



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0813619-0 A2



(22) Data do Depósito: 17/07/2008

(43) Data da Publicação Nacional: 14/01/2020

(54) Título: PEPTÍDEOS SURFACTANTES PULMONARES SINTÉTICOS

(51) Int. Cl.: C07K 14/785; A61P 11/00; A61K 38/16.

(30) Prioridade Unionista: 09/08/2007 EP 07114083.4.

(71) Depositante(es): CHIESI FARMACEUTICI S.P.A.

(72) Inventor(es): MAURIZIO DELCANALE; TORE CURSTENDT; JAN JOHANSSON; BENGT ROBERTSON.

(86) Pedido PCT: PCT EP2008005842 de 17/07/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/018908 de 12/02/2009

(85) Data da Fase Nacional: 04/02/2010

(57) Resumo: PEPTÍDEOS SURFACTANTES PULMONARES SINTÉTICOS. A presente invenção é direcionada a análogos polipeptídicos da proteína surfactante nativa SP-B e seus usos na preparação de formulações para o tratamento ou profilaxia da síndrome do desconforto respiratório (SDR) e de outros distúrbios respiratórios

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

PEPTÍDEOS SURFACTANTES PULMONARES SINTÉTICOS

CAMPO TÉCNICO

A presente invenção é direcionada a análogos peptídicos da proteína surfactante nativa SP-B e seus usos na preparação de formulações para a profilaxia e/ou tratamento da síndrome do desconforto respiratório (SDR) e de outros distúrbios respiratórios.

5 HISTÓRICO DA INVENÇÃO

O pulmão humano é composto de uma grande quantidade de minúsculos sacos de ar, chamados alvéolos, nos quais os gases são trocados entre o sangue e os espaços de ar dos pulmões. Em indivíduos saudáveis, essa troca é mediada pela presença de uma proteína contendo um complexo surfactante que impede o colapso dos pulmões ao final da expiração.

O complexo surfactante pulmonar é composto principalmente de lipídio e contém pequenas quantidades de diversas proteínas. Uma ausência de níveis adequados desse complexo resulta em funcionamento incorreto do pulmão. Esta síndrome é chamada de Síndrome do Desconforto Respiratório (SDR) e afeta normalmente bebês prematuros.

15 Tal síndrome é tratada efetivamente com preparados de surfactante natural modificado, extraído de pulmões de animais.

Os principais componentes desses preparados de surfactante são fosfolípidios, como 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina conhecidos normalmente como dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilglicerol (PG) e proteínas hidrofóbicas surfactantes B e C (SP-B e SP-C) que são reconhecidas por terem a capacidade de afetar a atividade de natureza surfactante de tais preparados.

Devido às desvantagens dos preparados de surfactantes a partir de tecidos animais, como a complexidade da produção e dos processos de esterilização e possível indução de reações imunológicas, foram desenvolvidos surfactantes sintéticos que reproduzem a composição dos surfactantes naturais modificados.

Tais surfactantes sintéticos são conhecidos como surfactantes reconstituídos.

Entretanto, o desenvolvimento de surfactantes reconstituídos clinicamente ativos revelou-se complexo, pois o isolamento de quantidades significativas de proteínas SP-B e SP-C hidrofóbicas a partir de fontes naturais é caro e utiliza muita mão-de-obra.

30 Da mesma forma, a produção dessas proteínas por técnicas recombinantes de DNA requer esforço substancial em termos de projeto e de obtenção de sistemas ideais hospedeiro-vetor de expressão de DNA. Além disso, é necessário esforço considerável para desenvolver estratégias de isolamento efetivas para separar e purificar a proteína expressa de interesse do material indesejado.

Especificamente, a proteína SP-B é caracterizada por elevado peso molecular, extrema hidrofobicidade e uma grande quantidade de resíduos de cisteína que dificulta de forma significativa sua produção comercial a partir do isolamento de materiais naturais ou de sua expressão utilizando estratégias recombinantes de DNA.

5 Portanto, a comunidade médica tem uma necessidade de análogos sintéticos simples e fáceis de preparar da proteína SP-B capaz de reproduzir todas as propriedades da proteína nativa.

Mais especificamente, há uma necessidade de análogos sintéticos da proteína SP-B nativa que, quando misturados a análogos sintéticos da proteína nativa SP-C e com um
10 correador de lipídio, produzam preparados de surfactantes reconstituídos capazes de manter eficientemente a permeabilidade alveolar ao final da expiração.

RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção é direcionada a um polipeptídeo de sequência representada pela fórmula geral (I).

15
$$X\Delta LCRAUKR-SEQ-PQLVCRLVLR\Phi\Sigma_n \quad (I)$$

onde,

X é um resíduo de aminoácido selecionado independentemente do grupo consistindo de C, A, G, K, R, D e E;

Δ é um resíduo de aminoácido selecionado do grupo consistindo de W, L, nI e
20 I;

SEQ é uma sequência de aminoácidos selecionados do grupo consistindo de FNRYLT e YNGK;

Φ é um resíduo de aminoácido selecionado independentemente do grupo consistindo de C, A, G, K, R, D e E;

25 Σ é um resíduo de aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de S, G e A;

n é igual a 0 ou 1.

A invenção também inclui sais farmaceuticamente aceitáveis de tais polipeptídeos e seus derivados bloqueados N-terminal e/ou C-terminal, por exemplo: via acetilação e
30 amidação.

Em outra modalidade, a presente invenção trata de um surfactante pulmonar reconstituído composto de um correador de lipídio misturado a um polipeptídeo de fórmula geral (I) e as formulações farmacêuticas deste.

