(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117615747 A
(43)申请公布日 2024.02.27

(21)申请号 202280047630.7
(22)申请日 2022.07.04
(30)优先权数据
21183790.1 2021.07.05 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.01.04
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2022/068366 2022.07.04
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/280737 EN 2023.01.12
(71)申请人 奇斯药制品公司
地址 意大利帕尔马
(72)发明人 T·圭迪 L·里佐 M·博基
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 王贵杰
(51)Int.Cl.
A61K 9/00(2006.01)
A61P 11/00(2006.01)
A61K 47/10(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

肺表面活性剂的制备方法

(57)摘要

本发明涉及外源性肺表面活性剂、尤其改性天然表面活性剂或重构表面活性剂的制备方法，其中在没有使用氯化溶剂的情况下，进行最终的过滤步骤。本发明还涉及通过所述方法获得的产品，并涉及相应的药物组合物。

CN 117615747 A

1.制备外源性外源性肺表面活性剂的方法,所述外源性表面活性剂选自改性天然表面活性剂或重构合成表面活性剂,所述方法包括以下步骤:

i)从哺乳动物肺中以干糊状物的形式提取所述改性天然表面活性剂或混合所述重构合成表面活性剂的干组分;

ii)纯化所获得的糊状物或混合物;

iii)其中所述纯化步骤ii)通过以下步骤进行:

iv)将所述改性天然表面活性剂的糊状物或所述重构表面活性剂的组分溶解在包含2-甲基-2-丙醇的有机溶剂中,

v)通过过滤对所获得的溶液进行灭菌;和

vi)干燥。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述有机溶剂仅由2-甲基-2-丙醇组成。

3.根据权利要求1或2所述的方法,其中在搅拌下,在30至40℃的温度下进行所述溶解步骤i)。

4.根据权利要求3所述的方法,其中以300-400rpm的速率进行所述搅拌15-30分钟的时间。

5.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中步骤1中所述表面活性剂与所述有机溶剂的比例为6至20%w/v。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述重构表面活性剂是芦西纳坦或elifactant。

7.根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述改性天然表面活性剂选自猪肺磷脂及其生物类似药、贝雷克坦、卡法克坦和勃法克坦。

8.根据权利要求7所述的方法,其中所述改性天然表面活性剂是猪肺磷脂。

9.根据权利要求6所述的方法,其包括以下步骤:

i)在合适的捣碎器中绞碎猪肺;

ii)用生理溶液提取绞碎的肺,然后过滤,并对混合物进行离心;

iii)用有机溶剂或其混合物提取上清液,然后将有机相蒸发至干;

iv)分离含有极性脂质和疏水性蛋白质SP-C和SP-B的级分;

v)收集并汇集所述级分,然后将有机溶液蒸发至干,得到干糊状物形式的表面活性剂;

vi)将所述改性天然表面活性剂的糊状物溶解在包含2-甲基-2-丙醇的有机溶剂中;

vii)通过过滤对所获得的溶液进行灭菌;和

viii)干燥。

10.根据权利要求9所述的方法,其中通过尺寸排阻液体-凝胶色谱法,进行步骤iv)的分离。

11.根据权利要求9所述的方法,其中在不使用氯化溶剂的情况下,进行步骤iv)的分离。

12.根据权利要求11所述的方法,其中通过使用超临界流体,进行步骤iv)的分离。

13.根据前述权利要求中任一项所述的方法,进一步包括以下步骤:

ix)在室温下,在搅拌下,将干燥的产物再悬浮于无菌生理氯化钠水溶液中;

x)任选地,将悬浮液的pH调节至所需值;和

xi)在无菌条件下将所述悬浮液填充到合适的一次性小瓶中。

14.通过权利要求1至13中任一项所述的方法获得的外源性肺表面活性剂。

15.药物制剂,包含通过权利要求1至13中任一项所述的方法获得的外源性肺表面活性剂。

16.通过权利要求1至13中任一项所述的方法获得的外源性肺表面活性剂,用于预防或治疗由肺表面活性剂的缺乏或功能障碍引起或与其相关的各种肺部障碍、异常病症和疾病。

17.根据权利要求16所述的外源性肺表面活性剂,用于治疗新生儿呼吸窘迫综合征(RDS)。

肺表面活性剂的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及改性天然表面活性剂的制备方法。本发明还涉及通过所述方法获得的产品、相应的药物组合物及其用途。

背景技术

[0002] 肺表面活性剂是覆盖肺泡内部的脂质-蛋白质混合物。脂质作为单层存在于肺泡中的气-液界面处降低了表面张力。因此,它减少了在呼气期间肺泡塌陷的趋势,并且可能还减少了流体渗出到空气空间中。

[0003] 内源性肺表面活性剂含有约80%重量的磷脂、10%重量的蛋白质和10%重量的中性脂质如甘油三酯和其他次要组分。

[0004] 在磷脂中,最重要的作用是二饱和形式的二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC),因为它在吸气阶段期间在气-液界面处形成单分子膜,从而稳定肺泡系统。

