



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103169947 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 29

(21) 申请号 201310053516. 8

(22) 申请日 2007. 09. 28

(30) 优先权数据

06021521. 7 2006. 10. 13 EP

(62) 分案原申请数据

200780038276. 7 2007. 09. 28

(73) 专利权人 奇斯药制品公司

地址 意大利帕尔马

(72) 发明人 J·约翰松 T·库斯泰德特

B·罗伯特松

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李程达

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006. 01)

A61K 47/24 (2006. 01)

A61K 9/08 (2006. 01)

A61K 9/10 (2006. 01)

A61K 9/14 (2006. 01)

A61P 11/00 (2006. 01)

A61K 31/685 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1340060 A, 2002. 03. 13, 全文.

CN 1653088 A, 2005. 08. 10, 全文.

Seehase M et al.. New Surfactant with SP-B and C Analogs Gives Survival Benefit after Inactivation in Preterm Lambs. 《PLOS ONE》. 2012, 第 7 卷 (第 10 期), 1-10.

审查员 吕小蒙

权利要求书1页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

具有改进性质的重组表面活性剂

(57) 摘要

本发明涉及一种含有脂质载体、天然表面活性蛋白 SP-C 的多肽类似物和天然表面活性蛋白 SP-B 的多肽类似物的重组表面活性剂。本发明还涉及重组表面活性剂的药物组合物及其用于治疗或预防 RDS 和其他呼吸疾病的用途。

1. 一种含有脂质载体和天然表面活性蛋白 SP-C 的多肽类似物与天然表面活性蛋白 SP-B 的多肽类似物的组合的重组表面活性剂，
其中所述天然表面活性蛋白 SP-C 的多肽类似物是
IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLILLLILGALLLGL (If)；并且
其中所述天然表面活性蛋白 SP-B 的多肽类似物是
CWLCRALIKRIQALIPKGGRLLPQLVCRLVLRCS (IIc)。
2. 根据权利要求 1 的重组表面活性剂，其中天然表面活性蛋白 SP-C 的类似物与天然表面活性蛋白 SP-B 的类似物以固定的组合存在。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项的重组表面活性剂组合物，其中多肽 (IIc) 是二硫键连接的分子，分子内的二硫键是在位置 4 和位置 27 的两个半胱氨酸残基之间。
4. 根据权利要求 1-2 任一项的重组表面活性剂，其中脂质载体由二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) 和棕榈酰油酰磷脂以 95:5 到 50:50 的重量比构成，其中所述棕榈酰油酰磷脂选自棕榈酰油酰磷脂酰甘油 (POPG) 或棕榈酰油酰磷脂酰甘油 (POPG) 与棕榈酰油酰磷脂酰胆碱 (POPC) 组成的混合物。
5. 根据权利要求 4 的重组表面活性剂，其中脂质载体由 DPPC 和 POPG 以 68:31 的重量比构成。
6. 含有权利要求 1-4 任一项的重组表面活性剂的药物组合物。
7. 根据权利要求 6 的药物组合物，其以溶液、分散液、混悬液或干粉的形式存在。
8. 根据权利要求 7 的药物组合物，其以含水混悬液的形式存在。
9. 根据权利要求 8 的药物组合物，其含有浓度为 2-160mg/ml 的重组表面活性剂。
10. 根据权利要求 9 的药物组合物，其中重组表面活性剂的浓度为 20-80mg/ml。
11. 权利要求 1-5 任一项的重组表面活性剂在制备用于治疗或预防早产儿的呼吸窘迫综合征 (RDS) 或治疗或预防成人呼吸窘迫综合征 (ARDS)、胎便吸入综合征 (MAS) 或支气管肺发育不良 (BPD) 的药物中的用途。

具有改进性质的重组表面活性剂

[0001] 本申请是申请号为 200780038276.7、申请日为 2005 年 7 月 1 日、发明名称为“具有改进性质的重组表面活性剂”的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 本发明涉及一种含有脂质载体和天然表面活性蛋白 SP-C 的特定多肽类似物与天然表面活性蛋白 SP-B 的特定多肽类似物的组合的重组表面活性剂。

