



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 31/66 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 9/12 (2006.01)

A61K 9/72 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 11/10 (2006.01)

A61P 11/12 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009114825/15, 19.09.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.09.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
19.09.2006 US 60/845,991

(43) Дата публикации заявки: 27.10.2010 Бюл. № 30

(45) Опубликовано: 10.07.2012 Бюл. № 19

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 92/22315 A1, 23.12.1992. МИХАЙЛОВ И.Б. Настольная книга врача по клинической фармакологии. - СПб.: Фолиант, 2001, с.378-381. EP 593094 A2, 20.04.1994. RU 2149014 C1, 20.05.2000. RU 2198670 C1, 20.02.2003. RU 2213746 C1, 10.10.2003. RU 2149015 C1, 20.05.2000. US 5840527 A, 24.11.1998. Ferzli G et al. Surfactant protein B deficiency: a rare cause (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 20.04.2009

(86) Заявка РСТ:
US 2007/020260 (19.09.2007)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/036293 (27.03.2008)

Адрес для переписки:

103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент", пат.пов. И.С.Саломатиной,
рег.№ 863

(72) Автор(ы):

ДЖОНСОН Марк И. (US),
СИГАЛ Роберт (US),
ХОФМАНН Томас (US),
КЕЙПИТОЛА Роберт Дж. (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДИСКАВЕРИ ЛАБОРАТОРИЗ, ИНК. (US)

(54) КОМПОЗИЦИИ ЛЕГОЧНЫХ СУРФАКТАНТОВ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ, СОДЕЙСТВУЮЩИЕ ОЧИЩЕНИЮ ОТ СЛИЗИ

(57) Реферат:

Раскрыты способ и композиция для усиления выведения слизи и лечения пульмональных расстройств легких, таких как кистозный фиброз. Они используют вместе с осмотически активным веществом синтетический легочный сурфактант,

содержащий один или больше фармацевтически приемлемых фосфолипидов, смешанных с полипептидом SP-B или его фрагментом, или полипептидом, содержащим, по меньшей мере, 10 аминокислотных остатков и не больше, чем около 60 аминокислотных остатков, указанный полипептид,

включающий последовательность, имеющую переменные области гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков, представленную формулой $(ZaU_b)_cZd$, в котором сурфактантная активность смеси фосфолипидов с полипептидом выше таковой одного фосфолипида, имеет осмоляльность между около 220-1200 мОсм/кг, концентрацию свободных анионов между около 20-200

ммоль/л и значение pH между около 6,8 и 8,0, и сурфактант обеспечивает доставку в легкие пациента дозы приблизительно между 20 и 200 мг общего фосфолипидного эквивалента в день. Изобретение обеспечивает усиление выведения слизи и улучшение качества жизни больных кистозным фиброзом, бронхитом, бронхоэктазией, цилиарной дискинезией, COPD или синуситом. 2 н. и 13 з.п. ф-лы, 2 ил., 4 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):

of respiratory failure in a Lebanese newborn. Ann Saudi Med. 2006 Jan-Feb; 26(1):69-70. [он-лайн] [найдено 2011-06-21] Найдено из базы данных PubMed PMID: 16521884. Serrano AG et al. Intrinsic structural and functional determinants within the amino acid sequence of mature pulmonary surfactant protein SP-B. Biochemistry. 2005 Jan 11; 44(1):417-30. Реферат [он-лайн] [найдено 2011-06-21] Найдено из базы данных PubMed PMID: 1568884.

RU 2 4 5 5 0 2 1 C 2

RU 2 4 5 5 0 2 1 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01)**A61K 31/66** (2006.01)**A61K 9/08** (2006.01)**A61K 9/12** (2006.01)**A61K 9/72** (2006.01)**A61P 11/00** (2006.01)**A61P 11/10** (2006.01)**A61P 11/12** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2009114825/15, 19.09.2007**(24) Effective date for property rights:
19.09.2007

Priority:

(30) Convention priority:
19.09.2006 US 60/845,991(43) Application published: **27.10.2010 Bull. 30**(45) Date of publication: **10.07.2012 Bull. 19**(85) Commencement of national phase: **20.04.2009**(86) PCT application:
US 2007/020260 (19.09.2007)(87) PCT publication:
WO 2008/036293 (27.03.2008)

Mail address:

**103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO
"Sojuzpatent", pat.pov. I.S.Salomatinoj, reg.№ 863**

(72) Inventor(s):

**DZhONSON Mark I. (US),
SIGAL Robert (US),
KhOFMANN Tomas (US),
KEJPITOLA Robert Dzh. (US)**

(73) Proprietor(s):

DISKAVERI LABORATORIZ, INK. (US)**(54) PULMONARY SURFACTANT COMPOSITIONS AND METHODS OF USING THEM PROMOTING MUCUS ELIMINATION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: there are disclosed method and composition for intensifying mucus excretion and treating pulmonary disorders, such as cystic fibrosis. They use together with osmotically active substance a synthetic pulmonary surfactant containing one or more pharmaceutically acceptable phospholipids mixed with SP-B polypeptide or its fragment, or polypeptide containing at least 10 amino acid residues and no more than about 60 amino acid residues, said polypeptide containing a sequence having variable areas of hydrophobic and hydrophilic amino acid residues presented by formula

$(ZaU_b)_cZd$, wherein surfactant activity of mixed phospholipids and polypeptide higher than that of one phospholipid, has osmolarity varying between 220-1200 mOsm/kg, the concentration of free anions varying between 20-200 mmole/l and the pH value varying between 6.8 and 8.0, and the surfactant provides the pulmonary delivery of a daily dose varying between approximately 20 and 200 mg of total phospholipid equivalent.

EFFECT: invention provides intensified mucus excretion and improved quality of life in the patients suffering cystic fibrosis, bronchitis, bronchiectasis, ciliary dyskinesia, COPD, or sinusitis.

15 cl, 2 dwg, 4 tbl, 4 ex

Данная заявка претендует на приоритет Предварительной заявки США №60/845991, поданной 19 сентября 2006, полное содержание которой включено в данное описание путем отсылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится к фармакологии. Предоставлены способы лечения, которые облегчают очищение от слизи при легочных расстройствах, таких как кистозный фиброз, первичная цилиарная дискинезия, бронхоэктазия, астма и вентиляционно-ассоциированная пневмония.

Предшествующий уровень техники

На всем протяжении описания изобретения цитируются различные публикации, включая патенты, опубликованные заявки, технические статьи и научные статьи. Каждая из этих цитируемых публикаций включена целиком в данное описание путем отсылки.

Кистозный фиброз (муковисцидоз) (КФ) представляет собой рецессивное генетическое расстройство с частотой заболеваний приблизительно один случай из каждых 3500 родившихся живыми детей. КФ появляется вследствие мутации гена трансмембранного регулятора муковисцидоза, и происходящего в результате этого ухудшения ионного транспорта. Результатом таких мутаций является секреция ненормально густой, вязкой слизи, которая заграждает легкие и дыхательные пути (Gibson RL et al. (2003) Am. J. Respir. Crit. Care Med. 168:918-51). Нарушения ионного транспорта в дыхательных путях пациентов с КФ приводят к обезвоживанию поверхности дыхательных путей. Затем слизь в дыхательных путях может прилипнуть к поверхностям дыхательных путей, в конечном итоге заграждает дыхательные пути при КФ и служит субстратом для бактериальной колонизации и хронической инфекции.

В дополнение к КФ многочисленные другие хронические или транзиторные легочные болезни отличаются удерживанием слизистых секретов в легких и дыхательных путях. Такие болезни включают острый и хронический бронхит и другое хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), бронхоэктазию, бронхолит, первичную или вторичную цилиарную дискинезию, астму, синусит и пневмонию.

Для целостности легких является важным легочный сурфактант (ЛС) (Griese M et al. (2005) Am. J. Respir. Crit. Care Med. 170:1000-5). Легочные сурфактанты синтезируются эпителиальными клетками и состоят приблизительно из 90% липидов и 10% протеинов (Devendra G. et al. (2002) Respir. Res. 3:19-22). ЛС защищает альвеолярную поверхность легких и терминальных дыхательных путей, ведущих к альвеолам, и способствует дыханию посредством непрерывной модификации поверхностного натяжения жидкости, обычно присутствующей внутри альвеол. Путем снижения поверхностного натяжения терминальных дыхательных путей сурфактант поддерживает их раскрытое состояние, т.е. держит дыхательные пути открытыми (Griese M. (1999) Eur. Respir. J. 13:1455-76). Утрата раскрытого состояния ведет к закупорке дыхательных путей и нарушению функции легких. У человека ЛС главным образом содержит фосфолипиды и четыре поверхностно-активных полипептида, которые называются SP-A, SP-B, SP-C и SP-D (Tierney DF et al. (1989) Am. J. Physiol. 257:L1-L12; и Griese M. (1999) Eur. Respir. J. 13:1455-76). SP-A, -B и -C важны для уменьшения поверхностного натяжения. Отсутствие SP-B у человека является фатальным. SP-A способствует устойчивости к ингибированию активности сурфактанта медиаторами и продуктами воспаления (Griese M. et al. (2005) Respir. Res. 6:133-42). SP-D содействует фагоцитозу патогенов и обладает

иммуномодулирующими, противовоспалительными и антиокислительными свойствами (Clark H. et al. (2003) Arch. Dis. Child 88:981-4).

Были исследованы потенциальные возможности природных и синтетических легочных сурфактантов для лечения различных легочных расстройств, включая в числе других, астму, бронхиолит, хронический бронхит, кистозный фиброз, пневмонию и неонатальный синдром дыхательной недостаточности (Griese M. (1999) Eur. Respir. J. 13:1455-76). В большинстве случаев было отмечено некоторое умеренное улучшение в состояниях пациентов, несмотря на то, что лечение пациентов с ФК экстрактом бычьих сурфактантов не приводило к улучшению легочной функции или оксигенации, вследствие, по меньшей мере, отчасти, недостаточного выделения ЛС в легких пациентов (Griese M. et al. (1997) Eur. Respir. J. 10:1989-97). В отличие от этого было сообщено, что лечение поверхностно-активным липидом в виде аэрозоля палмитоилфосфатидилхолином (DPPC) улучшает легочную функцию и подвижность мокроты у пациентов с хроническим бронхитом (Anzueto A. et al. (1997), J. Am. Med. Assoc. 278:1426-1431).

Гиперосмолярные растворы и аэрозоли используют для оказания содействия выведению слизистых секретов из дыхательных путей, улучшая, таким образом, легочную функцию. Например, было сообщено, что гиперосмолярный сухой порошковый маннитол улучшает легочную функцию у взрослых субъектов с бронхоэктазом, не связанным с КФ, и уменьшает поверхностную адгезию и увеличивает устранение отхаркиваемой мокроты откашливанием (Daviskas E. et al. (2005) Respirology 10:46-56). Сообщалось о введении гипертонического раствора NaCl (1M) пациентам с КФ с помощью ингаляции для облегчения устранения мокроты и улучшения функции легких у пациентов (см., например, Donaldson SH et al. (2006) N. Engl. J. Med. 354:241-50). Однако действие гипертонического раствора является кратковременным, и сам гипертонический раствор не восстанавливает раскрытое состояние большинства закрытых дыхательных путей у пациентов (Elkins MR et al. (2006) N. Engl. J. Med. 354:229-40). Кроме того, ингаляция гипертоническим раствором может вызвать бронхостеноз у некоторых пациентов и усилить воспаление (Didier C. et al. (2001) Chest 120:1815-21; and. Sun R. et al. (2002) Am. J. Respir. Crit. Care Med 166:352-5). По существу, имеется необходимость в методах лечения КФ и других подобных легочных расстройств, которые усиливают выведение слизи и легочную функцию у пациентов и одновременно восстанавливают раскрытое состояние дыхательных путей при ограниченном числе отрицательных побочных явлений.

Раскрытие изобретения

Один аспект изобретения описывает способ, способствующий выведению слизи у пациента с легочным состоянием, отличающимся чрезмерной секрецией слизи, ухудшением очищения от слизи или воспалительным состоянием легких. Способ включает введение пациенту, по меньшей мере, одного легочного сурфактанта в количестве, эффективном для оказания содействия очищению от слизи у пациента. Легочные состояния, которые можно лечить данным способом, включают, но не ограничиваются этим, кистозный фиброз, острый или хронический бронхит, бронхоэктазию, бронхиолит, первичную или вторичную цилиарную дискинезию, COPD, астму, пневмонию или синусит.