Concluindo, a invenção é direcionada para o uso dos polipeptídeos de fórmula
35 geral (I) para a preparação de um surfactante reconstituído para a profilaxia e/ou tratamento da síndrome do desconforto respiratório e de outros distúrbios respiratórios.

FIGURA

A Figura apresenta a sequência de aminoácidos da proteína SP-B humana.

DEFINIÇÕES

A função respiratória após tratamento *in vivo* com os preparados de surfactante exógeno é determinada pela mensuração de dois parâmetros: i) O volume tidal ou corrente, igual a quantidade de ar inspirada ou expirada, que é um indicador da complacência pulmonar, e

ii) o volume gasoso pulmonar que é um indicador da expansão aérea alveolar ou da permeabilidade alveolar ao final da expiração e, portanto, da capacidade de formar uma película fosfolípídica estável nos alvéolos ao final da expiração.

A proteína SP-B, que também tem sido definida como "SP18", é uma proteína dimérica com 17 KDa (kilodaltons) na qual a cadeia monomérica é um polipeptídeo com 79 resíduos e tem três ligações dissulfídicas intra-cadeia, ligando Cys8 a Cys77, Cys11 a Cys71 e Cys35 a Cys46. Em sua forma nativa, a sub-unidade SP-B humana existe como um homodímero de ligação dissulfídica tendo uma ligação dissulfídica intercadeia em Cys 48. A sequência da cadeia monomérica do SP-B humano está indicada na Figura.

O termo "surfactante reconstituído", conforme usado neste documento, significa um carreador de lipídio no qual foram adicionados análogos polipeptídicos das proteínas surfactantes, criados por meio de tecnologia recombinante ou por métodos sintéticos.

O termo "carreador de lipídio" significa uma mistura de fosfolípidios e, opcionalmente, componentes lipídicos adicionais, por exemplo: lipídios neutros como triacilgliceróis, ácidos graxos livres e/ou colesterol.

Os termos "polipeptídeo" e "peptídeo" são utilizados de forma intercambiável neste documento para designar uma série linear de não mais de 60 resíduos de aminoácidos conectados uns aos outros por pontes peptídicas entre os grupos alfa-amino e carboxi de resíduos adjacentes.

O termo "análogos polipeptídicos da proteína surfactante SP-B nativa", inclui peptídeos que tenham uma sequência de aminoácido nos quais, comparados às proteínas nativas, um ou mais aminoácidos estão faltando ou foram substituídos por outros aminoácidos, desde que os polipeptídeos, em uma mistura com um portador de lipídio, apresentem atividade surfactante pulmonar.

O termo "análogos polipeptídicos da proteína surfactante SP-C nativa", inclui polipeptídeos com uma sequência de aminoácidos nos quais, comparado com as proteínas nativas, um ou mais aminoácidos estão faltando ou foram substituídos por outros aminoácidos, desde que os polipeptídeos, em uma mistura com um portador de lipídio, apresentem atividade surfactante pulmonar.

Polipeptídeos que apresentam substituições conservadoras são aqueles nos quais o resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo biologicamente similar. Exemplos de substituições conservadoras incluem a substituição de um resíduo hidrofóbico como isoleucina, valina, leucina ou metionina por outro, ou a substituição de um resíduo polar por outro como entre arginina e lisina, ou entre ácido glutâmico e ácido aspártico (aspartato).

O termo "substituição conservadora" também inclui o uso de um aminoácido substituído no lugar de um aminoácido genitor não substituído, desde que o polipeptídeo resultante também apresente a atividade surfactante necessária.

Além disso, o termo "substituição conservadora" inclui substituições diferentes das anteriores, desde que o polipeptídeo resultante mantenha a estrutura secundária assim como a atividade surfactante necessária do polipeptídeo genitor.

As sequências de aminoácidos são apresentadas de acordo com um código de três letras com o aminoácido que transporta o grupo amino livre na extremidade esquerda (aminoterminal) e o aminoácido que transporta o grupo carboxila na extremidade direita (carboxiterminal).

Todos os resíduos aminoácidos identificados neste documento estão na configuração-L natural e as sequências identificadas neste documento são relatadas de acordo com abreviações padrões de resíduos aminoácidos, conforme apresentado na Tabela de Correspondência a seguir.

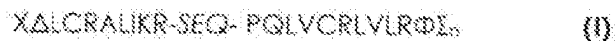
20 TABELA DE CORRESPONDÊNCIA

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

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

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção é direcionada a um polipeptídeo com a sequência representada pela fórmula geral (I).



3 onde:

X é um resíduo de aminoácido selecionado independentemente do grupo consistindo de C, A, G, K, R, D e E;

Δ é um resíduo de aminoácido selecionado do grupo consistindo de W, L, nL e E;

10 SEQ é uma sequência de aminoácidos selecionados do grupo consistindo de FNRYLT e YNGK;

Φ é um resíduo de aminoácido selecionado independentemente do grupo consistindo de C, A, G, K, R, D e E;

15 Σ é um resíduo de aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de S, G e A

n é igual a 0 ou 1.

Os polipeptídeos da invenção incluem a sequência N-terminal 8-17 e a sequência C-terminal 67-78 da proteína SP-B ligada por meio de uma sequência de aminoácido capaz de tomar-se em um composto selecionado do grupo consistindo de FNRYLT e YNGK.