[0003] 本发明还涉及重组表面活性剂的药物组合物及其用于治疗或预防 RDS 和其他呼吸疾病的用途。

[0004] 发明背景

[0005] 人的肺由被称为肺泡的大量小气囊组成,在其中,气体在血液和肺的气室之间交换。在健康人体中,这种交换以含有蛋白质的表面活性物质复合物为媒介,这能防止肺在呼气末期萎陷。

[0006] 肺表面活性物质复合物主要由脂质组成,含少量各种蛋白质。缺少足够水平的这种复合物会导致肺功能失常。这种症状被称为呼吸窘迫综合征,它经常侵袭早产儿。

[0007] 上述综合征可以使用经结构修饰的提取自动物肺的天然表面活性剂的制剂进行有效治疗。

[0008] 市售的修饰的天然表面活性剂的制剂有,例如,固尔苏,来自猪肺,Infasurf,提取自小牛肺灌洗液和 Survanta,牛肺天然提取物的化学修饰物。

[0009] 这些表面活性剂制剂的主要成分是磷脂,例如 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱,一般称为二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC),磷脂酰甘油酯(PG)和表面活性的疏水蛋白 B 和 C (SP-B 和 SP-C)。

[0010] 由于来自动物组织的表面活性剂制剂的缺点,例如生产和消毒过程的复杂性以及对免疫反应的可能的诱导效应,模拟修饰的天然表面活性剂组成的合成表面活性剂已被开发出来。所述合成表面活性剂被称为重组表面活性剂。

[0011] 然而开发临床有效的重组表面活性剂已经被证实非常复杂,因为天然的疏水蛋白太大而不容易合成,结构复杂并且以高纯度存在时不稳定。

[0012] 为了代替所述天然的疏水蛋白,一些部分符合它们序列的合成多肽及其类似物在现有技术中已经被提出和公开,如 W089/06657, W092/22315, W098/49191, W095/32992, US6,660,833, EP413,957 和 W091/18015。

[0013] W000/47623 公开了作为天然蛋白 SP-C 类似物的合成多肽,其中:i)5 位和 6 位的半胱氨酸残基被丝氨酸残基代替;ii)SP-C“中心区域”的缬氨酸残基被选自含有亮氨酸、异亮氨酸和正亮氨酸(nL)的组的其他天然疏水残基取代;iii)一些 SP-C“中心区域”的中性氨基酸被选自含有赖氨酸、色氨酸(Try)、苯丙氨酸、酪氨酸和鸟氨酸的组的大的或极性的残基代替。

[0014] 所述的人工多肽特征是能够像天然蛋白 SP-C 那样折叠,并且,因此能够与表面活性剂的脂质发生适当的相互作用并不会引起自寡聚。

[0015] W000/76535 一般的涉及了含有至少一个修饰的 SP-B 与至少一个修饰的 SP-C 蛋白的肺表面活性剂制剂。

[0016] 在 WaringAJ 等人(摘要出现于 2006 年 4 月 29 日-5 月 2 日于旧金山举行的儿科学会年会)的文献中,进行了一项检验由 SP-C- 模拟的 SP-Cff 和 SP-B 模拟的 Mini-B 组成的合成表面活性剂活性的研究,SP-C- 模拟的 SP-Cff 是一种合成的 34 个残基的 SP-C,其中 4 位和 5 位的半胱氨酸被苯丙氨酸代替

[0017] 然而,根据可获取的文献,在动物研究中,使用重组表面活性剂处理导致了不良肺气体容积和呼气末期肺泡开放程度,并且为了得到与修饰的天然表面活性剂取得的活性相当的体内活性,需要通过一个呼气末期正压(PEEP)来完成换气(JohanssonJ 等人 J Appl Physiol2003, 95, 2055-2063;Davis AJ 等人 Am J Respir Crit Care Med1998;157, 553-559)。现有的重组表面活性剂制剂实际上不能在呼气末期的肺泡中形成稳定的磷脂膜。