В определенных вариантах осуществления изобретения легочный сурфактант представляет собой синтетический легочный сурфактант, содержащий один или больше фармацевтически приемлемых фосфолипидов, смешанных с полипептидом SP-В или его фрагментом, или полипептид, содержащий, по меньшей мере, 10

аминокислотных остатков и не больше, чем около 60 аминокислотных остатков.

Полипептид включает последовательность, имеющую переменные области гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков, представленную формулой $(Za U_b)_c Z_d$, в которой Z представляет собой гидрофильный аминокислотный остаток, независимо выбранный из группы, состоящей из R и K; U представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток, независимо выбранный из группы, состоящей из L и C; a представляет собой 1 или 2; b имеет среднее значение от около 3 до около 8; c представляет собой число от 1 до 10; и d представляет собой число от 0 до 2. В различных вариантах осуществления легочный сурфактант применяют в виде жидкого лекарственного средства для капельного введения, или как жидкий аэрозоль или сухой аэрозоль.

Лечение пациента в соответствии с вышеописанным способом приводит к улучшениям, которые включают, но не ограничиваются этим, улучшенное раскрытое состояние дыхательных путей, уменьшенное воспаление, уменьшенную непроходимость дыхательных путей, сохраненную или увеличенную легочную функцию и улучшенное качество жизни, обусловленное здоровьем (HRQOL), относительно пациента, которому не был введен легочный сурфактант.

Другой аспект изобретения описывает способ, как описано выше, который дополнительно включает введение осмотически активного вещества пациенту. Легочный сурфактант может быть введен одновременно или последовательно с осмотически активным веществом.

Осмотически активное вещество может быть фармацевтически приемлемым сахаром, сахарным спиртом или солью. В определенных вариантах осуществления осмотически активное вещество представляет собой NaCl и создается в виде солевого раствора. Обычно, солевой раствор содержит от около 0,13 до около 1,2 Осм хлористого натрия.

Лечение пациента в соответствии с вышеописанным способом приводит к улучшениям, которые включают, но не ограничиваются этим, улучшенное раскрытое состояние дыхательных путей, уменьшенное воспаление, уменьшенную непроходимость дыхательных путей, сохраненную или увеличенную легочную функцию и улучшенное качество жизни, обусловленное здоровьем (HRQOL), относительно пациента, которому не был введен легочный сурфактант.

Другой аспект изобретения описывает фармацевтическую композицию, способствующую очищению от слизи, которая включает легочный сурфактант и осмотически активное вещество. В разных вариантах осуществления осмотически активное вещество является сахаром, сахарным спиртом или солью, а легочный сурфактант является синтетическим легочным сурфактантом, содержащим один или больше фармацевтически приемлемых фосфолипидов, смешанных с полипептидом SP-B или его фрагментом, или полипептид, содержащий, по меньшей мере, 10 аминокислотных остатков и не больше, чем около 60 аминокислотных остатков.

Полипептид включает последовательность, имеющую переменные области гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков, представленную формулой $(Za U_b)_c Z_d$, в которой Z представляет собой гидрофильный аминокислотный остаток, независимо выбранный из группы, состоящей из R и K; U представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток, независимо выбранный из группы, состоящей из L и C; a представляет собой 1 или 2; b имеет среднее значение от около 3 до около 8; c представляет собой число от 1 до 10; и d представляет собой число от 0 до 2.

В определенных вариантах осуществления осмотически активное вещество является солью. Композиция может иметь осмоляльность приблизительно между 220-1200 мОсм/кг, концентрацию свободных анионов приблизительно между 20-200 ммоль/л и значение pH приблизительно между 6,8 и 8,0.

В отдельных вариантах осуществления композиция содержит NaCl в качестве соли, а легочный сурфактант содержит 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфоглицерин (POPG), пальмитиновую кислоту (PA) и пептид, имеющий последовательность KLLLLKLLLLKLLLLKLLLLK (KL4, SEQ ID NO:1). Композицию предпочтительно разрабатывают для аэрозольной доставки, причем она может быть специально разработана для доставки дозы в легкие приблизительно между 20 и 200 мг суммарного фосфолипидного эквивалента в день.

Другие отличительные признаки и преимущества изобретения будут понятны исходя из чертежей, подробного описания и примеров, которые следуют далее.

Краткое описание чертежей

Фигура 1. Скорости выхода аэрозоля (мкл/с) для лусинактанта (10, 20, 30 мг/мл) или 30 мг/мл лиофилизированных KL4 сурфактантных композиций, приготовленных с увеличивающимися концентрациями NaCl. Использовали аэрозольный аппарат Aeroneb Pro; точки на графике представляют три образца, каждый измеряли трижды; указаны планки погрешностей.

Фигура 2. Скорости выхода аэрозоля (мкл/с) для лусинактанта (10, 20, 30 мг/мл) или 30 мг/мл лиофилизированных KL4 сурфактантных композиций, приготовленных с увеличивающимися концентрациями. Использовали аэрозольный аппарат Pan LC Star; точки на графике представляют три образца, каждый измеряли трижды; указаны планки погрешностей.

Подробное описание изобретения

На всем протяжении подробного описания и формулы изобретения используются различные термины, относящиеся к способам и другим аспектам настоящего изобретения. Подобные термины представлены в их обычном значении в данной области техники, если не указано иное. Другие более точно определенные термины следует толковать образом, совместимым с предоставленным здесь определением.

Определения

Если не указано иначе, все технические и научные термины, использованные здесь, имеют то же самое значение, которое обычно понятно среднему специалисту в области техники, к которой относится данное изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным здесь, могут быть использованы на практике для проверки настоящего изобретения, предпочтительными материалами и способами являются описанные здесь. В описании и в формуле изобретения настоящего изобретения будет использоваться следующая терминология.

Также следует понимать, что терминология, использованная здесь, используется только с целью описания отдельных вариантов осуществления и не является ограничивающей. При использовании в данном подробном описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа "a", "an", и "the" включают ссылки во множественном числе, если содержание явно не диктует иное. Таким образом, например, ссылка на "какой-либо легочный сурфактант" включает комбинацию из двух или больше легочных сурфактантов, и тому подобное.

"Около (приблизительно)" при использовании здесь, при ссылке на измеряемую величину, такую как количество, продолжительность времени и тому подобное,

означает, что включаются изменения $\pm 20\%$ или $\pm 10\%$, более предпочтительно $\pm 5\%$, даже более предпочтительно $\pm 1\%$, и еще более предпочтительно $\pm 0,1\%$ от заданного значения, как таковые варианты предназначены для того, чтобы осуществить раскрытые способы.

"Лечение" относится к любому благоприятному исходу или признакам благоприятного исхода при ослаблении или улучшении повреждения, патологии или состояния, включая любой объективный или субъективный параметр, такой как, смягчение, ослабление, уменьшение симптомов или установление повреждения, патологии или состояния более переносимого для пациента, замедление скорости дегенерации или ухудшения, приведение завершающей точки дегенерации к менее ослабляющему состоянию, улучшение физического или психического здоровья субъекта или увеличение продолжительности выживания. Лечение или уменьшение интенсивности симптомов может быть основано на объективных или субъективных параметрах; включая результаты медицинского осмотра, неврологического обследования и/или психиатрических оценок.

"Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" используются здесь взаимозаменяемо, и относятся к количеству соединения, состава, вещества или композиции, как описано здесь, эффективного для достижения отдельного биологического результата. Такие результаты могут включать, но не ограничиваются этим, увеличение очищения от слизи, увеличение легочной функции и/или раскрытого состояния дыхательных путей, и лечение кистозного фиброза или другой легочной болезни у субъекта, как устанавливается любыми способами, пригодными в данной области техники.

"Фармацевтически приемлемый" относится к тем свойствам и/или веществам, которые являются приемлемыми для пациента с фармакологической/токсикологической точки зрения и для химика-фармацевта на производстве с физической/химической точки зрения относительно композиции, состава, стабильности, одобрения пациента и биодоступности. "Фармацевтически приемлемый переносчик" относится к среде, которая не служит препятствием для эффективности биологической активности активного ингредиента(ов) и не является токсической для хозяина, которому вводится.

"Активность сурфактанта" относится к способности любой субстанции, такой как органическая молекула, протеин или полипептид, или отдельно или в комбинации с другими молекулами, уменьшать поверхностное натяжение на поверхности раздела воздух/вода. Измерения могут быть проведены посредством исследования *in vitro* с помощью метода Вильгельми (Wilhelmy Balance) или сурфактометра, использующего пульсирующий газовый пузырь (например, King et al. (1972) Am. J. Physiol. 223:715-726, и Enhoming G. (1977) J. Appl. Physiol. 43:198-203). Коротко, сурфактометр Enhoming Surfactometer (Surfactometer International, Торонто, Онтарио) измеряет градиент давления (δP) поперек поверхности раздела жидкость-воздух пузырька, который пульсирует со скоростью 20 циклов/мин между максимальным (0,55 мм) и минимальным (0,4 мм) радиусом. За образовавшимся пузырьком, окруженным водой при 37°C в 20-мкл камере для проб, наблюдают в микроскоп, в то время как изменения давления записываются на ленточный самописец, калиброванный для 0 и -2 см H₂O. Кроме того, можно легко провести измерения *in vivo* увеличения растяжимости или потока воздуха при данном давлении воздуха, проникающего в легкие (Robertson B. (1980) Lung 158:57-68). В этом исследовании образец, который должен быть оценен, вводят через канюлю в трахею эмбриональным кроликам или

ягнтям, которых извлекают посредством преждевременного Кесарева сечения.

Измерения растяжимости легкого, парциального давления газа в крови и вентиляционного давления дают индексы активности. Исследования активности сурфактанта *in vitro*, которую оценивают как способность понижать поверхностное натяжение пульсирующего пузырька, и исследования *in vivo*, использующие эмбрионы кроликов, подробно описаны Revak SD et al. (1986) Am. Rev. Respir. Dis. 134:1258-1265.

"Аэрозоль" относится к жидким или твердым частицам, которые суспендированы в газе. При использовании в предложенных способах аэрозоль содержит терапевтически активную композицию. Аэрозоль может быть в виде раствора, суспензии, эмульсии, порошка, твердого или полутвердого препарата.

"Осмолярность" относится к концентрации осмотически активных частиц в растворе, выраженной в единицах осмоль растворенного вещества на литр раствора. Осмоляльность относится к концентрации осмотически активных частиц в растворе, выраженной в единицах осмоль растворенного вещества на килограмм раствора. Для обозначения осмолярности и осмоляльности здесь используют сокращения "Осм" или "мОсм", и осмолярность и осмоляльность различают исходя из того, что измерения сделаны на литр или на килограмм раствора. "Осмоль" представляет собой количество вещества, которое диссоциирует в раствор с образованием одного моль осмотически активных частиц.

"Осмотически активные" вещества, использованные в настоящем изобретении, являются мембранно-непроницаемыми (т.е. по существу непоглощаемыми, невсасывающимися) на поверхности дыхательных путей или эпителиальной поверхности легких. Термины "поверхность дыхательных путей", "поверхность легкого" или "легочная поверхность" при использовании здесь включают поверхности легочных дыхательных путей, таких как бронхи и бронхиолы, альвеолярные поверхности и назальные и синусовые поверхности. Осмотически активное вещество здесь иногда называется "осмолит".

Было замечено, что гипертонический солевой раствор в виде аэрозоля улучшает легочную функцию и усиливает очищение от слизи при введении пациентам с КФ, хотя гипертонического солевого раствора было недостаточно для восстановления раскрытого состояния закрытых дыхательных путей. В соответствии с настоящим изобретением ожидается, что легочный сурфактант, посредством детергент-подобного действия, поможет улучшить мукоцилиарный клиренс откашливанием и уменьшить непроходимость дыхательных путей с помощью уменьшения адгезии слизи. Настоящее изобретение использует легочные сурфактанты, отдельно или в комбинации с осмотически активным веществом для того, чтобы дать большую суммарную пользу пациентам с легочными расстройствами, отличающимися ненормальной выработкой слизи или ослабленным очищением от слизи.

Таким образом, один аспект настоящего изобретения описывает способы лечения легочных расстройств, вовлекающих ненормальную выработку слизи или ослабленное очищение от слизи. Способы включают введение легочного сурфактанта пациенту в количестве, эффективном для того, чтобы содействовать очищению от слизи у пациента. Способ необязательно может включать введение легочного сурфактанта вместе с осмотически активным веществом. Способ может дополнительно включать комбинированную терапию с другими мукокинетическими, муколитическими или терапевтическими средствами.