20 Tais polipeptídeos também incluem modificações como aquelas englobadas pela fórmula geral (I) na qual alguns dos resíduos aminoácidos das sequências da proteína SP-B nativa foram substituídas e/ou estão faltando.

Por outro lado, elas podem incluir ainda resíduos aminoácidos adicionais na extremidade aminoterminal ou carboxiterminal. Tais modificações podem servir para 25 ampliar a expressão do polipeptídeo ou podem servir como uma sequência "ligadora", mas preferencialmente não reduzem ou interferem de qualquer outro modo com a atividade biológica de um polipeptídeo da presente invenção.

A invenção também inclui sais farmacologicamente aceitáveis de tais polipeptídeos e seus derivados bloqueados N-terminal e/ou C-terminal, por exemplo: via acetilação e amidação.

Sais farmacologicamente aceitáveis incluem, por exemplo, sais de ácido 5 hidrocloreto, ácido acético e de ácido trifluoroacético.

Em uma modalidade, os polipeptídeos de fórmula geral (I) podem estar na forma de molécula com ligação dissulfídica na qual a ligação dissulfídica intra-molecular ocorre entre o resíduo Cys na posição 4 e com aquele no C-terminal.

Um primeiro grupo de polipeptídeos preferenciais de fórmula geral (I) é aquele no 10 qual:

X e Φ são ambos C;
 Δ é conforme definido acima;
 SEQ é FNRYLT;
 n é igual a 0.

15 Tais polipeptídeos podem estar, de forma vantajosa, na forma de molécula com ligação dissulfídica, na qual a ligação dissulfídica intra-molecular ocorre entre os dois resíduos Cys na posição 1 e 27 e/ou entre os dois resíduos Cys na posição 4 e 21.

Um segundo grupo de polipeptídeos preferenciais de fórmula geral (I) é aquele no qual:

20 X e Φ são ambos C;
 Δ é conforme definido acima;
 SEQ é YNGK;
 n é igual a 0 ou 1.

Tais polipeptídeos podem estar, de forma vantajosa, na forma de molécula com 25 ligação dissulfídica, na qual a ligação dissulfídica intra-molecular ocorre entre os dois resíduos Cys na posição 1 e 25 e/ou entre os dois resíduos Cys na posição 4 e 19.

Um terceiro grupo de polipeptídeos preferenciais de fórmula geral (I) é aquele no qual:

30 X é igual a A ou G;
 Δ é conforme definido acima;
 SEQ é FNRYLT;
 n é igual a 0 ou 1,
 Φ é igual a A ou G

Tais polipeptídeos podem estar, de forma vantajosa, na forma de molécula cíclica, 35 na qual a ligação intra-molecular ocorre entre os resíduos Ala ou Gly nas posições 1 e 27.

Uma ligação dissulfídica também pode estar presente, de forma mais vantajosa, entre os resíduos Cys nas posições 4 e 21.

Um quarto grupo de compostos polipeptídios preferenciais de fórmula geral (I) é aquele no qual:

- 5 X é igual a A ou G;
 Δ é conforme definido acima;
 SEQ é YNGK;
 n é igual a 0 ou 1;
 Φ é igual a A ou G.

- 10 Tais polipeptídios podem estar, de forma vantajosa, na forma de molécula cíclica, na qual a ligação intra-molecular ocorre entre os resíduos Ala ou Gly nas posições 1 e 25. Uma ligação dissulfídica também está presente, de forma mais vantajosa, entre os dois resíduos Cys nas posições 4 e 19.

- 15 Um quinto grupo de polipeptídios preferenciais de fórmula geral (I) é aquele no qual:

- X é K ou R;
 Δ é conforme definido acima;
 SEQ é FNRYLT;
 n é igual a 0 ou 1;
 20 Φ é D ou E.

- Tais polipeptídios podem estar, de forma vantajosa, na forma de molécula cíclica, na qual a ligação ocorre entre o resíduo K ou R na posição 1 e o resíduo D ou E na posição 27. A junção pode ser na forma de ligação covalente de amido entre o grupo amino livre do resíduo K ou R e o grupo carboxílico livre do resíduo D ou E, por outro lado a ligação
 25 pode ser sob a forma de uma ponte de sal.

Uma ligação dissulfídica também está presente, de forma mais vantajosa, entre os dois resíduos Cys nas posições 4 e 21.

Um sexto grupo de compostos polipeptídios preferenciais de fórmula geral (I) é aquele no qual:

- 30 X é K ou R;
 Δ é conforme definido acima;
 SEQ é YNGK;
 n é igual a 0 ou 1;
 Φ é D ou E.

- 35 Tais polipeptídios podem estar, de forma vantajosa, na forma de molécula cíclica, na qual a ligação ocorre entre o resíduo K ou R na posição 1 e o resíduo D ou E na posição

25. A junção pode ser na forma de ligação covalente de amido entre o grupo amino livre do resíduo K ou R e o grupo carboxílico livre do resíduo D ou E, por outro lado a ligação pode ser sob a forma de ponte de sal.

Uma ligação dissulfídica também está presente, de forma mais vantajosa, entre os dois resíduos Cys nas posições 4 e 19.

Um sétimo grupo de polipeptídios preferenciais de fórmula geral (I) é aquele no qual:

X	é D ou E;
Δ	é conforme definido acima;
10 SEQ	é FNRYLT;
n	é igual a 0 ou 1;
Φ	é K ou R.