[0018] 所有上述的文献都没有提到呼气末期肺泡开放的问题及其公开的制剂的效果。

[0019] 因此,在肺顺应性方面对于具有改进性能的重组表面活性剂始终还有未能满足的需求。

[0020] 特别的,对于能够确保肺泡稳定性,并且因此保持呼气末期肺泡开放性而不需要通过 PEEP 换气的重组表面活性剂制剂有需求。

[0021] 已经发现,也是本发明的目的所在的是,天然 SP-C 蛋白的特定类似物,优选是 W000/47623 的多肽,与天然蛋白 SP-B 的特定类似物可以有利地组合起来,以得到在肺顺应性方面具有改进性能的重组表面活性剂制剂,特别是其有效维持呼气末期肺泡开放性而不需要通过 PEEP 换气的的能力。

[0022] 特别的,已经发现,在 RDS 模型中,其中对未发育完全的新生儿使用外源性表面活性剂制剂治疗并且不使用 PEEP,上述 SP-C 和 SP-B 的特定类似物的组合对肺气体容积起作用,而肺气体容量是呼气末期肺泡开放程度的指标。

[0023] 发明概述

[0024] 本发明涉及一种含有脂质载体和天然表面活性蛋白 SP-C 的特定多肽类似物与天然表面活性蛋白 SP-B 的特定多肽类似物的组合的重组表面活性剂。

[0025] 特别的,本发明涉及一种重组表面活性剂,其含有:

[0026] a) 一种脂质载体;

[0027] b) 一种具有至少 20 个氨基酸残基并且不多于 40 个氨基酸残基的多肽,其具有通式 (I) 表示的序列

[0028] $F_e G_e I_f P_f S_g S P V H L K R X_a B X_b (B X_c)_n G A L L_n \Omega_p G_p L_p$ (I)

[0029] 其中:

[0030] X 是一个独立选自自由异亮氨酸、亮氨酸和正亮氨酸组成的组的氨基酸残基;

[0031] B 是一个独立选自自由赖氨酸、精氨酸、组氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和鸟氨酸组成的组的氨基酸残基;

[0032] S 任意被酰基取代,所述酰基含有 12-22 个碳原子,优选 16 个碳原子,并且通过酯键连接于侧链;

[0033] Ω 是一个选自含有蛋氨酸、硫原子被氧化的蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和正亮氨酸的组的氨基酸;

[0034] a 是一个数值为 1-8 的整数;

- [0035] b 是一个数值为 1-19 的整数；
- [0036] c 是一个独立选自 3-8 的整数；
- [0037] e, f, g 和 p 是数值为 0 或 1 的整数；
- [0038] n 是一个数值为 0-3 的整数；
- [0039] 和
- [0040] $X_a B X_b (B X_c)_n$ 是含有最多 22 个氨基酸的序列；
- [0041] c) 一种具有通式 (I) 序列的多肽
- [0042] $C_f \Delta LCRALIKRIQA \Omega IPKGGR \Omega LPQLVCRLVL \Phi CSf (II)$
- [0043] 其中：
- [0044] Δ 是一个独立选自含有色氨酸和亮氨酸的组的氨基酸残基；
- [0045] Ω 是一个独立选自含有蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和正亮氨酸的组的氨基酸残基；
- [0046] Φ 是一个独立选自含有精氨酸和苏氨酸, 优选精氨酸的组的氨基酸残基, ；和
- [0047] f 是一个数值为 0 或 1 的整数。
- [0048] 本发明也包括所述多肽的药学可接受的盐和它们的例如通过乙酰化和酰胺化的 N 端和 / 或 C 端封闭的衍生物。
- [0049] 本发明还涉及药物组合物及其用于预防和 / 或治疗呼吸窘迫综合征 (RDS) 和其他呼吸疾病的用途。
- [0050] 本发明进一步涉及通式 (II) 的多肽用于制备能在呼气末期改善肺泡开放性的重组表面活性剂的用途。
- [0051] 最后, 本发明提供了一种预防和 / 或治疗呼吸窘迫综合征 (RDS) 和其他呼吸疾病的方法, 所述方法包括给予需要这种治疗的患者治疗有效量的重组表面活性剂, 所述重组表面活性剂含有脂质载体、通式 (I) 多肽和通式 (II) 多肽。
- [0052] 附图
- [0053] 图 1 显示了人 SP-C 蛋白的序列。在天然 SP-C 中半胱氨酸残基被棕榈酰化。
- [0054] 图 2 显示了人 SP-B 蛋白的序列。
- [0055] 图 3 显示了肺气体容量 (ml/kg) 的结果。
- [0056] 图 4 显示了潮气量 (ml/kg) 作为时间 / 压力的函数的结果。
- [0057] 定义
- [0058] 使用外源性表面活性制剂体内进行治疗后的呼吸功能通过测量以下两个参数实现：
- [0059] i) 潮气量, 是肺顺应性的指标和
- [0060] ii) 肺气体容量, 是呼气末期肺泡空气扩张或开放程度的指标, 并且因此是呼气末期在肺泡中形成稳定磷脂膜的能力的指标。
- [0061] 在本发明中, 词语“重组表面活性剂”指一种脂质载体, 其中加入了通过重组技术或合成方法制备的表面活性蛋白的多肽类似物。
- [0062] 词语“脂质载体”指磷脂和任选的其他脂质组分, 例如中性脂质如三酰基甘油、游离脂肪酸和 / 或胆固醇的混合物。
- [0063] 词语“天然表面活性蛋白 SP-C 的多肽类似物”包括含有如下氨基酸序列的多肽,