Другой аспект изобретения описывает фармацевтические композиции для лечения легочных расстройств, вовлекающих ненормальную выработку слизи или

ослабленное очищение от слизи. Эти композиции содержат легочный сурфактант в сочетании с осмотически активным веществом. В разных вариантах осуществления осмолярность композиций устанавливают в соответствии с типом легочного расстройства, которое подвергается лечению, причем осмолярность может колебаться в пределах от приблизительно изоосмотического (например, для лечения синусита или легких форм хронического бронхита) до самого гиперосмотического (например, для лечения кистозного фиброза), как подробнее описано здесь.

Способы, способствующие очищению от слизи

Предоставлены способы, способствующие очищению от слизи и улучшающие легочную функцию у пациентов, страдающих от легочных состояний, при которых выработка слизи является чрезмерной, густой или иным образом затрудненной для вычищения из легких и дыхательных путей. Подобные состояния включают, но не ограничиваются этими состояниями, кистозный фиброз, острый или хронический бронхит, вентиляционно-ассоциированную пневмонию, бронхоэктазию, бронхолит, первичную или вторичную цилиарную дискинезию, COPD, астму, пневмонию или синусит.

Один из способов включает введение экзогенного легочного сурфактанта (ЛС) пациенту, в лекарственной форме и в режиме, эффективном для улучшения очищения от слизи легких и дыхательных путей. Без намерения ограничиваться механизмом, полагают, что введение ЛС улучшает выведение слизи из дыхательных путей посредством снижения поверхностного натяжения и увеличения текучести слизистых пробок, облегчая, таким образом, выведение слизи и действуя как отхаркивающее средство. Слизь может отходить из других недоступных областей легкого и таким образом может становиться доступной для других терапевтических средств. Кроме того, показано, что определенные сурфактанты, такие как луцинактант и другие сурфактанты неживотного происхождения, обладают противовоспалительными свойствами, которые чрезвычайно полезны для уменьшения признаков и симптомов КФ и других вышеперечисленных легочных состояний, при которых некоторую роль играет воспаление и инфекция (например, *Pseudomonas aeruginosa*).

Другой способ включает комбинированную терапию с помощью ЛС и осмотически активного вещества. Было показано, что осмотически активные вещества, такие как гиперосмотический солевой раствор, способствуют выведению слизистых секретов из дыхательных путей, таким образом, улучшая легочную функцию. Однако такие вещества не могут успешно восстанавливать раскрытое состояние дыхательных путей, и их применение может вызывать у некоторых пациентов бронхостеноз и усиливать воспаление. Введение ЛС вместе с осмотически активными веществами будет облегчать некоторые из этих негативных побочных явлений, так как предоставляет дополнительные преимущества уменьшенного поверхностного натяжения в легких и дыхательных путях и повышенной текучести слизи, как описано выше.

Любой из вышеупомянутых способов может быть объединен с дополнительным видом лечения состояния, которое подвергается лечению, включая лечение другими терапевтическими средствами, такими как, стероиды, оксид азота, антиоксиданты или химически активные поглотители кислорода, кортикостероиды, отхаркивающие средства, муколитические средства, бронходилататоры, диуретики, антибактериальные или противомикробные средства, антигипертензивные средства или противовоспалительные средства (например, ингибиторы PLA2, ингибиторы протеазы или эластазы, ингибиторы PDE-4, не говоря уже о других), как будет понятно специалисту в данной области техники. Такие средства могут быть

введены одновременно или последовательно с композициями сурфактантов и осмотически активных веществ, если они используются. Последовательное введение дополнительных терапевтических средств может быть предшествующим или последующим относительно введения гиперосмотического средства и сурфактантной композиции. Последовательное введение может быть выполнено в разные моменты времени. Таким образом, каждый компонент может быть введен отдельно, но достаточно близко по времени, для обеспечения желательного терапевтического эффекта. Определение подходящего времени, последовательности и дозировок введения отдельных лекарственных средств настоящего изобретения находится в пределах компетенции квалифицированных специалистов.

Легочные сурфактанты:

Любой легочный сурфактант, применяемый в настоящее время, или в дальнейшем разработанный для применения при респираторном дистресс-синдроме и других легочных состояниях, пригоден для применения в настоящем изобретении. Это включает природный и синтетический легочный сурфактант. Синтетические ЛС, при использовании здесь, относятся и к безбелковым сурфактантам легкого и легочным сурфактантам, содержащим синтетические пептиды, включая пептидные миметики природного сурфактантного протеина. Современные ЛС продукты включают, но не ограничиваются этим, лусинактант (Сурфаксин[®], Discovery Laboratories, Inc., Варрингтон, Пенсильвания), бычий липидный сурфактант (BLES[®], BLES Biochemicals, Inc. London, Онтарио), калфактант (Infasurf[®], Forest Pharmaceuticals, Сент-Луис, МО), природный бычий сурфактант (Альвеофакт[®], Thomae, Германия), бычий сурфактант (Surfactant TA[®], Tokyo Tanabe, Япония), порактант альфа (Curosurf[®], Chiesi Farmaceutici SpA, Парма, Италия), пумактант (Alec[®], Britannia Pharmaceuticals, Великобритания), берактант (Survanta[®], Abbott Laboratories, Inc., Аббот-парк, Иллинойс) и колфосцерил палмитат (Экзосурф[®], GlaxoSmithKline, plc, Middlesex, Великобритания). В предпочтительном варианте осуществления ЛС содержит синтетические пептиды. Наряду с другими преимуществами синтетический ЛС этого типа является менее иммуногенным, чем природный ЛС или ЛС, содержащий протеины животного происхождения. Следовательно, синтетический ЛС является более подходящим для повторяющегося воздействия при лечении хронических состояний.

В определенных аспектах легочный сурфактант настоящего изобретения содержит катионный пептид, который может быть получен из животного источника или синтетическим путем. Примеры пептидов для применения здесь включают природные и неприродные легочные сурфактантные полипептиды, такие как, например, один или комбинация полипептидов, полученных от животного, SP-A, SP-B, SP-C или SP-D; рекомбинантные полипептиды SP-A, SP-B, SP-C или SP-D; синтетически полученные полипептиды SP-A, SP-B, SP-C или SP-D; аналоги SP-A, SP-B, SP-C и SP-D; полипептидные миметики SP-A, SP-B, SP-C и SP-D; консервативно модифицированные варианты этого, сохраняющие активность; и фрагменты этого, сохраняющие активность. Легочный сурфактантный полипептидный мимик (имитатор, mimic) является в большинстве случаев полипептидом, который разработан так, чтобы имитировать важнейшие свойства человеческого сурфактантного протеина. В определенных предпочтительных вариантах осуществления легочный сурфактантный полипептид содержит катионный пептид, который состоит приблизительно, по меньшей мере, из 10, предпочтительно, по меньшей мере, из 11 аминокислотных

остатков, и не более чем около 80, более обычно меньше, чем около 35, и предпочтительно меньше, чем около 25 аминокислотных остатков.

Примеры аминокислотных последовательностей легочных сурфактантных полипептидов для использования здесь, способы их выделения и получение их методами генной инженерии известны в данной области техники. Смотри, например. Патент США №5874406; 5840527; 4918161; 5827825; 6660833, 5006343; 5455227; 5223481; 5753621; 5891844; 4861756; 5272252; 502495; 5238920; 5302481; 6022955; 5874406; 5840527; 5827825; 6013619; 6660833; и Международные публикации № WO8603408 и WO 8904326.

Предпочтительным легочным сурфактантным пептидом для применения здесь является полипептид SP-B или SP-C или полипептидный мимик.

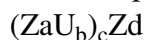
Предпочтительный синтетический легочный сурфактант содержит один или больше фосфолипидов и полипептид, в котором полипептид при смешивании с фосфолипидом образует синтетический легочный сурфактант, имеющий сурфактантную активность больше, чем сурфактантная активность одного фосфолипида. Особенно предпочтительным легочным сурфактантным полипептидом для применения здесь является полипептид SP-B или полипептидный мимик. SP-B является протеином в природном легочном сурфактанте, который как известно является наиболее важным сурфактантным протеином для снижения поверхностного натяжения и содействия кислородному обмену. SP-B полипептидные мимики представляют собой небольшие гидрофобные полипептиды, размером обычно меньше, чем около 80 аминокислот. Многие SP-B полипептидные мимики имеют повторяющийся гидрофобный катионный мотив. Подобно природному полипептиду SP-B, SP-B мимики, предпочтительно, уменьшают поверхностное натяжение терминальных дыхательных путей, в которых не происходит газообмен, и способствуют кислородному обмену. Более того, полагают, что сурфактантные композиции, содержащие такие SP-B мимики (например, луцинактант), обладают антибиотическими свойствами и не являются иммуногенными.

Предпочтительным SP-B миметиком для применения в настоящем изобретении является пептид KL4, который представляет собой катионный пептид, содержащий повторяющиеся остатки лизина и лейцина. KL4 является представителем семейства легочных сурфактантных полипептидных миметиков, которые описаны, например, в Патентах США 5260273, 5164369, 5407914 и 6613734. Способы получения KL4 пептида можно найти в Патенте США 5164369.

В определенных вариантах осуществления легочные сурфактантные полипептидные мимики относятся к полипептидам с последовательностью аминокислотных остатков, которая имеет составную гидрофобность меньше, чем ноль, предпочтительно меньше, чем или равную -1, более предпочтительно меньше чем или равную -2. Значение составной гидрофобности для пептида определяется установлением значения соответствующей гидрофобности для каждого аминокислотного остатка в пептиде, как описано в Hopp et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 3824-3829, 1981. Для данного пептида значения гидрофобности суммируют, при этом сумма представляет значение составной гидрофобности. Эти гидрофобные полипептиды обычно выполняют функцию гидрофобной области SP18. Соответственно, в определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность легочного сурфактантного полипептида имитирует образец гидрофобных и гидрофильных остатков SP18 и выполняет функцию гидрофобной области SP18. SP18 представляет собой известный легочный сурфактантный апопротеин, более подробно описанный в Glasser et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 4007-

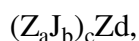
4001, 1987. Должно быть понятно, однако, что полипептиды и другие сурфактантные молекулы настоящего изобретения не ограничиваются молекулами, имеющими последовательности, подобные последовательностям нативного SP18. Наоборот, некоторые предпочтительные сурфактантные молекулы настоящего изобретения имеют небольшое сходство с SP18 в отношении специфической последовательности аминокислотных остатков, кроме того, что они имеют сходную сурфактантную активность и переменные заряженные/незаряженные (или гидрофобные/гидрофильные) последовательности остатков.

В определенных вариантах осуществления типичные полипептиды для применения здесь имеют переменные области гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков и описываются, как имеющие, по меньшей мере, 10 аминокислотных остатков, представленных формулой



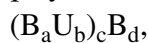
Z и U представляют собой аминокислотные остатки, так что в каждом случае Z и U выбирают независимо. Z является гидрофильным аминокислотным остатком, предпочтительно выбранным из группы, состоящей из R, D, E и K. U является гидрофобным аминокислотным остатком, предпочтительно выбранным из группы, состоящей из V, I, L, C, Y и F. Буквы "a", "b", "c" и "d" представляют собой числа, которые указывают количество гидрофильных или гидрофобных остатков. Буква "a" имеет среднее значение от около 1 до около 5, предпочтительно от около 1 до около 3. Буква "b" имеет среднее значение от около 3 до около 20, предпочтительно от около 3 до около 12, наиболее предпочтительно от около 3 до около 10. Буква "c" является числом от 1 до 10, предпочтительно от 2 до 10, наиболее предпочтительно от 3 до 6. Буква "d" имеет среднее значение от около 0 до около 3, предпочтительно от 1 до 2.

В определенных вариантах осуществления сурфактантные полипептиды включают последовательность, имеющую переменные группировки аминокислотных остатков, как показано формулой



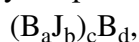
в которой Z является аминокислотным остатком независимо выбранным из группы, состоящей из R, D, E и K; J является α -аминоалифатической карбоновой кислотой; a имеет среднее значение от около 1 до около 5; b имеет среднее значение от около 3 до около 20; c является числом от 1 до 10; и d является числом от 0 до 3.

В определенных вариантах осуществления полипептиды настоящего изобретения имеют переменные группировки областей аминокислотных остатков, как показано формулой



в которой B является аминокислотным остатком, независимо выбранным из группы, состоящей из H, 5-гидроксилизина, 4-гидроксипролина и 3-гидроксипролина; и U является аминокислотным остатком, независимо выбранным из группы, состоящей из V, I, L, C, Y и F. В одном предпочтительном варианте B представляет собой аминокислоту, полученную из коллагена, и является предпочтительно выбранной из группы, состоящей из 5-гидроксилизина, 4-гидроксипролина и 3-гидроксипролина; a имеет среднее значение от около 1 до около 5; b имеет среднее значение от около 3 до около 20; c является числом от 1 до 10; и d является от 0 до 3.

