reconstituído compreendendo apenas um análogo da proteína
25 SP-C ou um análogo da proteína SP-B.

Além disso, a preparação de surfactante reconstituído desta reivindicação mostrou melhorar a função respiratória, conforme expresso pelos volumes correntes, em grau comparável ou mesmo discretamente maior que o alcançado após a administração de um surfactante natural modificado.

REIVINDICAÇÕES

1. Um surfactante reconstituído compreendendo um carreador lipídico e uma combinação de um análogo de polipeptídeo da proteína natural SP-C com um análogo de polipeptídeo da proteína natural SP-B, caracterizado pelo referido análogo de polipeptídeo da proteína surfactante natural SP-C ser um polipeptídeo com ao menos 20 resíduos de aminoácidos e não mais que 40 resíduos de aminoácidos, contendo a seqüência representada pela fórmula geral (I)



em que:

- X é um resíduo de aminoácido selecionado independentemente do grupo formado por I, L e nL;
- B é um resíduo de aminoácido selecionado independentemente do grupo formado por K, W, F, Y, e Orn;
- S é substituído opcionalmente com grupos acil contendo 12-22 átomos de carbono, preferencialmente 16 átomos de carbono, ligados à cadeia lateral por meio de uma ponte éster;
- Ω é um resíduo de aminoácido selecionado do grupo formado por M ou sua forma oxidada no átomo de enxofre, I, L e nL;
- a é um número inteiro com valor entre 1 e 8;
- b é um número inteiro com valor entre 1 e 19;
- c é um número inteiro com valor selecionado independentemente de 3 a 8;
- e, f, g e p são números inteiros com valor 0 ou 1;
- n é um número inteiro com valor entre 0 e 3;
- 10 com a condição de que $X_a BX_b (BX_c)_n$ seja uma seqüência contendo no máximo 22 aminoácidos; e em que o referido análogo de polipeptídeo da proteína surfactante natural SP-B é um polipeptídeo de fórmula geral (II):



em que:

- Δ é um resíduo de aminoácido selecionado do grupo formado por W e L;
- Ω é um resíduo de aminoácido selecionado independentemente do grupo formado por M, I, L e nL;
- Φ é um resíduo de aminoácido selecionado do grupo formado por R e T; e
- f é um número inteiro com valor 0 ou 1;
- 15 2. Um surfactante reconstituído de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por Φ ser R.

3. Um surfactante reconstituído de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo o análogo da proteína surfactante natural SP-C e o análogo da proteína surfactante natural SP-B estarem presentes em uma combinação fixa.

4. Um composto surfactante reconstituído de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo polipeptídeo (II) estar sob a forma de uma molécula ligada a dissulfeto, com a ligação intramolecular de dissulfeto entre os dois resíduos Cys nas posições 1 e 33 e/ou entre os dois resíduos Cys nas posições 4 e 27.

5. Um composto surfactante reconstituído de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo análogo da proteína surfactante natural SP-B ser representado pela fórmula geral (IIa):



6. Um surfactante reconstituído de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo o análogo da proteína surfactante natural SP-C ser representado pela fórmula geral (Ia):



em que:

X, B e Ω são como acima dispostos;

a está entre 1 e 8, preferencialmente entre 1 e 3; mais preferencialmente, 1;

b está entre 1 e 19, preferencialmente entre 5 e 15; mais preferencialmente, 14; e

f e p são 0 ou 1.

7. Um composto surfactante reconstituído de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo análogo da proteína surfactante natural SP-C ser representado pela fórmula geral (Ib):



em que:

X, B, Ω , a e b são como acima dispostos e

p é 0 ou 1.

8. Um composto surfactante reconstituído de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo análogo da proteína surfactante natural SP-C ser representado pela fórmula geral (Ic):



em que:

Ω

é como acima disposto; e

p é 0 ou 1.

9. Um composto surfactante reconstituído de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo análogo da proteína surfactante natural SP-C ser selecionado a partir do grupo constituído por:

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLMGL (Id)

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLIGL (Ie)

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLLGL (If)

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLnLGL (Ig)

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALL (Ih)

5 10. Um surfactante reconstituído de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo análogo polipeptídico da proteína surfactante natural SP-C ser:

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLLGL (If)

e pelo análogo polipeptídico da proteína surfactante natural SP-B ser:

CWLCRALIKRIQAMIPKGGRMLPQLVCRLVLRCS (IIa)

10 11. Um surfactante reconstituído de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo o análogo polipeptídico da proteína surfactante natural SP-C ser:

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLLGL (If)

e pelo análogo polipeptídico da proteína surfactante natural SP-B ser:

CWLCRALIKRIQALIPKGGRLLPQLVCRLVLRCS (IIc)

15 12. Um surfactante reconstituído de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo carreador lipídico compreender uma mistura de fosfolípidos.

13. Um surfactante reconstituído de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pela a mistura de fosfolípidos consistir de dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) e um palmitoil-oleoil-
20 fosfolípide selecionado a partir do dipalmitoil-fosfatidilglicerol (DPPG) ou uma mistura deste com a palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) em razões de peso que vão de 95:5 a 50:50.

14. Um surfactante reconstituído de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pela mistura de fosfolípidos consistir de DPPC e POPG em uma razão de peso de 68:31.

15. Um composto farmacêutico compreendendo o surfactante reconstituído
25 caracterizado por ser de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14.

16. Um composto farmacêutico de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por ser na forma de uma solução, dispersão, suspensão ou pó seco.

17. Um composto farmacêutico de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por ser na forma de uma suspensão aquosa.