Tais polipeptídios podem estar, de forma vantajosa, na forma de molécula cíclica, na qual a ligação ocorre entre o resíduo D ou E na posição 1 e o resíduo K ou R na posição

15 27. A junção pode ser na forma de ligação covalente de amido entre o grupo amino livre do resíduo K ou R e o grupo carboxílico livre do resíduo D ou E, por outro lado a ligação pode ser sob a forma de uma ponte de sal.

Uma ligação dissulfídica também está presente, de forma mais vantajosa, entre os dois resíduos Cys nas posições 4 e 21.

20 Um oitavo grupo de compostos polipeptídios preferenciais de fórmula geral (II) é aquele no qual:

X	é D ou E;
Δ	é conforme definido acima;
SEQ	é YNGK;
25 n	é igual a 0 ou 1;
Φ	é K ou R.

Tais polipeptídios podem estar, de forma vantajosa, na forma de molécula cíclica, na qual a ligação ocorre entre o resíduo D ou E na posição 1 e o resíduo K ou R na posição

25. A junção pode ser na forma de ligação covalente de amido entre o grupo amino livre do resíduo K ou R e o grupo carboxílico livre do resíduo D ou E, por outro lado a ligação pode ser sob a forma de uma ponte de sal.

Uma ligação dissulfídica também está presente, de forma mais vantajosa, entre os dois resíduos Cys nas posições 4 e 19.

Os polipeptídios preferenciais englobados pela fórmula geral (I) estão relacionados abaixo

CLLCRALIKRFNRYLTPLVLCRLVLR

(Ia)

	CLLCRALIKRYNGKPQLVCRLVLRRC	(lb)
	CWLCRALIKRFNRYLTPQLVCRLVLRRC	(lc)
	CWLCRALIKRYNGKPQLVCRLVLRRC	(ld)
	ALLCRALIKRFNRYLTPQLVCRLVLRRAA	(le)
5	ALLCRALIKRYNGKPQLVCRLVLRRAA	(lf)
	GLLCRALIKRFNRYLTPQLVCRLVLRGG	(lg)
	GLLCRALIKRYNGKPQLVCRLVLRGG	(lh)

Os polipeptídeos (lc) e (ld) na forma de moléculas com ligações dissulfídicas nas quais as ligações dissulfídicas intra-moleculares estão entre os resíduos Cys, são indicados
10 neste documento como polipeptídeos ox-(lc) e ox-(ld).

Os polipeptídeos da invenção, quando misturados a um carreador de lipídio consistindo de fosfolipídios, formam um surfactante reconstituído capaz de reduzir a tensão superficial a valores próximos de zero.

Descobrimos também que, em um modelo de SDR no qual o recém-nascido imaturo
15 foi tratado sem aplicar uma pressão positiva expiratória final (PEEP), os polipeptídeos de fórmula geral (I), quando misturados a análogos sintéticos específicos da proteína SP-C e, com um carreador de lipídio adequado, melhoraram a função respiratória conforme indicado pelos volumes corrente (tidal) a um grau comparável com o alcançado depois da administração de um surfactante natural modificado.

20 Além disso, tal preparado surfactante reconstituído acabou por melhorar o volume gasoso pulmonar que é um indicador da permeabilidade alveolar ao final da expiração.

Os polipeptídeos de fórmula geral (I) podem ser sintetizados por quaisquer técnicas conhecidas de pessoas versadas na arte de polipeptídeos.

Muitas das técnicas disponíveis podem ser encontradas no livro de J.M. Steward e
25 J.D. Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", da W.H. Freeman Co., São Francisco, 1969, e J. Meienhofer, "Hormonal Proteins and Peptides" (Proteínas e peptídeos hormonais), Vol.2, página 46, Academic Press (New York), 1983, sobre síntese de peptídeo em fase sólida, e de E. Schröder e K. Kubke, "The Peptides" (Os peptídeos), vol. 1, Academic Press (New York), 1965 para síntese de solução clássica. Os polipeptídeos da invenção também podem ser
30 preparados utilizando-se a técnica sintética em fase sólida inicialmente descrita por Merrifield, no J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963). Outras técnicas de síntese de polipeptídeos podem ser encontradas, por exemplo, em M. Bodanszky e outros, Peptide Synthesis (Síntese de peptídeos), John Wiley & Sons, 2d Ed., (1976) assim como em outros trabalhos de referência conhecidos das pessoas versadas na técnica.

Grupos protetores apropriados para uso em tais sínteses são encontrados nos textos mencionados acima, assim como em J. F. W. McOmie, *Protective Groups in Organic Chemistry* (Grupos protetores em química orgânica), Plenum Press, New York, NY (1973).

Em geral, esses métodos consistem na adição sequencial de um ou mais resíduos de aminoácido ou resíduos de aminoácido adequadamente protegidos para uma cadeia peptídica crescente.

Usando uma síntese em fase sólida como ilustração, o aminoácido protegido ou derivado é conectado a um suporte sólido inerte por meio de seu grupo carboxila ou amina desprotegido. O grupo de proteção do grupo amina ou carboxila é removido seletivamente em seguida e o próximo aminoácido na sequência tendo o grupo complementar (amina ou carboxila) adequadamente protegido é misturado e reagido sob condições adequadas para formar a ligação amida com o resíduo já conectado ao suporte sólido. O grupo protetor do grupo amina ou carboxila é removido em seguida deste recém-adicionado resíduo de aminoácido, e o próximo aminoácido (adequadamente protegido) é adicionado em seguida, etc.

Depois que todos os aminoácidos desejados foram conectados na sequência correta, qualquer terminal remanescente e grupos protetores de grupo lateral (e o suporte sólido) são removidos sequencialmente ou paralelamente, para produzir o polipeptídeo final.