В определенных вариантах осуществления сурфактантные полипептиды настоящего изобретения включают последовательность, имеющую переменные группировки аминокислотных остатков, как представлено формулой

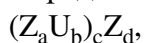


в которой В является аминокислотным остатком, независимо выбранным из группы, состоящей из Н, 5-гидроксилизина, 4-гидроксипролина и 3-гидроксипролина; и J является α -аминоалифатической карбоновой кислотой; а имеет среднее значение от около 1 до около 5; b имеет среднее значение от около 3 до около 20; с является

числом от 1 до 10; и d является числом от 0 до 3.

В разных вариантах осуществления, включая "J" в релевантной формуле, J является α -аминоалифатической карбоновой кислотой, имеющей от четырех до шести углеродов, включительно. В других вариантах J является α -аминоалифатической карбоновой кислотой, имеющей шесть или больше углеродов, включительно. В других вариантах J выбирают из группы, состоящей из α -аминоаминобутановой кислоты, α -аминопентановой кислоты, α -амино-2-метилпропионовой кислоты и α -аминогексановой кислоты.

В определенных вариантах осуществления сурфактантные полипептиды настоящего изобретения содержат последовательность, имеющую, в том числе последовательность, имеющую переменные группировки аминокислотных остатков, как представлено формулой



в которой Z является аминокислотным остатком, независимо выбранным из группы, состоящей из R, D, E и K; и U является аминокислотным остатком, независимо выбранным из группы, состоящей из V, I, L, C, Y и F; из группы, состоящей из V, I, L, C и F; или из группы, состоящей из L и C; а имеет среднее значение от около 1 до около 5; b имеет среднее значение от около 3 до около 20; с является от 1 до 10; и d является от 0 до 3.

В вышеупомянутых формулах Z и U, Z и J, В и U, и В и J являются аминокислотными остатками, которые при каждом появлении являются независимо выбранными. Кроме того, в каждой из вышеприведенных формул, а в большинстве случаев имеет среднее значение от около 1 до около 5; b в большинстве случаев имеет среднее значение от около 3 до около 20; с является числом от 1 до 10; и d является числом от 0 до 3.

В определенных вариантах осуществления Z и В являются заряженными аминокислотными остатками. В других предпочтительных вариантах осуществления Z и В являются гидрофильными или положительно заряженными аминокислотными остатками. В одном варианте Z предпочтительно выбирают из группы, состоящей из R, D, E и K. В связанном варианте осуществления Z предпочтительно выбирают из группы, состоящей из R и K. В еще одном предпочтительном варианте В предпочтительно выбирают из группы, состоящей из Н, 5-гидроксилизина, 4-гидроксипролина и 3-гидроксипролина. В одном предпочтительном варианте В является Н. В другом предпочтительном варианте В является коллаген образующим аминокислотным остатком и является выбранным из группы, состоящей из 5-гидроксилизина, (δ -гидроксилизина), 4-гидроксипролина и 3-гидроксипролина.

В определенных вариантах осуществления U и J являются предпочтительно незаряженными аминокислотными остатками. В другом предпочтительном варианте осуществления U и J являются гидрофобными аминокислотными остатками. В одном варианте осуществления U предпочтительно выбирают из группы, состоящей из V, I, L, C, Y и F. В другом предпочтительном варианте осуществления U выбирают из группы, состоящей из V, I, L, C и F. В еще одном предпочтительном варианте осуществления U выбирают из группы, состоящей из L и C. В различных предпочтительных вариантах U является L.

Также, в определенных вариантах осуществления В является аминокислотой, предпочтительно выбранной из группы, состоящей из Н, 5-гидроксилизина, 4-гидроксипролина и 3-гидроксипролина. Альтернативно, В может быть выбрана из группы, состоящей из коллагенообразующих аминокислот, которые включают 5-гидроксилизин, 4-гидроксипролин и 3-гидроксипролин.

В определенных вариантах осуществления заряженные и незаряженные аминокислоты выбирают из групп модифицированных аминокислот. Например, в одном предпочтительном варианте осуществления заряженную аминокислоту выбирают из группы, состоящей из цитруллина, гомоаргинина или орнитина, не говоря о других примерах. Также в различных предпочтительных вариантах незаряженную аминокислоту выбирают из группы, состоящей из α -аминобутановой кислоты, α -аминопентановой кислоты, α -амино-2-метилпропионовой кислоты и α -аминогексановой кислоты.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения пункты "a", "b", "c" и "d" являются числами, которые указывают число заряженных и незаряженных остатков (или гидрофильных или гидрофобных остатков). В разных вариантах "a" имеет среднее значение от около 1 до около 5, предпочтительно от около 1 до около 3, более предпочтительно от около 1 до около 2, и даже более предпочтительно, 1.

В разных вариантах "b" имеет среднее значение от около 3 до около 20, предпочтительно от около 3 до около 12, более предпочтительно от около 3 до около 10, даже более предпочтительно около 4-8. В одном предпочтительном варианте "b" является около 4.

В разных вариантах "c" является от 1 до 10, предпочтительно от 2 до 10, более предпочтительно в пределах 3-8 или 4-8, и даже более предпочтительно от 3 до 6. В одном предпочтительном варианте "c" является около 4.

В разных вариантах "d" является от 0 до 3 или от 1 до 3. В одном предпочтительном варианте "d" является от 0 до 2 или от 1 до 2; в другом предпочтительном варианте "d" является 1.

При утверждении, что аминокислотный остаток является независимо выбранным, это означает, что при каждом случае, остаток выбирают из отдельной группы. То есть, когда "a" является 2, например, каждый из гидрофильных остатков, представленных Z, будет независимо выбранным и таким образом может включать RR, RD, RE, RK, DR, DD, DE, DK и тому подобное. При утверждении, что "a" и "b" имеют средние значения, это означает, что хоть число остатков в повторяющейся последовательности (например, $Z_a U_b$) может немного варьировать в пептидной последовательности, средние значения "a" и "b" могут быть от около 1 до около 5 и от около 3 до около 20, соответственно.

Например, при использовании формулы $(Z_a U_b)_c Z_d$ для пептида, обозначенного "KL8" в таблице 2 ниже, формула может быть прочитана как $K_1 L_8 K_1 L_8 K_1 L_2$, в которой среднее значение "b" представляет собой шесть [т.е. $(8+8+2)/3=6$], c представляет собой три, и d является нулем.

Полипептиды настоящего изобретения также могут быть субъектом для различных изменений, таких как вставки, делеции и замещения, или консервативных или неконсервативных, когда такие изменения предоставляют определенные преимущества при их применении.

Дополнительные остатки могут быть добавлены на любом конце полипептида настоящего изобретения, например с целью обеспечения "линкера", посредством

которого такой полипептид можно легко прикрепить к меченой или твердой матрице или носителю. Метки, твердые матрицы и носители, которые можно использовать с полипептидами данного изобретения, хорошо известны в данной области техники.

Линкеры аминокислотных остатков обычно представляют собой, по меньшей мере, один остаток и могут состоять из 40 или больше остатков, более часто от 1 до 10 остатков. Типичными аминокислотными остатками, используемыми для связывания, являются тирозин, цистеин, лизин, глутаминовая и аспарагиновая кислота или тому подобное. Кроме того, полипептидная последовательность настоящего изобретения может отличаться от природной последовательности последовательностью, которая является модифицированной концевым-NH₂ ацилированием, например, ацетилированием, или амидированием тиогликолевой кислоты, концевым-карбоксиамидированием, например, аммиаком, метиламином и тому подобным.

В определенных вариантах осуществления примеры SP-B полипептидных мимиков, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают, но без ограничения, приведенные в таблице ниже.

Легочные сурфактантные пептиды-миметики			Таблица
Обозначение ¹	SEQ ID NO	Последовательность аминокислотных остатков	
KL4	1	KLLLLKLLLLKLLLLKLLLLK	
DL4	2	DLLLLDLLLLDLLLLDLLLLD	
RL4	3	RLLLLRLLLLRLLLLRLLLLR	
RL8	4	RLLLLLLLLRLLLLLLLLRLL	
R2L7	5	RRLLLLLLRRLLLLLLRRL	
	6	RLLLCLLRLLLLCLLLR	
	7	LLLLCLLRLLLLCLLRLL	
	8	RLLLCLLRLLLLCLLRLLLLCLLR DLLLLDLLLLDLLLLDLLLLD	
RCL1	9	RLLLCLLRLLLLCLLLR	
RCL2	10	RLLLCLLRLLLLCLLRLL	
RCL3	11	RLLLCLLRLLLLCLLRLLLLCLLR	
KL8	12	KLLLLLLLLKLLLLLLLLKLL	
KL7	13	KKLLLLLLKKLLLLLLKKL	

¹ Обозначение представляет собой аббревиатуру для указанной последовательности аминокислотных остатков.

Легочный сурфактант обычно содержит один или больше липидов. В этих вариантах осуществления сурфактантная композиция может содержать, например, приблизительно только от 0,05 до 100% весовых процентов жидкости, пока получающаяся композиция обладает сурфактантной активностью. Под весовым процентом имеется в виду процент веса соединения в композиции относительно веса всей композиции. Таким образом, например, композиция, имеющая 50 весовых процентов липида, содержит 50 грамм липида на 100 грамм всей композиции. Термин "липид" при использовании здесь относится к природному, синтетическому или полусинтетическому (т.е. модифицированному природному) соединению, которое в большинстве случаев является амфипатическим. Липиды обычно содержат гидрофильный компонент и гидрофобный компонент. Примеры липидов включают, но без ограничения, фосфолипиды, жирные кислоты, жирные спирты, нейтральные жиры, фосфатиды, масла, гликолипиды, поверхностно-активные вещества (сурфактанты), алифатические спирты, воски, терпены и стероиды. Фраза полусинтетическое (т.е. модифицированное природное) обозначает природное соединение, которое некоторым образом химически модифицировано.

Предпочтительно, в состав липидов входят жирные кислоты, спирты, сложные эфиры и эфиры этого, амины жирного ряда или комбинации этого.

Примеры фосфолипидов включают нативные и/или синтетические фосфолипиды. Фосфолипиды, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются этим, фосфатидилхолины, фосфатидилглицерины, фосфатидилсерины, фосфатидные кислоты, фосфатидилинозитолы, сфинголипиды, диацилглицериды, кардиолипин, церамиды, цереброзиды и тому подобное. Примеры фосфолипидов включают, но не ограничиваются этим, дипальмитоил фосфатидилхолин (DPPC), дилаурил фосфатидилхолин (DLPC) (C12:0), димиристоил фосфатидилхолин (DMPC) (C14:0), дистеароил фосфатидилхолин (DSPC), дифитаноил фосфатидилхолин, нонадеканоил фосфатидилхолин, арахидоил фосфатидилхолин, диолеоил фосфатидилхолин (DOPC) (C18:1), дипальмитолеоил фосфатидилхолин (C16:1), линолеоил фосфатидилхолин (C18:2), миристоил палмитоил фосфатидилхолин (MPPC), стероил миристоил фосфатидилхолин (SMPC), стероил палмитоил фосфатидилхолин (SPPC), палмитоиллеоил фосфатидилхолин (POPC), палмитоил палмитоолеоил фосфатидилхолин (PPoPC), дипальмитоил фосфатидилхолинэтанолламин (DPPE), палмитоилолеоил фосфатидилэтанолламин (POPE), диолеоилфосфатидилэтанолламин (DOPE), димиристоил фосфатидилэтанолламин (DMPE), дистеароил фосфатидилэтанолламин (DSPE), диолеил фосфатидилглицерин (DOPG), палмитоилолеоил фосфатидилглицерин (POPG), дипальмитоил фосфатидилглицерин (DPPG), димиристоил фосфатидилглицерин (DMPG), дистеароил фосфатидилглицерин (DSPG), димиристоил фосфатидилсерин (DMPS), дистеароил фосфатидилсерин (DSPS), палмитоилолеоил фосфатидилсерин (POPS), лецитин соевых бобов, лецитин яичных желтков, сфингомиелин, фосфатидилинозитолы, дифосфатидилглицерин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидные кислоты и фосфатидилхолин яиц (EPC).

Примеры жирных кислот и жирных спиртов включают, но не ограничиваются этим, стерины, пальмитиновую кислоту, цетиловый спирт, лауриновую кислоту, миристиновую кислоту, стеариновую кислоту, фитановую кислоту, дипальмитиновую кислоту и тому подобное. Предпочтительно, жирная кислота является пальмитиновой кислотой, и предпочтительно жирный спирт является цетиловым спиртом.