[0005] 至少四种蛋白质:SP-A、SP-B、SP-C和SP-D通常存在于天然肺表面活性剂中。在这四种蛋白质中,SP-B和SP-C是不同的、低分子量、疏水性蛋白质,已经显示其增强表面活性剂磷脂混合物的表面活性性质,推测是通过促进脂质从本体相层状组织转移到空气-水界面,并且还通过在呼气期间稳定脂质单层所致(参见Hawgood S et al Biochim Biophys Acta.1998Nov 19;1408(2-3)pp 150-160;Johansson J Biochim Biophys Acta.1998Nov 19;1408(2-3)pp 161-72)。

[0006] 肺表面活性剂缺乏或功能障碍引起称为呼吸窘迫的严重呼吸系统疾病,这是高发病率和死亡率的原因,特别是在早产儿和受涉及严重肺功能不全的各种病理影响的成人中。

[0007] 用各种外源性表面活性剂的替代疗法已证明在实验和临床研究中都是有益的。

[0008] 特别是,从哺乳动物肺中提取的改性天然表面活性剂被广泛用作替代疗法。

[0009] 广泛使用的改性天然表面活性剂是源自猪肺并以商标**Curosurf®** (Chiesi Farmaceutici SpA,意大利)销售的猪肺磷脂(poractant alfa),贝雷克坦(beractant)(**Survanta®**,AbbVie Inc,USA)和勃法克坦(bovactant)(**Alveofact®**,Lyomark Pharma GmbH,德国),两者均源自牛肺,和源自小牛肺的卡法克坦(calfactant)(**Infasurf®**,Ony Biotech,USA)。

[0010] 通常,通过不同的方法,将表面活性物质从哺乳动物肺的气道中除去,然后用有机溶剂提取,并干燥。

[0011] 干燥后获得的原料在下文中定义为糊状物(paste)。

[0012] 例如,在US6,129,934中公开了获得卡法克坦的方法,其中通过支气管肺泡灌洗方法,将表面活性物质从小牛肺的气道中除去。将通过支气管肺泡灌洗收集的液体离心以收集表面活性物质的浓缩沉淀物。然后通过加入水溶液如生理盐水,使表面活性物质的沉淀物达到所需体积。

[0013] 可以使用各种有机溶剂从水性悬浮液中提取表面活性物质,所述有机溶剂包括但

不限于氯仿、苯、以及氯仿和甲醇的混合物、乙醚和乙醇的混合物、以及己烷和乙醇的混合物。在优选的实施方案中,使用氯仿和甲醇的混合物。

[0014] 在US4,397,839中公开了获得贝雷克坦的方法,所述方法包括以下步骤:(a)将绞碎的哺乳动物肺组织与电解质溶液接触以获得提取物;(b)离心所述提取物以收集粗沉淀物;(c)通过添加氯化钠调节所述粗沉淀物的水性悬浮液的比重,并离心经调节的悬浮液以分离包含乳化浮渣层的顶层;(d)透析所述顶层的水性悬浮液并冻干经透析的悬浮液以获得粗干产物;(e)使所述粗干产物与乙酸酯接触以收集不溶于所述乙酸酯的物质,然后使不溶性物质与有机溶剂混合物接触以获得纯化的滤液;和(f)浓缩所述纯化的滤液以获得固体残余物。

[0015] EP286,011中公开了制备猪肺磷脂的方法,并且所述方法包括以下步骤:i)绞碎动物肺并在盐水溶液中洗涤它们;ii)通过随后的过滤、离心和用氯仿:甲醇2:1(v/v)的混合物提取,分离表面活性剂;iii)通过蒸发溶剂至干,回收粗的脂质级分;iv)通过使用树脂**Lipidex®-5000**的反相色谱法用1,2-二氯乙烷:甲醇1:4(v/v)作为洗脱剂纯化后者。

[0016] 通过色谱柱的纯化步骤对于确保具有明确定义的、可再现组成的改性天然表面活性剂可能是关键的,并且其已经被优化以获得富含被认为负责生物活性的成分(即极性脂质,主要是磷脂和疏水性蛋白质SP-C和SP-B)且基本上除去非必需组分(即碳水化合物、中性脂质如甘油三酯、胆固醇和游离脂肪酸)的表面活性物质。

[0017] 由于需要改进表面活性剂制剂,已经开发了模拟改性天然表面活性剂组成的合成表面活性剂。所述合成表面活性剂被称为重构表面活性剂。

[0018] 重构表面活性剂的实例包括但不限于芦西纳坦(lucinactant)(Surfaxin™,Windtree Therapeutics,Inc.,Warrington,Pa.)和elifactant,该产品具有在WO2010/139442中连接第9页和第10页的段落中公开的组成,并且在本领域中已知具有实验代码CHF 5633。

[0019] 与表面活性剂的类型无关,通常将所述改性天然表面活性剂的糊状物或所述重构表面活性剂的组分溶解,并通过灭菌过滤,进行进一步的纯化步骤。

[0020] 例如,根据EP286,011,可以将过滤前的所述糊状物溶解在98:2氯仿/甲醇(v/v)中。

[0021] 然而,特定溶剂例如氯仿的使用可能对制造过程的剩余步骤和潜在的产品质量都有一些影响。例如:

[0022] i)管道和过滤器通常都暴露于化学应力下,可能会减少可使用的材料范围;

[0023] ii)因此,进入产品中的可提取组分的水平可能需要额外的处理:

[0024] iii)溶剂蒸发步骤的过程可能需要一些时间或多次重复,以便除去这些化学组分的残留存在。

[0025] 因此,需要涉及不同溶剂的替代步骤以减少或减轻上述风险,并且同时确保产品的所有质量属性。

[0026] 另一方面,由于磷脂的疏水结构,在水性介质中进行溶解阶段是相当具有挑战性的。因此,新的候选物仍然应该是满足以下一些规定标准的有机溶剂:

[0027] i)可替换为氯仿;

[0028] ii)由于温度敏感组分例如蛋白质的存在,能够在体温附近溶解所述表面活性物

质;

[0029] iii)允许相似比例的体积用于溶解阶段;

[0030] iv)适合于蒸发阶段,即具有适当的物理性质(沸点、蒸气压等);

[0031] v)容易获得,且在市场上具有减少的或没有被逐步淘汰的风险。

[0032] 本发明解决了该问题。

[0033] 发明概述

[0034] 在第一实施方案中,本发明提供了制备外源性肺表面活性剂的方法,所述外源性肺表面活性选自改性天然表面活性剂或重构合成表面活性剂,所述方法包括以下步骤:

[0035] i)从哺乳动物肺中以干糊状物的形式提取所述改性天然表面活性剂或混合所述重构合成表面活性剂的干组分;

[0036] ii)纯化所获得的糊状物或混合物;

[0037] 其中所述纯化步骤ii)通过以下步骤进行:

[0038] iii)将所述改性天然表面活性剂的糊状物或所述重构表面活性剂的组分溶解在包含2-甲基-2-丙醇的有机溶剂中,

[0039] iv)通过过滤对所获得的溶液进行灭菌,和

[0040] v)干燥;

[0041] 有利地,所述改性天然表面活性剂的干糊状物可以通过灌洗或柱洗脱从哺乳动物肺获得。

[0042] 优选地,所述改性天然表面活性剂是猪肺磷脂。

[0043] 因此,在一个优选的实施方案中,本发明提供了制备猪肺磷脂的方法,所述方法包括以下步骤:

[0044] i)在捣碎器中绞碎猪肺;

[0045] ii)用生理溶液提取绞碎的肺,然后过滤,并对混合物进行离心,

[0046] iii)用有机溶剂或其混合物提取上清液,然后将有机相蒸发至干,

[0047] iv)分离含有极性脂质和疏水性蛋白质SP-C和SP-B的级分,

[0048] v)收集并汇集所述级分,然后将有机溶液蒸发至干,得到干糊状物形式的表面活性剂,

[0049] vi)将所获得的糊状物溶解在包含2-甲基-2-丙醇的有机溶剂中,

[0050] vii)对所获得的溶液进行灭菌,和

[0051] viii)干燥。

[0052] 本发明还涉及通过本发明的方法获得的外源性肺表面活性剂。

[0053] 在另一方面中,本发明涉及包含通过本发明方法获得的外源性肺表面活性剂作为活性成分的药物制剂。

[0054] 本发明还涉及通过本发明的方法获得的外源性肺表面活性剂,其用于预防或治疗由肺表面活性剂缺乏或功能障碍引起或与其相关的各种肺部障碍、异常病症和疾病。

[0055] 在进一步的方面中,本发明涉及通过本发明的方法获得的外源性肺表面活性剂在制备用于预防或治疗由肺表面活性剂缺乏或功能障碍引起或与其相关的各种肺部障碍、异常病症和疾病的药物中的用途。

[0056] 进一步地,本发明提供了一种预防或治疗由肺表面活性剂缺乏或功能障碍引起或

与其相关的各种肺部障碍、异常病症和疾病的方法,所述方法包括给予需要这种治疗的患者治疗有效量的通过本发明方法获得的外源性肺表面活性剂。

[0057] 附图

[0058] 图1显示了通过本发明的方法获得的**Curosurf®**相对于**Curosurf®**对照和未处理的动物的潮气量(ml/kg)作为时间/压力的函数的结果。

[0059] 定义

[0060] 术语“表面活性剂”和“表面活性物质”作为同义词使用。

[0061] 对于不同类型的外源性肺表面活性剂的详尽定义—参见Wilson D.Expert Opin Pharmacother 2001,2,1479-1493。

[0062] 术语“改性天然表面活性剂”是指绞碎的哺乳动物肺的脂质提取物,其由于在制造过程中使用的脂质提取步骤而不含亲水性蛋白质SP-A和SP-D并且含有可变量的疏水性蛋白质SP-B和SP-C。取决于提取方法,可以含有不同量的磷脂、非表面活性剂脂质和其他次要组分。