O polipeptídeo bruto é purificado, em geral, por técnica de HPLC e é isolado por liofilização.

O polipeptídeo pode ser obtido na forma de sal aceitável farmacologicamente. Opcionalmente o sal obtido pode ser convertido em outro tipo de sal utilizando-se uma coluna carregada com uma resina de troca iônica adequada, de acordo com um procedimento bem conhecido de uma pessoa capacitada da área.

Os polipeptídeos da invenção também podem ser preparados utilizando-se metodologias de ácido nucléico recombinante bem conhecidas na técnica.

Portanto, as sequências de DNA que codificam os polipeptídeos da invenção, os vetores de expressão recombinante capazes de os expressarem e os métodos utilizados estão incluídos na presente invenção.

Uma codificação de sequência de DNA para um polipeptídeo desta invenção pode ser sintetizada por técnicas químicas bem conhecidas de pessoas capacitadas na técnica. O segmento de DNA pode ser ligado em seguida a um vetor de expressão, e uma célula hospedeira transformada com este segmento pode ser utilizada para produzir o polipeptídeo.

Ao sintetizar quimicamente a sequência de codificação, quaisquer modificações desejadas podem ser feitas simplesmente substituindo as bases apropriadas por aquelas que codificam a sequência de resíduo de aminoácido nativo.

Os vetores de expressão recombinante capazes de expressar um polipeptídeo de interesse e os métodos de seu uso para produzir os polipeptídeos de fórmula geral (I) estão incluídos na presente invenção.

Estão incluídos também na presente invenção os equivalentes de ácido ribonucleico (RNA) dos segmentos de DNA acima descritos.

Uma característica importante e bem conhecida do código genético é sua redundância. Ou seja, para a maioria dos aminoácidos utilizados para produzir proteínas, mais de uma trinca de nucleotídeo (códon) de codificação pode codificar ou designar um resíduo de aminoácido específico. Portanto, uma quantidade de sequências de nucleotídeos diferentes pode codificar uma sequência de resíduo de aminoácido específico. Tais sequências de nucleotídeos são consideradas funcionalmente equivalentes, pois podem resultar na produção da mesma sequência de resíduo de aminoácido em todos os organismos.

Os polipeptídeos de fórmula geral (I) podem ser misturados com um carreador de lipídio farmacologicamente aceitável para formar um surfactante reconstituído.

As razões de peso entre o polipeptídeo e o carreador de lipídio está, de forma vantajosa, na faixa de aproximadamente de 1:5 a aproximadamente 1:5000, de preferência aproximadamente de 1:10 a aproximadamente 1:2000, e mais preferencialmente aproximadamente de 1:50 a aproximadamente 1:1000. Em uma modalidade mais preferencial, a razão de peso entre um polipeptídeo e um carreador de lipídio está na faixa de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:1000, de preferência aproximadamente de 1:7 a aproximadamente 1:500, e mais preferencialmente aproximadamente de 1:10 a aproximadamente 1:100.

O carreador de lipídio consiste, de forma vantajosa, nos fosfolípidos que estão contidos em preparados de surfactante pulmonar natural, por exemplo fosfatidilcolinas (PC) como dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) e palmitoiloleoil-fosfatidilcolina (POPC), e fosfatidilgliceróis (PG), como palmitoil-oleoil fosfatidilglicerol (POPG) e dipalmitoil-fosfatidilglicerol (DPPG).

Outros fosfolípidos que podem ser utilizados de forma vantajosa são os fosfatidilinosítois (PI), os fosfatidiletanolaminas (PE), as fosfatidilserinas e esfingomielinas (SM).

Em uma modalidade específica, o carreador de lipídio pode consistir em componentes adicionais, por exemplo lipídios neutros como triacilgliceróis, ácidos graxos livres e/ou colesterol.

O surfactante reconstituído pode consistir em um ou mais polipeptídeos de fórmula geral (I) ou pode consistir adicionalmente em um análogo peptídico sintético da proteína surfactante nativa SP-C como aqueles apresentados nos documentos WO 95/32992, WO 00/47623 e WO 03/097695.

5 Surfactantes reconstituídos consistindo de um polipeptídeo da invenção podem ser preparados misturando-se uma solução ou a suspensão de tal polipeptídeo, opcionalmente uma solução ou uma suspensão de outro peptídeo e do carreador de lipídio e, em seguida, secando a mistura subsequentemente.

Por outro lado podem ser preparados por liofilização ou pela técnica de secagem
10 por pulverização de acordo com métodos conhecidos na arte.

A administração de tal preparado surfactante reconstituído pode ser realizada de uma maneira conhecida a uma pessoa capacitada na ARTE, preferencialmente via instalação intra-traqueal (infusão ou bolo). Por outro lado, a administração pode ser realizada por aerosolização ou por nebulização.

15 A presente invenção também se refere a composições farmacêuticas incluindo o surfactante reconstituído composto dos polipeptídeos da invenção.

Tais composições são administradas de forma vantajosa na forma de uma solução, dispersão, suspensão ou de pó seco. Preferencialmente tais composições consistem no surfactante reconstituído dissolvido ou em suspensão em um solvente ou meio de
20 ressuspensão adequada.

De preferência tais composições farmacêuticas são fornecidas como suspensão dissolvida em uma solução aquosa salina fisiológica (soro fisiológico) em frascos de vidro de uso único. A concentração de forma vantajosa do surfactante reconstituído (expressa como concentração ou teor de fosfolípideo) está na faixa de cerca de 2 a 160 mg de
25 surfactante por ml, de preferência entre 10 a 100 mg/ml, mais preferencialmente entre 20 a 80 mg/ml.