Примеры сложных эфиров жирных кислот включают, но не ограничиваются этим, метилпальмитат, этилпальмитат, изопропилпальмитат, холестерилпальмитат, пальмитил пальмитат пальмитат натрия, калия пальмитат, трипальмитин и тому подобное.

Примером полусинтетического или модифицированного природного липида является любой один из липидов, описанных выше, который был химически модифицирован. Химическая модификация может включать некоторое количество модификаций; однако, предпочтительной модификацией является присоединение одной или больше групп полиэтиленгликоля (PEG) к желательной части липида.

Полиэтиленгликоль (PEG) широко используется в биоматериалах, биотехнологии и медицине в основном потому, что PEG является биосовместимым, нетоксическим, неиммуногенным и водорастворимым полимером (Zhao и Harris, ACS Symposium Series 680: 458-72, 1997). В области доставки лекарственного средства производные PEG широко применяются для ковалентного связывания (т.е. "пегирования") с протеинами для уменьшения иммуногенности, протеолиза и клиренса (очистения) почек и для увеличения растворимости (Zalipsky, Adv. Drug Del. Rev. 16: 157-82, 1995).

Липиды, которые соединяются (конъюгируют) с PEG, называются здесь "PEG-

липиды." Предпочтительно, при использовании PEG-липидов, что они присутствуют в спиртах и/или альдегидах.

Легочный сурфактант может содержать другие эксципиенты, включая, но не ограничиваясь этим, различные сахара, такие как декстроза, фруктоза, лактоза, мальтоза, маннитол, сахароза, сорбитол, трегалоза и тому подобное, сурфактанты, такие как, например, полисорбат-80, полисорбат-20, сорбита триолеат, тилоксапол и тому подобное, полимеры, такие как PEG, декстран и тому подобное, соли, такие как NaCl, CaCl₂ и тому подобное, спирты, такие как цетиловый спирт, и буферы.

Типичные сурфактантные композиции можно получить с помощью способов, известных в данной области техники. Например, в определенных вариантах осуществления типичные сурфактантные композиции, содержащие липиды и полипептиды, можно получить смешиванием раствора сурфактантного полипептида с суспензией липосом, или смешиванием сурфактантного полипептида с суспензией липосом, или смешиванием сурфактантного полипептида и фосфолипидов непосредственно в присутствии органического растворителя.

Предпочтительно, легочный сурфактант содержит фосфолипиды и свободные жирные кислоты или жирные спирты, например, DPPC (дипальмитоил фосфатидилхолин), POPG (пальмитоил-олеил фосфатидилглицерин) и пальмитиновую кислоту (PA) (см., например. Патент США №5789381).

В определенных предпочтительных вариантах осуществления легочный сурфактант является лусинактаном или другой легочной сурфактантной композицией, содержащей синтетический сурфактантный протеин KLLLLKLLLLKLLLLKLLLLK (KL4; SEQ ID NO:1). Лусинактан является комбинацией DPPC, POPG, пальмитиновой кислоты (PA) и пептида KL4 (весовое соотношение приблизительно 7,5:2,5:1,35:0,267). В определенных вариантах, лекарственное средство заключается в состав при концентрациях, например, 5, 10, 15, 20, 25 или 30 мг/мл содержания фосфолипида. В отдельных других вариантах, лекарственное средство заключается в состав в больших концентрациях, например, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 или больше мг/мл содержания фосфолипида, с сопутствующим увеличением в концентрации KL4.

В других вариантах осуществления легочный сурфактант заключается в состав для доставки в виде аэрозоля. Примеры подходящих композиций для аэрозольной доставки обнаружены в WO 2006/071796. Кроме того, полезно в отдельных случаях использовать лиофилизированный легочный сурфактант, который может быть восстановлен в подходящей фармацевтической среде. Примеры таких композиций и способы их производства найдены в WO 2006/055532.

Осмотически активные вещества:

Любое фармацевтически приемлемое осмотически активное вещество, которое является совместимым с легочными сурфактантами, описанными здесь, считается пригодным для применения в настоящем изобретении. Большое количество таких веществ хорошо известно в данной области техники (см., например, патент США №6926911), включая ионные осмолиты, такие как соли, или они могут представлять собой неионные осмолиты, такие как сахара, сахарные спирты и органические осмолиты. Обычно устанавливают осмоляльность до 300 мОсм/кг, а может быть пригодна осмоляльность вплоть до 1200 мОсм/кг, причем она является хорошо переносимой.

Подходящие ионные осмолиты включают любые соли, состоящие из фармацевтически приемлемого аниона и фармацевтически приемлемого катиона. Такие соединения включают, но не ограничиваются этим, анионы и катионы, которые

содержатся в одобренных FDA продаваемых на рынке коммерческих солях, см., например, Remington: The Science и Practice of Pharmacy, Vol.II, pg.1457 (19th Ed. 1995), и могут быть использованы в любых комбинациях, включая их обычные комбинации. Примеры подходящих солей включают, но не ограничиваются этим, хлорид калия, холин хлорид, холин иодид, хлорид лития, меглюмин хлорид, L-лизин хлорид, D-лизин хлорид, хлорид аммония, сульфат калия, нитрат калия, глюконат калия, иодид калия, железистый хлорид (ferric chloride), дихлорид железа и бромид калия, не говоря о других.

Сахара и сахара-спирты, пригодные для применения в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются этим, дигидроацетон, эритрозу, треозу и эритрулозу, рибозу, арабинозу, ксилозу, фруктозу, сорбозу и тагатозу, глюкозу, маннозу, галактозу, раффинозу, стахиозу, сорбитол, маннитол, дулцитол, арабитол. Когда это целесообразно, обе формы и D и L каждого сахара или сахарного спирта рассматриваются для применения в изобретении.

Органические осмолиты, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются этим, (1) высокомолекулярные спирты (многоатомные спирты), такие как инозитол, мио-инозитол и сорбитол; (2) метиламины, такие как холин, бетаин, карнитин (L-, D- и DL формы), фосфорилхолин, лизо-фосфорилхолин, глицерофосфорилхолин, креатин и креатин фосфат; и (3) аминокислоты, такие как D- и L формы глицина, аланин, глутамин, глутамат, аспартат, пролин и таурин.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления осмотически активное вещество является натриевой солью. Анион соли натрия может быть любым подходящим анионом, включая без ограничения, ацетат, цитрат, лактат, карбонат, бикарбонат, фосфат, иодид, фторид или бромид, и предпочтительно является хлоридом. Соль натрия может быть одноосновной или двухосновной. Осмотически активное вещество в растворенной форме может варьировать от значения pH около 5 до значения pH около 9, и предпочтительно находится в пределах между значением около pH 6 и около pH 8.

Введение

Легочные сурфактанты, отдельно или в комбинации с осмотически активными веществами, вводят пациенту посредством легочной доставки, например, в виде частиц в жидкой или твердой форме с помощью ингаляции в дыхательную систему. Введение путем ингаляции может осуществляться посредством ингалятора с дозатором (MDI).

Ингалятор с дозатором высвобождает дискретное количество лекарства из контейнера для хранения. Высвобождение лекарства осуществляется с помощью сжатой жидкости для того, чтобы вытолкнуть лекарство из канистры для хранения (pMDI), или с помощью силы вдыхания для того, чтобы вытягивать лекарство из удерживающей камеры. Ингалятор с дозатором может высвобождать лекарство, когда пациент сжимает канистру для хранения или непосредственно вдыхает лекарство. Введение путем ингаляции может происходить с помощью разновидности ингалятора с дозатором (MDI), называемого порошковым ингалятором (DPI). Высвобождение лекарства осуществляется с помощью силы вдыхания для того, чтобы вытягивать лекарство из удерживающей камеры.

Предпочтительно введение выполняется посредством распылителя (аэрозольный аппарат). В одном варианте осуществления аэрозольный аппарат представляет собой ультразвуковой распылитель или распылитель с вибрирующей мембраной или распылитель с вибрирующим экраном. Струйный распылитель также можно

использовать, так как настоящие способы могут быть адаптированы ко всем типам распылителей или пульверизаторов. В одном варианте осуществления аэрозольный аппарат представляет собой профессиональный распылитель Aeroneb® Professional Nebulizer (Aerogen Inc., Mountain View, CA, США). Альтернативно, можно
 5 использовать распылители Pan eFlow (Part, Richmond, VA) или Akita 1 или 2 (Activaero, Германия). В другом варианте осуществления аэрозольный аппарат представляет собой капиллярный аэрозольный аппарат, примером которого является аэрозольный генератор (soft-mist generator) доступный от компании Chrysalis Technologies, Richmond,
 10 VA (Nguyen TT et al. (2003) J. Aerosol Med. 16:189).

Предпочтительно, в способах изобретения применяют ингаляторы с высоким выходом для введения легочного сурфактанта и осмотически активного вещества пациенту. Сюда включаются ручные и настольные аппараты, которые дают
 15 производительность более чем около 0,5 мл/мин, и более чем около 15% отложение на легких (например, аппараты Aeroneb, Pan eFlow, Chrysalis и Activaero, как указано выше), чтобы обеспечить достаточное отложение сурфактанта и других активных средств в дыхательных путях для оказания содействия выведению слизи.

В других вариантах осуществления легочный сурфактант в форме аэрозоля может
 20 быть введен как предусмотрено в WO 2005/115520 и WO 2006/026237. Введение можно проводить вместе с другой неинвазивной легочной респираторной терапией, включая применение положительного давления на дыхательные пути. Термин "неинвазивная легочная респираторная терапия" относится к респираторному лечению, которое не
 25 требует эндотрахеальной интубации и может включать непрерывное дыхание под положительным давлением на дыхательные пути (CPAP), двухуровневое положительное давление на дыхательные пути (BiPAP), синхронизированную периодическую обязательную вентиляцию (SIMV) и тому подобное. Применение таких видов лечения затрагивает использование различных дыхательных газов, как должно
 30 быть понятно квалифицированному специалисту. Дыхательные газы, применяемые для неинвазивной легочной респираторной терапии, в данном описании иногда называются "CPAP газ", "CPAP воздух", "nCPAP", "вентиляционный газ", "вентиляционный воздух" или просто "воздух". Однако, эти термины имеют целью
 35 включать любой тип газа, обычно применяемый для неинвазивной легочной респираторной терапии, включая, но, не ограничиваясь этим, газы и газовые комбинации, перечисленные выше, для применения в качестве кондиционирующего газа. В определенных вариантах осуществления газ, применяемый для неинвазивной легочной респираторной терапии, представляет собой тот же самый газ как
 40 кондиционирующий газ. В других вариантах осуществления соответствующие газы являются отличными друг от друга.

В определенных вариантах осуществления способы легочной доставки данного изобретения применяют вместе с CPAP. Показано, что использование CPAP
 45 позволяет увеличить функциональную остаточную емкость легких и улучшить оксигенацию. Гортань расширяется, и устойчивость надъязычных дыхательных путей нормализуется. Наблюдается также улучшение синхронности дыхательных торакоабдоминальных движений и усиление рефлекса надувания Геринга-Брейера после закупорки дыхательных путей. Показано, что CPAP пригодно при лечении
 50 различных состояний, таких как синдром ночного апноэ, храпение, ARDS, IRDS и тому подобного.

Для CPAP необходим источник давления и устройство для доставки или аппарат для доставки. Производящий CPAP воздушный поток обычно генерируется в районе

носовых дыхательных путей превращением кинетической энергии от потока свежего увлажненного газа в положительное давление в дыхательных путях. Непрерывная скорость потока вдыхаемого и выдыхаемого газа от около 5 до около 12 литров/минуту генерирует соответствующее CPAP от около 2 до около 10 см H₂O. К системе CPAP могут быть применены различные модификации, которые включают сенсоры, которые могут применять индивидуальный подход к количеству давления исходя из необходимости для пациента.

Обычно, скорость потока и давление, подходящие для достижения CPAP, основываются на характеристиках пациента, подвергаемого лечению. Подходящие скорости потока и давления могут быть легко вычислены лечащим врачом. Настоящее изобретение включает применение целого ряда скоростей потока вентиляционного газа, включая низкие, умеренные и высокие скорости. В определенных вариантах осуществления аэрозоль может подаваться во время быстрых, или высокочастотных, изменений в потоке и/или давлении. Высокая частота обычно определяется как 0,5 герц и выше. Альтернативно, аэрозоль может подаваться без добавленного положительного давления, т.е. без CPAP в качестве одновременной респираторной терапии. В определенных вариантах осуществления аэрозоль может подаваться во время быстрой, или высокочастотной, осцилляторной перкуссии грудной клетки.