[0063] 术语“人造的”表面活性剂是指合成化合物,主要是磷脂和其他脂质的简单混合物,其被配制成模拟天然表面活性剂的脂质组成和行为,但不含表面活性剂蛋白质。

[0064] 术语“重构”肺表面活性剂是指已经添加了从动物中分离的肺表面活性剂蛋白质/肽或通过重组技术制造的蛋白质/肽的人造肺表面活性剂。

[0065] 术语“干的”是指在蒸发有机溶剂后获得的表面活性剂物质。它含有有限量的残余溶剂,包括水。

[0066] 所述醇2-甲基-2-丙醇也称为叔丁醇。

[0067] 术语“极性脂质”主要包括磷脂和一些其他次要组分,例如缩醛磷脂、糖脂、心磷脂和溶血磷脂。

[0068] 术语“磷脂”是指由非极性疏水性尾部、甘油或鞘氨醇部分和极性头部组成的脂质。所述非极性疏水性尾部通常是长链脂肪酸,其又可以是饱和的(例如肉豆蔻酸、棕榈酸和硬脂酸)、单不饱和的(例如油酸)或多不饱和的(例如亚油酸和花生四烯酸)。

[0069] 所述极性头部具有连接到含氮碱的磷酸酯基团。

[0070] 表面活性剂中的磷脂部分主要由磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰甘油(PG)和鞘磷脂(SM)组成。

[0071] 术语“中性脂质”包括甘油三酯、甘油二酯和甘油单酯。

[0072] 术语“尺寸排阻液体-凝胶色谱法”是指其中固定相是凝胶的色谱系统,所述凝胶根据其分子大小保留待分离的物质。

[0073] 术语“猪肺磷脂的生物类似药”是指改性天然肺表面活性剂,其具有相同的安全性,在治疗上是等效的,其在定性-定量组成上具有至少80%的相似性(特别是关于磷脂和表面活性剂蛋白SP-B和SP-C),并且当其以80/mg/ml的浓度悬浮于水溶液中时,其在室温下具有等于或小于15mPas(cP)的粘度。所述粘度可以根据已知方法测定。

[0074] 术语“捣碎器”是指用于混合、压碎、绞碎有机物质的通常为不锈钢的装置。它通常由底部具有旋转金属刀片的容器组成,所述旋转金属刀片由电动机提供动力。

[0075] 术语“无菌”是指符合欧洲药典(Ph.Eur.1998,第2.6.1和5.1.1章)的无菌标准的产品。对最终产品无菌性的进一步规定包括美国药典23/NF18,1995,第1686-1690页和

1963-1975页。

[0076] 表面活性剂制剂的“表面活性剂活性”定义为降低表面张力的能力。

[0077] 外源性表面活性剂制剂的体外功效通常使用合适的装置例如威廉式天平(Wilhelmy Balance)和捕获气泡表面活性计(Captive Bubble Surfactometer)通过测量其降低表面张力的能力来测试。

[0078] 外源性表面活性剂制剂的体内功效通常通过测量两个参数来测试:

[0079] i)潮气量,其是肺顺应性的指标,和

[0080] ii)肺气体量,其是在呼气结束时肺泡空气膨胀或通畅性的指标,并因此是在呼气结束时在肺泡中形成稳定磷脂膜的能力的指标。

[0081] 发明详细公开

[0082] 将在以下详细的说明书中描述本发明方法的特征、所获得的产物和相应的药物组合物。

[0083] 在第一实施方案中,本发明提供了一种制备外源性肺表面活性剂的方法,所述外源性肺表面活性剂选自改性天然表面活性剂或重构合成表面活性剂,所述方法包括以下步骤:

[0084] i)从哺乳动物肺中以干糊状物的形式提取所述改性天然表面活性剂或混合所述重构合成表面活性剂的干组分;

[0085] ii)纯化所获得的糊状物或混合物;

[0086] iii)其中所述纯化步骤ii)通过以下步骤进行:

[0087] iv)将所述改性天然表面活性剂的糊状物或所述重构表面活性剂的组分溶解在包含2-甲基-2-丙醇的有机溶剂中;

[0088] v)通过过滤对所获得的溶液进行灭菌;和

[0089] vi)干燥。

[0090] 有利地,可以根据本领域报道的方法,例如通过基于在色谱柱上洗脱或支气管肺泡灌洗的方法,制备所述改性天然表面活性剂的糊状物。

[0091] 优选地,所述有机溶剂包含2-甲基-2-丙醇,其中甚至更优选的是溶剂仅由2-甲基-2-丙醇组成。更优选地,在进一步优选的实施方案中,所述溶剂是纯度高于99.5%的无水2-甲基-2-丙醇。

[0092] 通常通过在搅拌下施加温和的加温,即在30℃至40℃之间的温度,优选在35℃±1℃下进行本发明方法的步骤iii)的溶解。

[0093] 本领域技术人员应确定搅拌的速率和时间,其通常包括在300-400rpm之间,持续15-30分钟的时间。

[0094] 本领域技术人员应确定表面活性剂和有机溶剂之间的比例。在本发明的优选实施方案中,所述比例高于5%w/w。实际上已经发现,较低的百分比不能提供完全溶解。