18. Um composto farmacêutico de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por compreender o surfactante reconstituído em uma concentração compreendida entre 2 e 160 mg/ml.

19. Um composto farmacêutico de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pela
5 concentração do surfactante reconstituído estar compreendida entre 20 e 80 mg/ml.

20. Utilização de um surfactante reconstituído de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizada por ser utilizada para o tratamento ou profilaxia da síndrome de angústia respiratória (SAR) em crianças nascidas prematuramente, ou para o tratamento ou profilaxia de outras doenças relacionadas a uma deficiência ou disfunção
10 do surfactante.

21. A utilização, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelas doenças relacionadas a uma deficiência ou disfunção do surfactante incluem a SAR em adultos (SARA), a síndrome de aspiração meconial (SAM) e a displasia broncopulmonar (DBP).

NH₂ Phe Gly Ile Pro Cys Cys Pro Val His Leu Lys
 1 5 10
 Arg Leu Leu Iso Val Val Val Val Val Val
 15 20
 Leu Ile Val Val Val Ile Val Gly Ala Leu
 25 30
 Leu Met Gly Leu COOH

FIGURA 1

Phe Pro Ile Pro Leu Pro Tyr Cys Trp Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys
 1 5 10 15
 Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys Gly Ala Leu Ala Val Ala Val Ala
 20 25 30
 Gln Val Cys Arg Val Val Pro Leu Val Ala Gly Gly Ile Cys Gln Cys
 35 40 45
 Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile Leu Leu Asp Thr Leu Leu Gly Arg
 50 55 60
 Met Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg Leu Val Leu Arg Cys Ser Met
 65 70 75

FIGURA 2

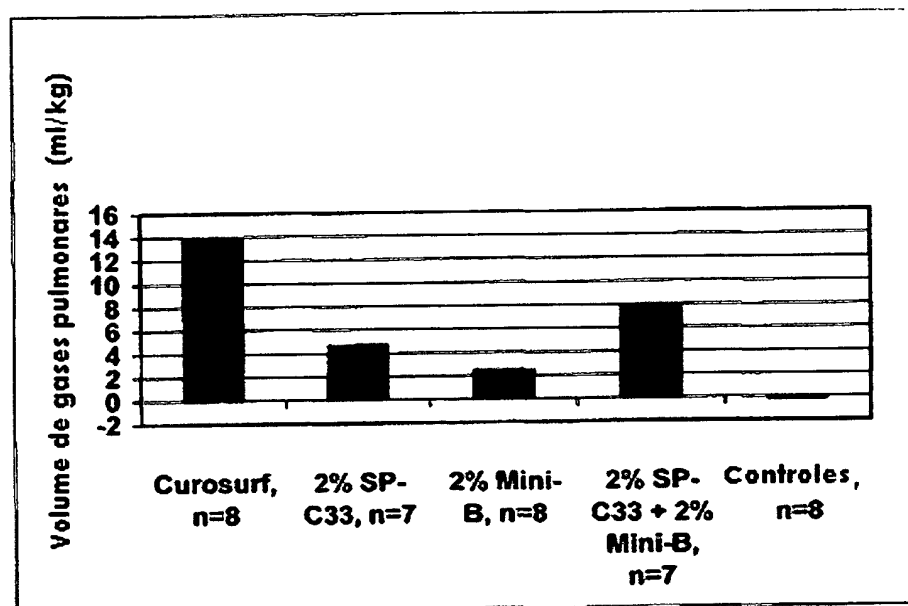


FIGURA 3

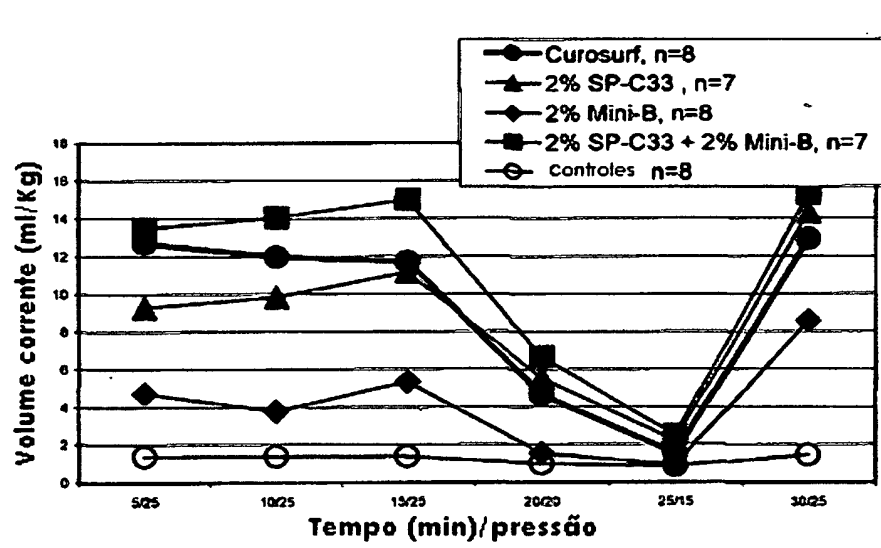


FIGURA 4

RESUMO

SURFACTANTES RECONSTITUÍDOS COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS

- A presente invenção consiste de um surfactante reconstituído englobando um carreador lipídico e uma combinação de um análogo peptídico específico do surfactante natural SP-
- 5 C com um análogo peptídico específico do surfactante natural SP-B. A invenção também trata dos referidos compostos farmacêuticos e de seu uso para o tratamento ou profilaxia da SDR_e outras patologias pulmonares.