Предпочтительно, воздушный поток, генерирующий CPAP, при доставке пациенту имеет уровень влажности, который сможет предотвратить недопустимые уровни высушивания легких и воздушных путей. Таким образом, воздух, генерирующий CPAP, часто увлажняют посредством пробулькивания через гидратор, или тому подобное, чтобы достигнуть относительной влажности предпочтительно больше, чем около 70%. Более предпочтительно влажность составляет больше, чем около 85% и еще более предпочтительно 98%.

Подходящим источником воздушного потока, вызывающего CPAP, является устройство для CPAP с подводной трубкой (подводное сопротивление выдохам). Это устройство обычно называется "пузырьковое" CPAP. Другим предпочтительным источником давления является клапан потока экспирации, который использует клапаны с переменным сопротивлением на патрубках выдоха аппаратов CPAP. Это обычно выполняется через вентилятор. Другим предпочтительным источником является Infant Flow Driver или "IFD" (Electro Medical Equipment, Ltd., Brighton, Суссекс, Великобритания). IFD генерирует давление на назальном уровне и применяет обычный источник потока и манометр для того, чтобы генерировать струю, подающую высокое давление, способное вызывать эффект CPAP. В литературе говорится, что направление струи подачи высокого давления реагирует на давления, развитые в носовой полости усилиями пациента, и это уменьшает колебания в давлении воздуха во время цикла вдоха. Другие системы CPAP, включая системы, которые имеют сходные возможности с только что рассмотренными системами, также рассматриваются настоящим изобретением.

Поток аэрозоля, производимый согласно доставке в виде аэрозоля, предпочтительно доставляется пациенту через назальное устройство доставки, которое может включать, например, маски, одиночные носовые ответвления, биназальные ответвления, носоглоточные ответвления, назальные канюли и тому подобное. Устройство доставки выбирают так, чтобы свести к минимуму травму, сохранить изоляцию, чтобы избежать потери аэрозоля, и свести к минимуму работу пациента, который должен выполнять дыхание.

При использовании в качестве аэрозольного препарата сурфактантная композиция, с или без осмотически активного вещества, может доставляться в высокодисперсной форме, необязательно в комбинации с подходящим пропеллентом (газом-вытеснителем). Пригодные пропелленты обычно являются газами при условиях

5 окружающей среды и сжимаются под давлением, включая, например, низшие алканы и фторированные алканы, такие как фреон. В определенных вариантах осуществления, в которых сурфактантную композицию доставляют в виде аэрозоля, аэрозоль может быть упакован в подходящий контейнер под давлением.

10 Осмотически активные вещества и сурфактантные композиции также могут быть введены в качестве сухого аэрозоля. Подобные композиции вводят пациенту ингаляцией переведенной в аэрозольное состояние порошковой композиции. Например, порошковая композиция может быть представлена в стандартной лекарственной форме, такой как капсула или картридж, и введена как в Патенте США

15 №7025059 или 7025058.

Композиции в форме твердых или жидких частиц, приготовленные для осуществления на практике способов настоящего изобретения, включают частицы вдыхаемого размера, то есть частицы достаточно малого размера, чтобы проходить

20 через носовой проход, рот и трахею во время ингаляции и, в конечном счете, в бронхи и альвеолы легких. Вообще, частицы размером от около 1 до 10 микрон, и около 3-6 микрон ($GSD \leq 2$) для легочной доставки, находятся в пределах вдыхаемых размеров. В определенных вариантах осуществления средний размер частиц составляет, по меньшей мере, около 1, или, по меньшей мере, около 2, или, по меньшей мере, около 3,

25 или, по меньшей мере, около 4, или, по меньшей мере, около 5, или, по меньшей мере, около 6 микрон в диаметре. В других вариантах осуществления, размер частиц составляет меньше чем около 6, или меньше чем около 7, или меньше чем около 8, или меньше чем около 9, или меньше чем около 10 микрон в диаметре. Оттого, что

30 частицы в аэрозоле слишком велики для вдыхания, они могут осаждаться на глотке и быть проглочены, поэтому предпочтительным является то, чтобы количество не вдыхаемых частиц в аэрозоле было как можно меньше. Доставка терапевтических средств в виде аэрозоля, особенно антибиотиков в виде аэрозоля, известна в данной области техники (см., например, Патенты США №7025058, 7025059, 5767068, и 5508269.

35 Также может быть осуществлено введение легочного сурфактанта в виде жидкого инстиллята или аэрозоля во время проведения поддержки пациента с помощью инвазивной механической вентиляции. Легочный сурфактант может быть введен оральным путем, например, через эндотрахеальную трубку, искусственным путем, таким как трахеостомная трубка, или назальным путем, с использованием назальной

40 маски, трубок, канюль и тому подобного. В одном варианте осуществления сурфактантная композиция доставляется через эндотрахеальную или трахеостомную трубку, которую также используют для применения инвазивной механической вентиляции. В другом варианте осуществления сурфактантная композиция

45 доставляется посредством способа доставки, который используют для применения неинвазивной механической вентиляции.

Терапевтически эффективные количества

Для лечения пациента пораженного легочным расстройством, затрагивающим

50 чрезмерную выработку слизи или нарушенное выведение слизи, субъекту вводят терапевтически эффективное количество легочного сурфактанта, одного или в комбинации с осмотически активным веществом. Терапевтически эффективное количество будет обеспечивать клинически существенное увеличение очищения от

слизи, улучшение легочной функции и/или улучшение раскрытого состояния дыхательных путей, и предпочтительно не будет способствовать или поддерживать воспалительный ответ или бронхостеноз.

Терапевтически эффективное количество может зависеть от любого числа переменных, включая без ограничения, пол, размер, рост, вес, возраст, общее здоровье субъекта, тип композиции, способ или метод введения или тяжесть легочного расстройства. Соответствующее эффективное количество может быть легко определено специалистами в данной области техники с помощью стандартных методик оптимизации и заключения, сделанного квалифицированным и просвещенным практиком, и других факторов, очевидных квалифицированным специалистам в данной области техники. Предпочтительно, терапевтически эффективная доза осмотически активных веществ и сурфактантных композиций, описанных здесь, будет обеспечивать терапевтическую пользу без появления значительной токсичности у субъекта.

Токсичность и терапевтическая эффективность веществ или соединений может быть определена с помощью стандартных фармацевтических методик на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (летальная доза для 50% популяции) и ED₅₀ (терапевтически эффективная доза для 50% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс, который может быть выражен как соотношение LD₅₀/ED₅₀. Вещества или композиции, которые демонстрируют большой терапевтический индекс, являются предпочтительными. Дозировки таких веществ или композиций предпочтительно лежат в пределах циркулирующих концентраций, которые включают ED₅₀ с небольшой токсичностью или без токсичности. Дозировка может варьировать в этом диапазоне в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого пути введения.

В предложенных способах пациенту вводят, по меньшей мере, один легочный сурфактант. Однократная доза сурфактанта находится, например, в пределах от около 20 до около 300 мг совокупного фосфолипида (TPL)/кг пациента, более предпочтительно от около 60 до около 175 мг TPL/кг. В определенных вариантах осуществления однократная доза сурфактанта составляет, по меньшей мере, около 20, или 30, или 40, или 50, или 60 TPL/кг. В определенных вариантах осуществления однократная доза сурфактанта составляет вплоть до 70, или 80, или 90, или 100, или 110, или 120, или 130, или 140, или 150, или 160, или 170, или 180, или 190, или 200, или 210, или 220, или 230, или 240, или 250, или 260, или 270, или 280, или 290, или 300 TPL/кг. Конечно, понятно, что точная доза сурфактанта будет зависеть от таких факторов как пол, размер, рост, вес, возраст, общее здоровье субъекта, типа композиции, способа или метода введения или тяжести легочного расстройства, а также других факторов в рамках квалификации или мастерства лечащего клинициста. В определенных вариантах осуществления, в которых сурфактантная композиция доставляется как аэрозоль, например, как описано в WO 2005/115520 и WO 2006/026237, эффективная доза легочного сурфактанта может составлять, например, от около 1 мг TPL/кг сурфактанта до около 1000 мг TPL/кг сурфактанта. В определенных вариантах осуществления эффективная доза легочного сурфактанта составляет около 2 мг TPL/кг или больше сурфактанта. В определенных вариантах эффективная доза составляет вплоть до около 175 мг TPL/кг сурфактанта. В других вариантах эффективная доза легочного сурфактанта составляет вплоть до около 200, вплоть до около 300, вплоть до около 400, вплоть до около 500, вплоть до около 600,

вплоть до около 700, вплоть до около 800, вплоть до около 900 или вплоть до
 около 1000 мг TPL/кг. В определенных вариантах, в которых сурфактантная
 композиция доставляется как сухая порошковая композиция, эффективная доза
 легочного сурфактанта может быть, например, от около 1 мг TPL/кг сурфактанта до
 5 около 1000 мг или больше TPL/кг сурфактанта, предпочтительно от около 2 мг TPL/кг
 сурфактанта до около 175 мг TPL/кг сурфактанта. Другие способы доставки
 включают орошение, промывание легких и тому подобное. При таком употреблении
 пределы дозы находятся в рамках квалификации специалиста в данной области
 10 техники. В определенных вариантах осуществления дозы регулируются таким
 образом, чтобы предоставить пациенту около 20 мг или больше, или 30 мг или больше
 легочной дозы TPL в день, вплоть до около 150 мг, 160 мг, 170 мг, 180 мг, 190 мг
 или 200 мг легочной дозы TPL в день, например, в пределах около 20-200 мг легочной
 15 дозы TPL в день, конкретнее около 30-150 мг легочной дозы TPL в день, и еще
 конкретнее около 60 мг легочной дозы TPL в день. Оптимально, сурфактант является
 сурфактантом неживотного происхождения, неиммуногенным и включает пептид KL4.

В других вариантах пациенту вводят осмотически активное вещество и, по меньшей
 мере, один сурфактант, как представлено в виде примера здесь. Осмоляльность
 20 буфера может составлять, по меньшей мере, около 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400,
 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850 или 900 мОсм/кг. Она может быть в пределах
 вплоть до 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050,
 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450 или 1500 мОсм/кг. В определенных
 вариантах осуществления осмоляльность буфера может быть в пределах от около 100
 25 мОсм/кг до около 1500 мОсм/кг. Конкретнее, осмоляльность находится в пределах
 около 150-1000 мОсм/кг, конкретнее около 200-800 мОсм/кг, и даже конкретнее
 около 250-300 мОсм/кг.

Лечение может быть начато небольшими дозировками, которые меньше
 30 оптимальной дозы осмотически активного вещества и/или сурфактантной
 композиции, с последующим увеличением дозировки во время курса лечения, до тех
 пор, пока не будет достигнут оптимальный результат при этих обстоятельствах. При
 необходимости общая ежедневная дозировка может быть разделена и введена по
 частям в течение дня. При комбинированной терапии различные режимы могут быть
 35 благоприятными в зависимости от природы и тяжести легочного состояния.
 Например, легочный сурфактант и осмотически активное вещество могут быть
 введены вместе, и конечно могут быть включены в одну и ту же фармацевтическую
 композицию, как более подробно описано ниже. Альтернативно, сурфактант и
 40 осмотически активное вещество могут быть введены последовательно. В другом
 варианте осуществления режим может включать чередующиеся способы лечения
 легочным сурфактантом и осмотически активным веществом.

Для эффективного лечения легочных расстройств специалист в данной области
 техники может рекомендовать схему применения и количество дозировки,
 45 соответствующее субъекту, которого лечат. Может быть предпочтительным, что
 дозирование происходит от одного до десяти раз в день, или больше, до тех пор, пока
 необходимо. Схема применения также может изменяться в зависимости от вида
 введения (например, сухой аэрозоль, жидкий инстиллат или жидкий аэрозоль) или от
 50 индивидуальной необходимости субъекта. Введение продолжается в течение периода
 времени предлагаемого врачом или другим медицинским практиком до достижения
 терапевтического или профилактического эффекта. Лечение может продолжаться,
 например, в течение одной или больше недель, одного или больше месяцев, одного

года или больше, включая продолжительность жизни пациента.