Tais composições podem consistir adicionalmente de eletrólitos, como cálcio, magnésio e/ou sais de sódio (por exemplo cloreto de cálcio ou cloreto de sódio).

As composições na forma de suspensões aquosas também podem ser administradas
30 por nebulização.

Se for utilizada em administração via aerossol, o surfactante reconstituído é fornecido em uma forma finamente dividida, em conjunto com um propelente. Propelentes úteis são tipicamente gases em condições ambiente, condensados sob pressão, como hidrofluorocarbonos.

35 O aerossol é embalado em um recipiente equipado com uma válvula adequada, de modo que os ingredientes possam ser mantidos sob pressão até serem liberados.

Composições farmacêuticas obtidas com os polipeptídeos da invenção são adequadas para o tratamento ou profilaxia da síndrome do desconforto respiratório (SDR) em bebês nascidos prematuramente ou no tratamento ou profilaxia de outras doenças relacionadas à uma deficiência ou disfunção de surfactante incluindo SDR em adultos (SDRA), síndrome de aspiração de mecônio (SAM) e displasia broncopulmonar (DBP).

Elas também podem ser úteis no tratamento ou profilaxia de outros distúrbios respiratórios como pneumonia, bronquite, DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica), asma e fibrose cística, assim como para o tratamento de otite média serosa (otite com secreção inflamatória).

O exemplo a seguir ilustra a invenção com mais detalhes.

Exemplo 1 - Síntese e purificação do polipeptídeo ox-(Ic)

O polipeptídeo ox-(Ic) foi preparado por métodos padrão de SPPS (Síntese de peptídeo em fase sólida) baseado em química de Fmoc, de acordo com o Esquema 1 apresentado abaixo.

Esquema 1

Fmoc-Cys(Trt) Resina Wang

Clivagem de Fmoc: 20% de piperidina em DMF (dimetil formamida)

Acoplamento: Fmoc-AA-OH / TBTU / DIPEA = 3 / 2,7 / 4,5 em DMF (dimetil formamida)

Boc-Cys(Trt)-Trp(Boc)-Leu-Cys(Acm)-Arg(Pbf)-Ala-Leu-Ile-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Phe-Asn(Mtt-Arg(Pbf)-Tyr(tBu)-Leu-Thr(tBu)-Pro-Gln(Trt)-Leu-Val-Cys(Acm)-Arg(Pbf)-Leu-Val-Leu-Arg-(Pbf)-Cys(Trt)-Wang-Resin

TFA/EDT/TIPS / H₂O = 80 / 10 / 5 / 5

H-Cys-Trp-Leu-Cys(Acm)-Arg-Ala-Leu-Ile-Lys-Arg-Phe-Asn-Arg-Tyr-Leu-Thr-Pro-Gln-Leu-Val-Cys(Acm)-Arg-Leu-Val-Leu-Arg-Cys-OH (reduzido)

1. H₂O / dioxana = 1 / 1, pH 7,5, ar

2. Preparação HPLC, RP-C18, gradiente de ACN em 0,1 % TFA

3. Lyo

H-Cys-Trp-Leu-Cys(Acm)-Arg-Ala-Leu-Ile-Lys-Arg-Phe-Asn-Arg-Tyr-Leu-Thr-Pro-Gln-Leu-Val-Cys(Acm)-Arg-Leu-Val-Leu-Arg-Cys-OH

(Ligação dissulfídica entre Cys¹ e Cys²⁷)

1. H₂O / AcOH, L2 em MeOH

2. Preparação HPLC, RP-C18, gradiente de ACN em 0,1 % TFA

3. Lyo

H-Cys-Trp-Leu-Cys-Arg-Ala-Leu-Ile-Lys-Arg-Phe-Asn-Arg-Tyr-Leu-Thr-Pro-Gln-

Leu-Val-Cys-Arg-Leu-Val-Leu-Leu-Arg-Cys-OH sal de trifluoroacetato**(Ligação dissulfídica entre Cys¹ e Cys²⁷ / Cys⁴ e Cys²¹)**

Após a síntese em fase sólida, o peptídio bruto sem pontes dissulfídicas foi clivado a partir da resina por métodos padrão e, em seguida, pontes dissulfídicas foram formadas seletivamente por duas etapas de oxidação diferentes.

Para formar seletivamente as pontes dissulfídicas foi selecionado durante a síntese um padrão de proteção definido para os grupos laterais de quatro cisteínas. No processo mostrado no Esquema 1, Cys¹ e Cys²⁷ foram introduzidos como Fmoc-Cys(Trt)-OH durante a SPPS, ao passo que Cys⁴ e Cys²¹ foram acoplados como os derivados Acm correspondentes.

A primeira ponte dissulfídica foi formada por oxidação com ar e o peptídio com uma ponte foi purificado por sistemas HPLC e isolado por liofilização. A segunda ponte dissulfídica foi formada por oxidação com iodo, e o peptídio final foi purificado por sistema HPLC e isolado por liofilização.