[0095] 优选地,其为6至20%w/v,更优选8-12%w/v。

[0096] 可以根据本领域技术人员的知识,进行本发明方法的过滤灭菌步骤iv)。

[0097] 任选地,通过0.45微米孔径的膜过滤器,对溶液进行澄清步骤;然后通过过滤,例如用0.22和0.1微米孔径的过滤器灭菌。

[0098] 在本发明方法的步骤v)中,可以根据本领域技术人员已知的方法,例如通过在氮

气下透析或蒸发和/或暴露于真空或通过其他合适的技术例如冷冻干燥来除去溶剂。

[0099] 由于作为本发明溶剂的2-甲基-2-丙醇的化学和物理性质,可以有利地应用更快的干燥技术,例如切向流过滤。

[0100] 值得注意的是,根据本发明的方法,在干燥步骤结束时残留的2-甲基-2-丙醇的量等于或甚至小于3000ppm,优选等于或小于1500rpm。

[0101] 可以使用任何外源性改性天然肺表面活性剂或重构肺表面活性剂。有利地,所述重构表面活性剂选自芦西纳坦(Surfaxin™,Windtree Therapeutics,Inc.,Warrington,Pa)和本领域引用为CHF 5633的表面活性剂(Chiesi Farmaceutici SpA,意大利),而改性天然表面活性剂选自猪肺磷脂(**Curosurf®**,Chiesi Farmaceutici SpA,意大利)及其生物类似药,贝雷克坦(**Survanta®**,AbbVie Inc,USA)和勃法克坦(**Alveofact®**,Lyomark Pharma GmbH,德国),卡法克坦(**Infasurf®**,Ony Biotech,USA),**Bles®**(Bles Biochemicals Inc,加拿大),KeLiSu(Double Crane,中国),Surfactant TA(**Surfaten®**,Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation,Tokyo)和其他例如**Surfacen® Beraksurf®, Newfactan®**,Surfactant**Gray®**和**Surfactant BL®**。优选的改性天然表面活性剂是猪肺磷脂。因此,在优选的实施方案中,本发明涉及制备猪肺磷脂的方法,所述方法包括以下步骤:

[0102] i)在合适的捣碎器中绞碎猪肺;

[0103] ii)用生理溶液提取绞碎的肺,然后过滤,并对混合物进行离心;

[0104] iii)用有机溶剂或其混合物提取上清液,然后将有机相蒸发至干;

[0105] iv)分离含有极性脂质和疏水性蛋白质SP-C和SP-B的级分;

[0106] v)收集并汇集所述级分,然后将有机溶液蒸发至干,得到干糊状物形式的表面活性剂;

[0107] vi)将所述改性天然表面活性剂的糊状物溶解在包含2-甲基-2-丙醇的有机溶剂中;

[0108] vii)通过过滤对所得溶液进行灭菌;和

[0109] viii)干燥。

[0110] 优选地,所述有机溶剂仅由2-甲基-2-丙醇组成。

[0111] 如下面参考实施例3和4的实验部分中进一步详细描述的,使用2-甲基-2-丙醇允许获得表现出与猪肺磷脂对照批次相同的定性-定量组成和类似的潮气量的产物。

[0112] 可以根据本领域技术人员的知识,进行步骤i)。

[0113] 在上述步骤ii)中,用生理溶液提取绞碎的肺。将混合物通过粗滤器过滤,并在20℃下有利地以1,000×g离心小于30分钟,优选15分钟,以消除细胞碎片。

[0114] 在冷却至4℃保持2小时后,将上清液以3,000×g进一步再离心,有利地不超过2小时,优选不超过1小时,更优选15分钟。

[0115] 在上述步骤iii)中,如EP286,011中所公开的,将丸粒形式的粗固体表面活性剂除去,并用卤代烃和短链脂族醇的混合物提取。

[0116] 将所获得的溶液过滤并用水洗涤,然后使用本领域技术人员熟知的设备在真空下

蒸发至干。

[0117] 根据步骤iv),可以根据本领域已知的方法(Saini R K et al Int J Molecular Sci 2021,22,1-19),通过提取从其他级分中分离含有负责生物活性的组分(极性脂质,主要是磷脂,和疏水性蛋白质SP-C和SP-B)的级分。

[0118] 在猪肺磷脂的情况下,有利地,通过尺寸排阻凝胶色谱法,使用亲脂性Sephadex衍生物作为固定相,卤代烃和短链脂肪醇的混合物作为洗脱剂,进行含有负责生物活性的组分(极性脂质,主要是磷脂,和疏水性蛋白质SP-C和SP-B)的级分与其他级分的分离(步骤iv),如EP286,011中所报道的。

[0119] 更有利地,用于填充色谱柱的固定相由不同的供应商如Sigma Co和Packard Ins以商标**Lipidex®-5000**出售的**Sephadex®**构成。

[0120] 或者,可以使用不采用氯化溶剂例如氯仿的方法进行步骤iv)。

[0121] 例如,可以使用如EP670846中所述的超临界流体进行步骤iv)。本领域技术人员可以根据其知识,进一步调节惰性载体、超临界流体的压力和温度以及助溶剂的类型和用量。