В типичном варианте осуществления применяют синтетический легочный сурфактант, имеющий композицию, подобную композиции луцинактанта (содержащей пептид KL4), адаптированную для аэролизации при необходимости, например, регулированием содержания фосфолипидов и их соотношения, растворением исходного вещества или тому подобным. Сурфактант KL4, при аэролизации в дозе от около 5 до 30 мг/мл, предпочтительно вводят из эффективной системы, распыляющей лекарственное средство, как описано выше. Например, 5-7 мл луцинактанта 20 мг/мл можно доставлять с помощью распылителя с вибрирующей сеткой (eFlow, Aeroneb) три раза в день. Альтернативно, 3 мл луцинактанта 20 мг/мл может быть доставлено с помощью ингаляционной системы Akita II (Activaero GmbH, Wohraer Str. 37 D-35285 Gemunden/Wohra, Германия) три раза в день.

При любом режиме дозирования, упомянутом выше, квалифицированный клиницист будет оценивать клинические параметры, такие как улучшение раскрытого состояния дыхательных путей, улучшение легочной функции, например, FEV₁ и другими общепринятыми тестами, мукоцилиарный клиренс и качество жизни, связанное со здоровьем (HRQOL; см., например, Revicki DA, et al., Pharmacoeconomics. 1992 Jun; 1(6):394-408) после периода лечения, например, 7, 14, 21, 28 дней для того, чтобы определить эффективность лечения.

Фармацевтические композиции

Другой аспект изобретения описывает композиции, содержащие осмотически активное вещество и, по меньшей мере, один легочный сурфактант в количестве, эффективном для лечения легочных расстройств, отличающихся избытком слизистой секреции или нарушенным выведением слизи. Эти фармацевтические композиции могут содержать любую комбинацию легочного сурфактанта и осмотически активного вещества, как описано выше, поскольку соответствующие компоненты не являются химически, физически или биологически несовместимыми друг с другом. Фармацевтические композиции могут также содержать дополнительные терапевтические средства или другие компоненты, совместимые с вышеизложенными. Также как описано выше для индивидуальных компонентов, фармацевтические композиции могут быть созданы для доставки в качестве жидких инстиллятов, жидких аэрозолей или сухих аэрозолей.

В предпочтительном варианте осуществления легочный сурфактант является луцинактантом или подобной композицией, содержащей смесь фосфолипидов и синтетических полипептидных SP-B миметиков, таких как KL4, и осмотически активное вещество, такое как соль, например хлорид натрия. В определенных вариантах осуществления осмоляльность композиции может находиться в пределах около 220-800 мОсм/кг, или конкретнее около 250-300 мОсм/кг. В особенных ситуациях, таких как лечение кистозного фиброза, применяемая осмоляльность может быть в пределах вплоть до 900-1200 или больше мОсм/кг. Таким образом, в определенных вариантах осуществления осмоляльность композиции составляет больше, чем около 200, или больше, чем около 210, или больше, чем около 220, или больше, чем около 230, или больше, чем около 240, или больше, чем около 250, или больше, чем около 260, или больше, чем около 270, или больше, чем около 280, или больше, чем около 290, или больше, чем около 300, или больше, чем около 310, или больше, чем около 320, или больше, чем около 330, или больше, чем около 340, или больше, чем около 350, или больше, чем около 360, или больше, чем около 370, или больше, чем около 380, или больше, чем около 390, или больше, чем около 400

мОсм/кг. В определенных вариантах осуществления осмоляльность композиции может составлять вплоть до 300, или 310, или 320, или 330, или 340, или 350, или 360, или 370, или 380, или 390, или 400, или 410, или 420, или 430, или 440, или 450, или 460, или 470, или 480, или 490, или 500, или 510, или 520, или 530, или 540, или 550, или 560, или 570, или 580, или 590, или 600, или 610, или 620, или 630, или 640, или 650, или 660, или 670, или 680, или 690, или 700, или 710, или 720, или 730, или 740, или 750, или 760, или 770, или 780, или 790, или 800, или 850, или 900, или 950, или 1000, или 1050, или 1100, или 1150, или 1200 мОсм/кг. Содержание свободных анионов композиции может быть в пределах около 20-200 ммоль/л или, конкретнее, около 20-50 ммоль/л. В определенных вариантах осуществления содержание свободных анионов композиции составляет, по меньшей мере, около 20, или 30, или 40, или 50 ммоль/л. В других вариантах осуществления содержание свободных анионов композиции составляет вплоть до около 40, или 50, или 60, или 70, или 80, или 90, или 100, или 110, или 120, или 130, или 140, или 150, или 160, или 170, или 180, или 190, или 200 ммоль/л. Значения рН композиций обычно составляют, по меньшей мере, около 6,8. Значения рН могут находиться в пределах вплоть до около 7,4, или 7,5, или 7,6, или 7,7, или 7,8, или 7,9 или 8,0. В отдельных вариантах значения рН могут находиться в пределах около 6,8-8,0 или, конкретнее, около 6,8-7,4. Концентрация сурфактанта в композиции типично составляет, по меньшей мере, около 5, или 10, или 15, или 20, или 25, или 30 мг/мл. Концентрация сурфактанта в композиции может быть вплоть до около 10, или 20, или 30, или 40, или 50, или 60 или больше мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация сурфактанта в композиции может находиться в пределах, например, около 5-60 мг/мл, конкретнее около 10-30 мг/мл, еще конкретнее около 15-20 мг/мл, это последнее разведение является особенно пригодным для аэрозольных композиций. Понятно, что концентрация сурфактанта и/или осмоляльность фармацевтической композиции может быть установлена в соответствии с природой и тяжестью легочного состояния, которое подвергается лечению. Например, при лечении умеренного хронического бронхита нужна композиция с осмоляльностью в пределах, например, 300-500 мОсм/кг, тогда как при лечении кистозного фиброза следует использовать композицию с осмоляльностью в пределах, например, 400-1200 мОсм/кг. Для уменьшения побочных явлений, связанных с крайне гиперосмотическим лечением, концентрацию легочного сурфактанта также необходимо увеличить. Для обеспечения оптимального осаждения в легких сурфактанта в виде аэрозоля, можно также использовать предварительное лечение бронхолитическим средством, например вдыхаемым бета-агонистом (например, албутеролом).

Фармацевтические композиции, содержащие легочный сурфактант и осмотически активное вещество, готовят в соответствии со стандартными фармацевтическими методиками. Например, композиции могут быть приготовлены как жидкие дисперсии с помощью большого разнообразия методов, включая методику пленочного испарителя, или как лиофилизированный продукт. Осмотическое вещество может быть включено в сурфактант во время производства. Альтернативно, его можно объединить с сурфактантом во время использования, например, или разведением жидкой дисперсии или восстановлением лиофилизированного продукта в растворе, содержащем осмотическое вещество. Кроме того, сухое осмотическое вещество может быть добавлено к жидкому сурфактанту (или жидкой дисперсии или восстановленному лиофилизированному продукту) во время использования.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Следующие примеры предоставлены для более подробного описания изобретения.

Они имеют целью иллюстрировать, а не ограничивать изобретение.

Пример 1

Определение влияния высокомолярной соли на вязкость сурфактантной композиции

Нарастающие концентрации NaCl добавляли к растворам, содержащим легочный сурфактант, как описано в таблице 1. Использованным буфером в этих примерах был (Трис Гидроксиметиламиноэтан; Трисамин). В таблице "дисперсия" относится к композиции, приготовленной как i) жидкая дисперсия и "лио": относится к композиции, которая была получена как лиофилизированный продукт и затем восстановлена во время применения.

Композиции сурфактант-солевой раствор.				Таблица 1
Композиция	Концентрация общего фосфолипида (мг/мл)	Концентрация буфера (М)		n
S-43	10	0.13		3
S-43	10	0.5		3
S-43	10	1.0		3
S-43	20	0.13		3
S-43	20	0.5		3
S-43	20	1.0		3
Дисперсия	30	0.13		3
Дисперсия	30	0.5		3
Дисперсия	30	1.0		3
Ллио	30	0.13		3
Ллио	30	0.5		3
Ллио	30	1.0		3

Затем каждую композицию оценивали по кажущейся вязкости при 25°C. Кажущиеся вязкости сурфактантных композиций измеряли при 25°C с помощью реометра TA AR1000 Rheometer (TA Instruments, New Castle, Del., США), установленного при 40 мм /1° акрилового конуса (cone). Сурфактантные композиции доставали из холодильника и давали им уравновеситься при комнатной температуре в течение 30 мин. Приблизительно 350 мкл неразведенного сурфактанта помещали в реометр и давали ему возможность термически уравновеситься с установленной температурой. Образцы исследовали с помощью методики шагового течения (step flow procedure) при линейном увеличении скорости сдвига со временем (от 0 до 200 с⁻¹) с последующим линейным уменьшением скорости сдвига (200 до 0 с⁻¹) в течение приблизительно 6 мин всего времени пробега. Значения кажущейся вязкости, измеренные при скорости сдвига 157 с⁻¹ в течение увеличения и уменьшения, усредняли и регистрировали. Каждую сурфактантную композицию анализировали трижды при каждой температуре.

Результаты измерений вязкости представлены в таблице 2. Результаты не демонстрируют заметного влияния концентрации NaCl на кажущуюся вязкость образца.

Кажущаяся вязкость композиций соль-сурфактант при 25°C.									Таблица 2
NaCl Концент р. (М)	Кажущаяся вязкость при 25°C (cp) (n=3)								
	10 мг/мл		20 мг/мл		30 мг/мл		30 мг/мл - Ллио		
	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD	

0.13	9	1	28	1	43	5	12	1
0.5	9	1	29	1	32	7	9	1
1.0	9	0	28	2	31	9	7	1

Пример 2

Определение активности композиции сурфактант-соль In Vitro

Каждый раствор сурфактант-соль был оценен по его поверхностной активности in vitro. Образцы разводили в 20 мМ буфере Трис-Ас/130 мМ NaCl при значении pH 7,6 или сбалансированном (matching) буфере: 20 мМ Трис-Ас pH 7,6 содержащем 0,13; 0,5 или 1,0 М NaCl. Результаты измерений активности in vitro представлены в таблицах 3 (20 мМ Трис-Ас/130 мМ NaCl) и 4 (сбалансированный буфер). Не наблюдалось влияния концентрации NaCl на активность образцов in vitro при использовании буфера, разбавленного 0,13 NaCl.

Таблица 3

Активность образцов, разведенных в 20 мМ буфере Трис-Ас/130 мМ NaCl.								
NaCl Концент р. (М)	Минимальное поверхностное натяжение при 3 мг-TPL/мл (mN/m)(n=3)							
	10 мг/мл		20 мг/мл		30 мг/мл		30 мг/мл - Lyo	
	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD
0.13	0	0	1	1	0	0	5	4
0.5	0	0	0	0	3	5	4	5
1.0	0	0	2	3	0	0	7	6

Таблица 4

Активность образцов, разведенных в сбалансированном буфере								
NaCl Концент р. (М)	Минимальное поверхностное натяжение при 3 мг-TPL/мл (mN/m)(n=3)							
	10 мг/мл		20 мг/мл		30 мг/мл		30 мг/мл - Lyo	
	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD
0.13	0	0	1	1	0	0	5	4
0.5	0	1	5	5	10	4	0	0
1.0	7	4	12	1	11	3	7	7

Пример 3

Измерение скорости выхода аэрозоля из композиции сурфактант-соль

Каждый раствор сурфактант-соль был оценен по скорости выхода его аэрозоля. Скорость выхода аэрозоля измеряли с помощью распылителя с вибрирующей сеткой Aeroneb Pro и струйного распылителя Pari LC Star. Образцы пропускали через каждый распылитель трижды. Результаты для распылителя Aeroneb Pro представлены на фигуре 1, а результаты для распылителя Pari LC Star представлены на фигуре 2.

Скорость выхода аэрозоля измеряли при 10 мг/мл, 20 мг/мл и 30 мг/мл. Скорость выхода аэрозоля была наибольшей для образца 10 мг/мл, при небольшом уменьшении скорости выхода, наблюдаемой для образца 20 мг/мл относительно образца 10 мг/мл, и дальнейшем уменьшении скорости выхода, наблюдаемом для образца 30 мг/мл относительно образцов 10 мг/мл и 20 мг/мл (фигура 1). Небольшое уменьшение скорости выхода аэрозоля наблюдали после увеличения концентрации соли для образцов 10 мг/мл и 20 мг/мл (фигура 1). Наоборот, образец 30 мг/мл продемонстрировал относительно устойчивую скорость выхода аэрозоля с увеличением концентрации соли (фигура 1).