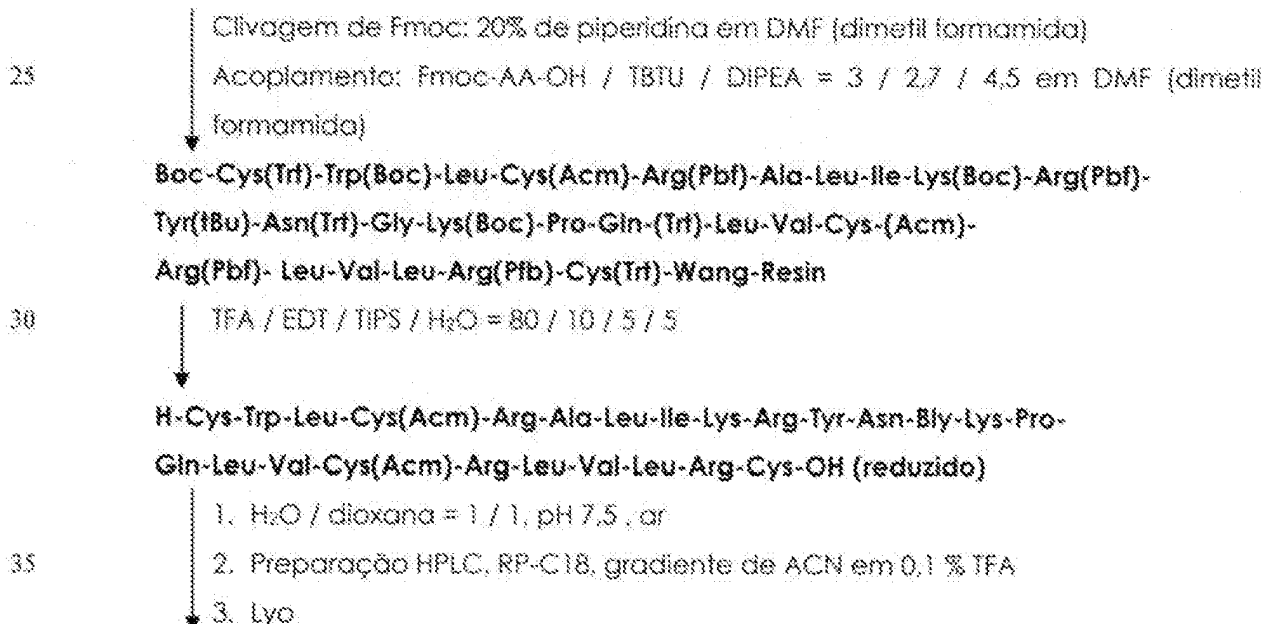
A pureza do polipeptídio final foi verificada por cromatografia líquida de fase reversa de alto desempenho, (HPLC), usando uma coluna C₁₈ e foi igual a 92%.

Sua massa molecular foi determinada pela técnica ESI-MS.

Rendimento: 1,73 g (2,4%).

Exemplo 2 - Síntese e purificação do polipeptídio ox-(Id)

O polipeptídio ox-(Id) foi preparado de uma maneira similar, de acordo com o Esquema 2 apresentado abaixo.

Esquema 2**Fmoc-Cys(Trt) Resina Wang**

H-Cys-Trp-Leu-Cys(Acm)-Arg-Ala-Leu-Ile-Lys-Arg-Tyr-Asn-Gly-Lys-Pro-Gln-Leu-Val-Cys(Acm)-Arg-Leu-Val-Leu-Arg-Cys-OH

(Ligação dissulfídica entre Cys¹ e Cys²⁶)

H₂O / AcOH, L₂ em MeOH

5

1. Preparação HPLC, RP-C18, gradiente de ACN em H₂O contendo NaClO₄

2. Preparação HPLC, RP-C18, gradiente de ACN em 0,1 % TFA

3. Lyo

H-Cys-Trp-Leu-Cys-Arg-Ala-Leu-Ile-Lys-Arg-Tyr-Asn-Gly-Lys-Pro-Gln-Leu-Val-Cys-Arg-Leu-Val-Leu-Arg-Cys-OH sal de trifluoroacetato

10

(Ligação dissulfídica entre Cys¹ e Cys²⁶ / Cys⁴ e Cys¹⁹)

A introdução das pontes dissulfídicas entre Cys¹ e Cys²⁶ e entre Cys⁴ e Cys¹⁹, a purificação e o isolamento foram realizados conforme relatado no Exemplo 1.

A pureza do polipeptídeo final foi verificada por cromatografia líquida de fase reversa de alto desempenho, (HPLC), usando uma coluna C₁₈ e foi igual a 86%.

15

Sua massa molecular foi determinada pela técnica ESI-MS.

Rendimento: 0,81 g (2,4%).

Legenda

AA-OH	Aminoácido
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
AcOH	Ácido acético
Acm	Acetamidometil
Boc	t-Butiloxycarbonil
N-BuOH	N-butanol
tBu	t-Butil
DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina
DMF	N,N-Dimetilformamida
EDT	1,2-Etanodíol
ESI-MS	Espectometria de massa por ESI (ionização por eletrospray)
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxycarbonil
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
Lyo	Liofilização
Mtt	Metiltrifil
PBF	2,2,4,6,7-Pentametil-2,3-dihidro-benzofurano-5-sulfonil

SPPS	Síntese de peptídeo em fase sólida
TBTU	Tetrafluoroborato de 2-(1H-Benzotriazol-1-il)- 1,1,3,3-tetrametilurônio
TFA	Ácido trifluoroacético
TIPS	Trisopropilsilil
Trt	Trt