[0122] 否则,可以通过根据本领域已知的方法(C.Allegre et al./Journal of Membrane Science 269(2006)109-117),通过纳滤和超滤,首先除去组分例如胆固醇和甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯,然后通过离子交换色谱法以及叔丁醇和水的混合物作为洗脱剂,获得负责生物活性的组分,进行所述步骤(Separation of lipid mixtures,1972.Lab.Tech.Biochem.Mol.Biol.3,393-469)。

[0123] 在上述步骤v)中,收集并汇集含有极性脂质和疏水性蛋白质SP-B和SP-C的级分,然后将有机溶液在低于50℃,优选低于40℃的温度下蒸发至干。

[0124] 如上所述进行的上述步骤vi)-viii)对于猪肺磷脂是特别关键的。

[0125] 与目前可获得的其他表面活性剂相比,所述改性天然表面活性剂确实在粘度方面具有独特的性质。

[0126] 根据现有技术,这归因于下述事实:猪肺磷脂主要由认为负责生物活性的组分构成,即极性脂质和疏水性蛋白质SP-C和SP-B,以及磷脂级分富含两种组分,即缩醛磷脂和含有PLs的多不饱和脂肪酸(参见Rüdiger M et al.Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005,288,379-383)。

[0127] 因此,所选择的溶剂和条件应保证在步骤vi)和vii)之后表面活性剂的组成不改变。

[0128] 在步骤viii)结束时猪肺磷脂的糊状物具有以下组成(所有值均表示为基于表面活性剂干物质总重量的百分比):

[0129] 总磷含量(P):3.6-4.2%;

[0130] 疏水性蛋白质SP-C和SP-B:0.5-2.2%;

[0131] 中性脂质:等于或小于0.5%;

[0132] 胆固醇:等于或小于0.5%;

[0133] 游离脂肪酸(FFAs):等于或小于1.5%,优选小于1.0%;

[0134] 残留溶剂:等于或小于6.0%;

[0135] 就磷脂酰胆碱物质而言,基于总磷含量,表面活性剂还具有以下百分比的组成:

[0136] 磷脂酰胆碱(PC)含量:66-77%;

[0137] 二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)含量:高于28%,优选33-45%;

[0138] 溶血磷脂酰胆碱(LPC)含量:等于或小于2.0%。

[0139] 任选地,所述干糊状物可以含有少量对生物活性不重要的组分,例如中性脂质、胆固醇、游离脂肪酸、碳水化合物和残留溶剂。

[0140] 有利地,所述非必需组分的总量基于表面活性剂干物质总重量计算为小于5%,优选小于3.5%,更优选小于2.5%,甚至更优选小于1%。

[0141] 可以根据本领域报道的方法,测定肺表面活性剂的各种组分。

[0142] 例如,可以根据基于Barlett GR J Biol Chem,1959,234,406-408的方法的比色程序,估计总磷含量。

[0143] 可以根据以下程序估计PC和LPC的含量。

[0144] 首先,根据Poorthius BJH et al J Lipid Res 1976,17,433-436,首先通过二维薄层色谱(TLC),分离所述表面活性剂的磷脂类。

[0145] 将对应于PC和LPC斑点(通过与参考标准比较鉴定)的二氧化硅使用适当的刀片通过TLC板回收并转移到试管中。

[0146] 根据报道的用于测定总磷含量的程序(参见上文),在每个试管中进行样品矿化。

[0147] 可以根据Mason RJ J Lipid Res 1976,17,281-284中报道的方法,用OsO_4估计DPPC的含量。

[0148] 相对于总磷含量,测定与DPPC相关的磷含量。

[0149] 可以根据本领域已知的方法,通过HPLC分析,估计游离脂肪酸、中性脂质(甘油三酯、甘油二酯和甘油单酯)和胆固醇(分级分离的游离胆固醇和胆固醇酯)的含量。

[0150] 可以根据以下程序,使用市售试剂盒“BCA蛋白质测定试剂”,测定疏水性蛋白质SP-C和SP-B的含量。否则,它可以根据本领域报道的HPLC或毛细管电泳方法测定。

[0151] 可以根据Dubois et al Anal Chem 1956,28,350-356描述的方法测定碳水化合物,并以葡萄糖表示。

[0152] 根据本领域技术人员熟知的程序,分别通过气相色谱法和Karl-Fisher方法,估计残留溶剂和残留水含量。

[0153] 本发明还涉及从哺乳动物肺中提取的糊状物形式的改性天然表面活性剂,或者涉及通过本发明的方法获得或可获得的重构表面活性剂。

[0154] 本发明还涉及药物组合物,其包含从哺乳动物肺中提取的糊状物形式的改性天然表面活性剂,或者涉及通过本发明的方法获得或可获得的重构表面活性剂。

[0155] 所述组合物有利地以溶液、分散体、悬浮液或干粉的形式施用。优选地,所述组合物是无菌制剂的形式,其中所述肺表面活性剂悬浮在合适的溶剂或再悬浮介质中,通常是生理氯化钠水溶液中。

[0156] 因此,为了制备悬浮液形式的无菌制剂,本发明的方法任选地包括以下步骤:

[0157] -ix)在室温下,在搅拌下,将干燥的产物再悬浮于无菌生理氯化钠水溶液中;