Скорость выхода аэрозоля, наблюдаемая с помощью распылителя Pari LC Star, была везде меньше, чем скорость, наблюдаемая при использовании распылителя Aeroneb, особенно, что касается образцов 10 мг/мл и 20 мг/мл. Скорость

выхода для образца 10 мг/мл была больше, чем для образцов 20 мг/мл и 30 мг/мл, и было отмечено, что образцы 20 мг/мл и 30 мг/мл имеют почти одинаковые скорости выхода при всех проверенных концентрациях соли (фигура 2). Не наблюдалось
 5 значительного влияния увеличивающихся концентраций NaCl на скорость выхода для любого образца (фигура 2). Устройство eFlow (Pari) применяет технологию, которая сходна с Aeroneb Pro, при этом скорости выхода являются соизмеримыми или немного большими при использовании устройства eFlow.

Пример 4

10 Оценка клинической эффективности совместного введения гиперосмотических веществ и легочных сурфактантов

Этот пример описывает как комбинации-кандидаты гиперосмотических веществ и сурфактантов, как установлено исследователями и описано выше, могут быть оценены по их эффективности у пациентов с легочными расстройствами.

15 Для клинической оценки безопасности и эффективности предложенных композиций и способов для лечения легочных расстройств, применяют следующий протокол. Испытания систематизировали как двойные-слепые, multi-location, рандомизированные, контролируемые растворителем, с оценкой параллельных групп и проводили в течение от 2 до 12 недель. Исследование сравнивает различные
 20 комбинации гиперосмотическое вещество-сурфактант с плацебо.

После отбора на участие в исследовании объекты исследования оценивались по следующему плану: FEV_i (объем фиксированного выдоха за первую секунду) раз в неделю, очищение от слизи и показатели качества жизни измеряют в начале и конце
 25 исследования.

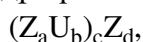
Объект исследования случайно определяли в одну из следующих групп: (a) гиперосмотическое вещество плюс сурфактант; (b) плацебо (в 0,9% изотоническом солевом растворе). Каждого индивидуума лечат в течение 4 недель, три раза в день 3
 30 мл сурфактанта KL4 20 мг/мл с применением аэрозольного аппарата Akita 2. Мембраны устройства чистят ежедневно с помощью ультразвука и handsets (мобильные трубки) заменяют еженедельно.

Исследование определяет величину следующих переменных эффективности: (a) поддержание легочной функции, т.е. принудительный объем выдоха за одну
 35 секунду (FEV_i) со временем; (b) принудительная жизнеспособность (FVC); (c) скорость очищения от слизи; (d) отношение остаточного объема к общему объему легких (RV: TLC); (d) флюорографическое исследование; (e) утвержденный опросник качества жизни (CFQoL); (f) наличие или уменьшение закупорки дыхательных путей.

40 Настоящее изобретение не ограничивается вариантами осуществления, описанными и приведенными в пример выше, но допускает изменение и модификацию в рамках прилагаемой формулы изобретения.

Формула изобретения

45 1. Применение синтетического легочного сурфактанта и, по меньшей мере, одного осмотически активного вещества, где указанный сурфактант включает один или более фосфолипид и полипептид, содержащий, по меньшей мере, 10 аминокислотных остатков и не больше чем около 60 аминокислотных остатков, указанный полипептид,
 50 включающий последовательность, имеющую переменные области гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков, представленную формулой



в которой Z представляет собой гидрофильный аминокислотный остаток,

независимо выбранный из группы, состоящей из R и K;

U представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток, независимо выбранный из группы, состоящей из L и C;

а представляет собой 1 или 2;

б имеет среднее значение от около 3 до около 8;

с является от 1 до 10; и d является от 0 до 2,

в котором при смешивании полипептида и фосфолипида образуется синтетический легочный сурфактант, имеющий сурфактантную активность большую, чем сурфактантная активность одного фосфолипида, в производстве медикамента, способствующего выведению слизи у пациента с легочным состоянием, отличающимся чрезмерной секрецией слизи или ухудшением выведения слизи, где синтетический легочный сурфактант обеспечивает пациенту легочную дозу в диапазоне от 20 до 200 мг общего фосфолипидного эквивалента в день, где комбинация синтетического легочного сурфактанта и, по меньшей мере, одного осмотически активного вещества имеет осмоляльность от 220 до 1200 мОсм/кг, концентрацию свободных анионов от 20 до 200 ммоль/л и значение pH от 6,8 до 8,0.

2. Применение по п.1, в котором легочное состояние представляет собой кистозный фиброз, бронхоэктазию, первичную или вторичную цилиарную дискинезию, COPD, или синусит.

3. Применение по п.1, в котором легочный сурфактант представляет собой 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфоглицерин (POPG), пальмитиновую кислоту (PA) и пептид, содержащий последовательность KLLLLKLLLLKLLLLK (KL4, SEQ ID NO:1).

4. Применение по п.1, в котором медикамент изготовлен в виде жидкого инстиллята, жидкого аэрозоля или сухого аэрозоля.

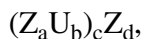
5. Применение по п.1, в котором указанная легочная доза составляет от 30 до 150 мг общего фосфолипидного эквивалента в день.

6. Применение по п.1, в котором осмотически активное вещество представляет собой фармацевтически приемлемый сахар, сахарный спирт или соль.

7. Применение по п.6, в котором осмотически активное вещество представляет собой NaCl, который включается в рецептуру как солевой раствор.

8. Применение по п.7, в котором солевой раствор включает от 0,13 до 1,2 Осм хлорида натрия.

9. Фармацевтическая композиция, способствующая выведению слизи, включающая, по меньшей мере, одно осмотически активное вещество и синтетический легочный сурфактант, включающий один или больше фармацевтически приемлемых фосфолипидов, смешанных с полипептидом SP-B или его фрагментом или полипептидом, содержащим, по меньшей мере, 10 аминокислотных остатков и не больше чем 60 аминокислотных остатков, причем указанный полипептид включает последовательность, имеющую переменные области гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков, представленную формулой



в которой Z представляет собой гидрофильный аминокислотный остаток, независимо выбранный из группы, состоящей из R и K;

U представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток, независимо выбранный из группы, состоящей из L и C;

а представляет собой 1 или 2;

б имеет среднее значение от около 3 до около 8;

с является от 1 до 10; и

d является от 0 до 2,

где синтетический легочный сурфактант обеспечивает пациенту легочную дозу в диапазоне от 20 до 200 мг общего фосфолипидного эквивалента в день, которая имеет осмольность от 220 до 1200 мОсм/кг, концентрацию свободных анионов от 20 до 200 ммоль/л и значение pH от 6,8 до 8,0.

10. Композиция по п.9, в которой синтетический легочный сурфактант включает от 30 до 150 мг общего фосфолипидного эквивалента в день.

11. Композиция по п.9, в которой соль представляет собой NaCl и легочный сурфактант включает 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфоглицерин (POPG), пальмитиновую кислоту (PA) и пептид, содержащий последовательность KLLLLKLLLLKLLLLKLLLLK (KL4, SEQ ID NO:1).

12. Композиция по п.9, в которой осмотически активное вещество представляет собой сахар, сахарный спирт или соль.

13. Композиция по п.9, в которой осмотически активное вещество представляет собой соль.

14. Композиция по п.13, в которой соль представляет собой NaCl и легочный сурфактант включает 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфоглицерин (POPG), пальмитиновую кислоту (PA) и пептид, содержащий последовательность KLLLLKLLLLKLLLLKLLLLK (KL4, SEQ ID NO:1).

15. Композиция по п.9, изготовленная в виде аэрозоля.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Discovery Laboratories, Inc.
 Johnson, Mark
 Segal, Robert
 Hofmann, Thomas
 Capetola, Robert

<120> PULMONARY SURFACTANT FORMULATIONS AND
 METHODS FOR PROMOTING MUCUS CLEARANCE

<130> 48388-1008-00-WO

<140> PCT US2007/[NOT YET ASSIGNED]

<141> 2007-09-19

<150> US 60/845,991

<151> 2006-09-19

<160> 13

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 1

Lys Leu Leu Leu Leu Lys Leu Leu Leu Leu Lys Leu Leu Leu Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Lys
 20

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 2

Asp Leu Leu Leu Leu Asp Leu Leu Leu Leu Asp Leu Leu Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Asp
 20

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 3

Arg Leu Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Arg
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Arg
20

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 4

Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Arg Leu Leu
20

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 5

Arg Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Arg Arg Leu
20

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 6

Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Leu Cys
1 5 10 15

Leu Leu Leu Arg
20

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 7

Leu Leu Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Arg Leu Leu
 20

<210> 8

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 8

Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Arg Asp Leu Leu Leu
 20 25 30

Asp Leu Leu Leu Asp Leu Leu Leu Asp Leu Leu Leu Asp Leu Leu Leu
 35 40 45

Asp

<210> 9

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 9

Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Arg

<210> 10

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 10

Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu
1 5 10 15

Leu Leu Arg Leu Leu
20

<210> 11
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 11

Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu
1 5 10 15

Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Arg
20 25

<210> 12
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 12

Lys Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Lys Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Lys Leu Leu
20

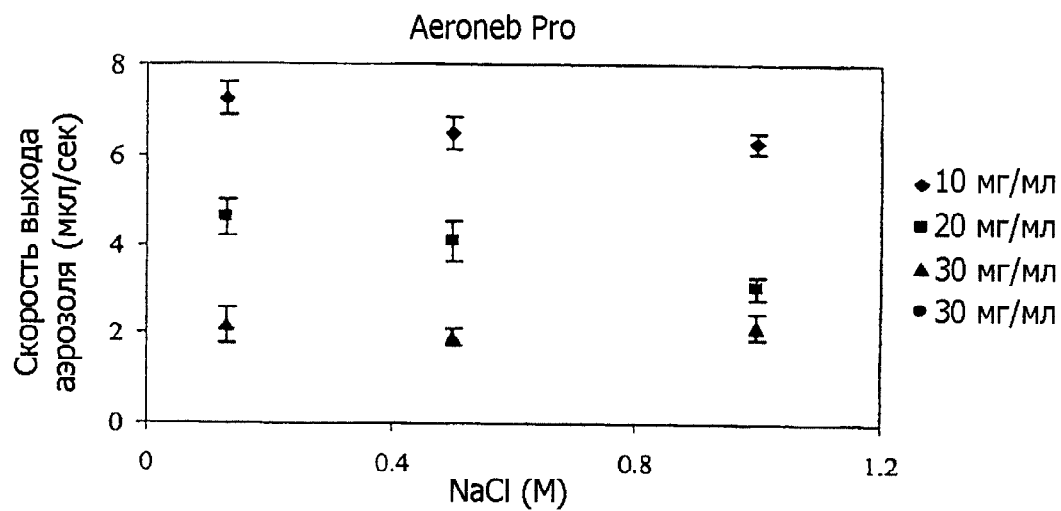
<210> 13
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 13

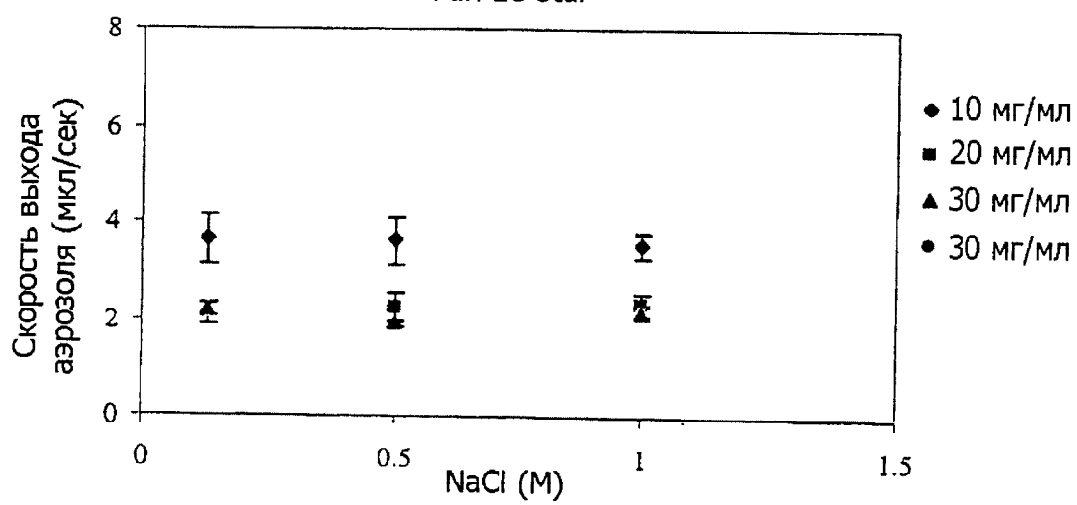
Lys Lys Leu Leu Leu Leu Leu Leu Lys Lys Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Lys Lys Leu
20



Фиг. 1

Pari LC Star



Фиг. 2