REIVINDICAÇÕES

1. Um polipeptídio com a sequência representada pela fórmula geral (I)

$$X\Delta LCRALIKR-SEQ-PQLVCRLVLR\Phi\Sigma n \quad (I),$$
caracterizado por
 - 5 X ser um resíduo de aminoácido selecionado independentemente do grupo consistindo de C, A, G, K, R, D e E;
 - Δ ser um resíduo de aminoácido selecionado do grupo consistindo de W, L, nL e I;
 - SEQ ser uma sequência de aminoácidos selecionados do grupo consistindo de FNRYLT e YNGK;
- 10 Φ ser um resíduo de aminoácido selecionado independentemente do grupo consistindo de C, A, G, K, R, D e E;
- Σ ser um resíduo de aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo de S, G e A;
- n ser um número inteiro com valor igual a 0 ou 1.
2. O polipeptídio conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado por X e Φ
15 serem ambos C, a SEQ é FNRYLT, e n é igual a 0.
3. O polipeptídio conforme reivindicado na reivindicação 2, na forma de molécula com ligação dissulfídica, caracterizado pela ligação dissulfídica intra-molecular ocorrer entre os dois resíduos Cys nas posições 1 e 27 e/ou entre os dois resíduos Cys nas posições 4 e 21.
- 20 4. O polipeptídio conforme reivindicado na reivindicação 1 caracterizado por X e Φ serem ambos C, SEQ é YNGK, e n é igual a 0.
5. O polipeptídio conforme reivindicado na reivindicação 4 na forma de molécula com ligação dissulfídica, caracterizado pela ligação dissulfídica intra-molecular ocorrer entre os dois resíduos Cys nas posições 1 e 25 e/ou entre os dois resíduos Cys nas posições 4
25 e 19.
6. O polipeptídio conforme reivindicado na reivindicação 1 caracterizado por X e Φ serem ambos A ou G, e SEQ é FNRYLT.
7. O polipeptídio conforme reivindicado na reivindicação 1 caracterizado por X e Φ serem ambos A ou G, e SEQ é YNGK.
- 30 8. O polipeptídio conforme reivindicado na reivindicação 1 caracterizado por X ser K ou R, SEQ ser FNRYLT, e Φ ser D ou E.
9. O polipeptídio conforme reivindicado na reivindicação 1 caracterizado por X ser K ou R, a SEQ ser YNGK, e Φ ser D ou E.
10. O polipeptídio conforme reivindicado na reivindicação 1 caracterizado por X ser D
35 ou E, SEQ ser FNRYLT, e Φ ser K ou R.
11. O polipeptídio conforme reivindicado na reivindicação 1 caracterizado por X ser D

ou E, SEQ ser YNGK, e Φ ser K ou R.

12. O polipeptídio de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por ser selecionado do grupo consistindo de:

CLLCRALIKRFNRYLTPQLVCRLVLRC (Ia)

5 CLLCRAIKRYNGKPQLVCRLVLRC (Ib)

CWLCRALIKRFNRYLTPQLVCRLVLRC (Ic)

CWLCRALIKRYNGKPQLVCRLVLRC (Id)

ALLCRAIKRFNRYLTPQLVCRLVLRAA (Ie)

ALLCRAIKRYNGKPQLVCRLVLRAA (If)

10 GLLCRAIKRFNRYLTPQLVCRLVLRRG (Ig)

GLLCRAIKRYNGKPQLVCRLVLRRG (Ih)

13. O polipeptídio da reivindicação 12 caracterizado por ser o polipeptídio com a sequência (Ic) CWLCRALIKRFNRYLTPQLVCRLVLRC

14. O polipeptídio da reivindicação 13, na forma de molécula com ligação dissulfídica,

15 caracterizado pela ligação dissulfídica intra-molecular ocorrer entre os dois resíduos Cys nas posições 1 e 27 e/ou entre os dois resíduos Cys nas posições 4 e 21.

15. O polipeptídio da reivindicação 12 caracterizado por ser o polipeptídio com a sequência (Id) CWLCRALIKRYNGKPQLVCRLVLRC

16. O polipeptídio da reivindicação 13, na forma de molécula com ligação dissulfídica,

20 caracterizado pela ligação dissulfídica intra-molecular ocorrer entre os dois resíduos Cys nas posições 1 e 25 e/ou entre os dois resíduos Cys nas posições 4 e 19.

17. Um surfactante reconstituído caracterizado por consistir de um polipeptídio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16 em uma mistura com um carreador de lipídio.

25 18. Um surfactante reconstituído de acordo com a reivindicação 17 caracterizado por consistir ainda de um análogo peptídico sintético da proteína surfactante SP-C nativa.

19. Um surfactante reconstituído de acordo com a reivindicação 17 ou 18 no qual o carreador de lipídio consiste em uma mistura de fosfolípidios.

20. O uso de um polipeptídio das reivindicações 1 a 16 caracterizado por ser usado
30 para a produção de um medicamento para a profilaxia e/ou tratamento da síndrome do desconforto respiratório (SDR) em bebês nascidos prematuramente ou de outras doenças relacionadas a deficiência ou disfunção de surfactante.

21. O uso de acordo com a reivindicação 20 caracterizado por ser usado para doença relacionada a uma deficiência ou disfunção de surfactante inclui SDR em adultos (SDRA),
35 síndrome de aspiração de mecônio (SAM) e displasia broncopulmonar (DBP).

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

FIGURA 1

RESUMO

PEPTÍDEOS SURFACTANTES PULMONARES SINTÉTICOS.

A presente invenção é direcionada a análogos polipeptídicos da proteína surfactante nativa SP-B e seus usos na preparação de formulações para o tratamento ou profilaxia da síndrome do desconforto respiratório (SDR) e de outros distúrbios respiratórios.