[0158] -x)任选地,将悬浮液的pH调节至所需值;和

[0159] -xi)在无菌条件下将所述悬浮液填充到合适的一次性小瓶中。

[0160] 步骤ix)在本领域中称为薄膜水合,并且其可以通过机械搅拌或通过超声处理,并且任选地随后挤出来完成。

[0161] 有利地,所述肺表面活性剂的浓度范围为约2至约160mg表面活性剂/ml,优选10至100mg/ml,更优选20至80mg/ml。当使用猪肺磷脂时,优选的浓度为80mg/ml。

[0162] 通过本发明的方法获得的包含肺表面活性剂的无菌制剂以本领域技术人员已知的方式,优选通过气管内安装(输注或推注)或通过雾化施用,并且它们可用于治疗或预防由肺表面活性剂的缺乏或功能障碍引起或相关的各种肺部障碍、异常病症和疾病。实例是透明膜病、婴儿和成人呼吸窘迫综合征(IRDS和ARDS)、急性肺损伤(例如由臭氧吸入、烟雾吸入或近距离吸入引起的急性肺损伤)、由容积性损伤和气压性损伤触发的表面活性剂失活病症、胎粪吸入综合征、毛细血管渗漏综合征、细菌性和病毒性肺炎以及支气管肺发育不良。

[0163] 它们还可用于治疗或预防其他呼吸系统疾病,例如肺炎、支气管炎、COPD(慢性阻塞性肺病)、哮喘和囊性纤维化,以及用于治疗浆液性中耳炎(胶耳)。

[0164] 以下实施例详细说明本发明。

实施例

[0165] 实施例1-猪肺磷脂干糊状物的制备

[0166] 将约180kg的猪肺在捣碎器中研磨,并将组织碎片在生理溶液中洗涤。将混合物通过粗滤器过滤,并在20℃下以1000×g进行初步离心15分钟,以消除细胞碎片。然后将上清液在4℃下以3000×g再离心2小时。将粗表面活性剂除去,用氯仿:甲醇2:1(v/v)提取,过滤,用水洗涤,并将有机相蒸发,由此得到粗脂质提取物。将脂质级分提取物(约500g)使用约4升的氯仿:甲醇1:4(v/v)回收,通过吹入0.2-0.4大气压的氮气的2.5微米膜过滤器过滤,然后使用填充有**Lipidex®-5000**填充材料2的柱,用氯仿:甲醇1:4(v/v)作为洗脱剂,通过反相色谱法分离。

[0167] 获得约200g纯化的猪肺磷脂干物质,并使用上述分析方法进行测试。

[0168] 纯化的猪肺磷脂干物质具有以下组成(所有值均表示为基于干物质总重量的百分比):

[0169] 总磷含量:3.8%;

[0170] 磷脂酰胆碱(PC)含量:68%;

[0171] 二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)含量:40%;

[0172] 溶血磷脂酰胆碱(LPC)含量:1.0%;

[0173] 疏水性蛋白质SP-C和SP-B:1.6%;

[0174] 游离脂肪酸:0.9%;

[0175] 中性脂质:未检测到;

[0176] 胆固醇:未检测到;

[0177] 碳水化合物:未检测到。

[0178] 实施例2-确定用于通过过滤灭菌的合适溶剂

[0179] 评估包括醇化学组,即乙醇、1-丙醇、2-丙醇和2-甲基-2-丙醇(叔丁醇)。

[0180] 作为第一筛选试验,将等量的猪肺磷脂糊状物(约10克)稀释并与100ml的每种醇混合。在任何情况下,施加轻微加热(35℃)以促进溶解并避免沉淀现象。

[0181] 然后目视评估相关外观,并与猪肺磷脂在氯仿中的参比溶液进行比较。在所测试

的醇中,仅叔丁醇像氯仿参比一样,提供清澈的溶液。其他醇产生乳白色或非常浑浊且不均匀的溶液。

[0182] 一旦将叔丁醇定义为替代溶剂,就决定移至过滤步骤,以便理解该单元操作期间的产物行为。

[0183] 使用以下过滤系统:

[0184] -具有0.45μm孔径和约17cm^{2}过滤表面的玻璃纤维预过滤器。

[0185] -具有0.22μm孔径和约17cm^{2}过滤表面的PVDF生物负载减少过滤器。

[0186] -具有0.1μm孔径和约17cm^{2}过滤表面的PVDF灭菌过滤器。

[0187] 过滤通过蠕动运动进行,并进行恒定压力监测,以计算膜的上游侧和下游侧之间的ΔP。

[0188] 为了比较,对叔丁醇和氯仿溶液二者进行相同的试验。

[0189] 在该过程中没有观察到临界状态。

[0190] 根据以下参数,使用旋转蒸发器(**Rotavapor®**),干燥所获得的溶液:

[0191] -加热浴的温度:35℃

[0192] -冷却器的温度:15-17℃

[0193] -真空:45-50mbar

[0194] -旋转:100rpm

[0195] 收集固体糊状物,并用0.9%w/v氯化钠的无菌水溶液再悬浮。将最终悬浮液填充到小瓶中并在2-8℃下储存。

[0196] 实施例3-产物表征

[0197] 基于上述方法,制备中试批次以评估一般产品可行性以及**Curosurf®**的主要关键质量属性的行为。

[0198] 将干燥的糊状物再悬浮于无菌生理氯化钠水溶液中并在**Rotavapor®**中混合。

[0199] 将由此获得的悬浮液以每毫升生理氯化钠水溶液80mg表面活性剂的浓度分配在小瓶中使用。

[0200] 对小瓶进行分析测试,以验证产品的当前规格是否仍然满足,尽管对其制造过程应用了修改。

[0201] 结果满足所有规格标准。

[0202] 还针对颗粒表征的形态成像,测试了该批次,并与在标准条件下(即通过涉及氯仿作为工艺溶剂的当前工艺)生产的参考批次进行比较。

[0203] 通过本发明的方法获得的**Curosurf®**在胶束尺寸和胶束形状方面证明与**Curosurf®**对照批次非常相似。

[0204] 实施例4-体内表征

[0205] 为了确定表面活性剂活性,通过在早产新生兔上的体内测试,评估气管内施用通过本发明的方法获得的批次对潮气量的影响。

[0206] 使用**Curosurf®**对照批次。

[0207] 以2.5ml/kg的标准剂量施用所述表面活性剂制剂。

[0208] 未成熟新生兔以峰值吹入压力的标准化顺序平行通气。为了打开肺,首先将压力设定为35cm H_2O持续1分钟,在该补充操作之后,将压力降低至25cm H_2O持续15分钟,并且进一步降低至20和15cm H_2O。

[0209] 最后,再次将压力升高至25cm H_2O持续5分钟,之后用氮气使肺再通气5分钟。

[0210] 测量以ml/kg表示的潮气量,并将结果(以中值给出)报告在图1中。

[0211] 可以理解的是,用通过本发明的方法获得的**Curosurf®**治疗的动物显示出与用**Curosurf®**对照批次获得的潮气量类似的潮气量。

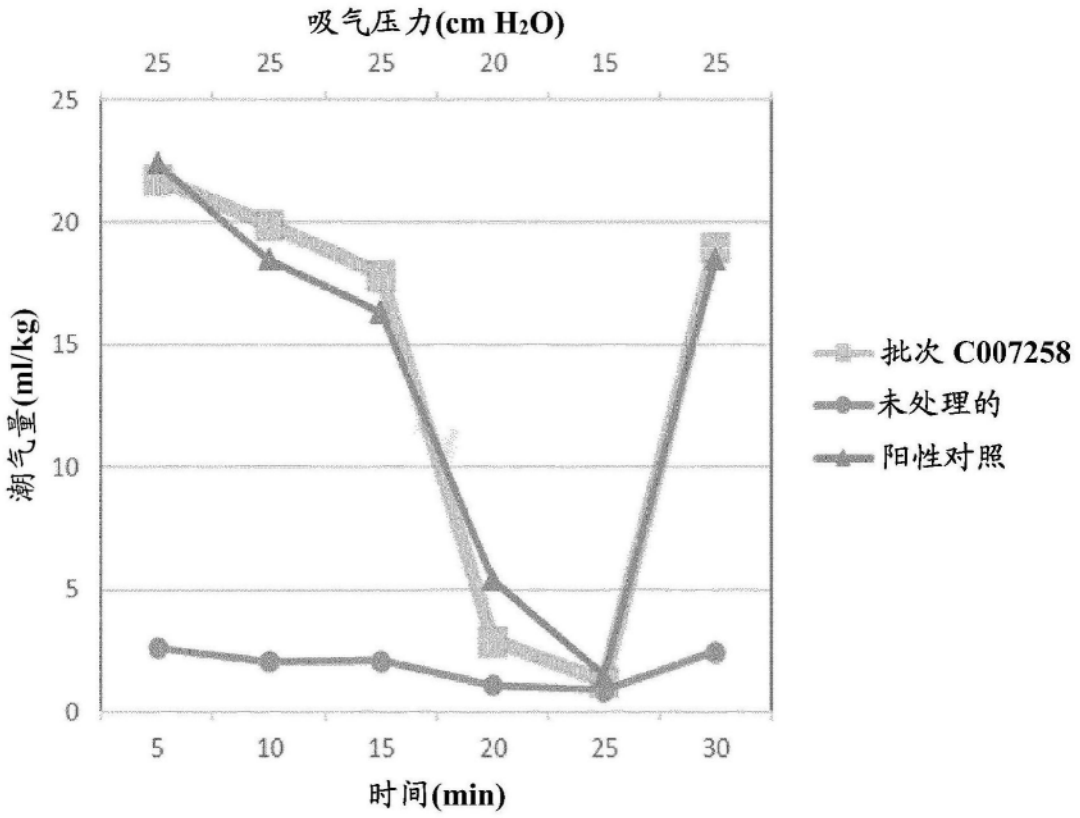
吸气压力(cm H2O)
25 25 25 20 15 25
25
20
15
10
5
0
潮气量(ml/kg)
5 10 15 20 25 30
时间(min)
批次 C007258
未处理的
阳性对照

图1