其中与天然蛋白相比,一个或多个氨基酸丢失或被其他氨基酸取代,只要多肽和脂质载体的混合物显示肺表面活性剂活性。

[0064] 词语“天然表面活性蛋白 SP-B 的多肽类似物”包括含有如下氨基酸序列的肽,其中与天然蛋白相比,一个或多个氨基酸丢失,只要多肽和脂质载体的混合物显示肺表面活性剂活性。

[0065] 词语“mini-B”指基于天然 SP-B 蛋白的 N-末端的残基 8-25 和 C-末端的残基 63-78 的、具有 34 个残基的多肽,它的结构在 California NanoSystems Institute 网站上的一个介绍中被第一次一般性的公开。然后它的全序列完全公开于 RCSB 蛋白数据库。

[0066] 在 Waring AJ 等人 J Peptide Res2005, 66, 364-374 的文献中报道了更多有关它的结构和活性的信息。

[0067] 词语“变型”指 mini-B 肽的多肽类似物,它的氨基酸序列中有一个或多个氨基酸被其他氨基酸取代,只要肽和脂质载体的混合物保持 mini-B 的活性。

[0068] 氨基酸序列依照氨基酸三个字母的代码表示,其中游离氨基在左侧末端(氨基末端)并且游离羧基在右侧末端(羧基末端)。

[0069] 词语“协同”指在给定的测定下,两个多肽的效果大于可以预期的它们分别单独作用的效果之合。

[0070] 本申请认定的所有的氨基酸残基都具有天然的 L-构型,并且本申请认定的序列根据下列对照表所示的氨基酸残基的标准缩写来表示。

[0071] 对照表

	<u>氨基酸</u>		<u>符号</u>	
		<u>一个字母</u>		<u>三个字母</u>
	甘氨酸	G		Gly
	L-脯氨酸	P		Pro
	L-异亮氨酸	I		Ile
	L-亮氨酸	L		Leu
	L-酪氨酸	Y		Tyr
[0072]	L-半胱氨酸	C		Cys
	L-色氨酸	W		Trp
	L-丙氨酸	A		Ala
	L-赖氨酸	K		Lys
	L-精氨酸	R		Arg
	L-谷氨酰胺	Q		Glu
	L-蛋氨酸	M		Met

[0073]	L-丝氨酸	S	Ser
	L-缬氨酸	V	Val
	L-天冬酰胺	N	Asn
	L-天冬氨酸	D	Asp
	L-谷氨酸	E	Gln
	L-组氨酸	H	His
	L-苏氨酸	T	Thr
	L-苯丙氨酸	F	Phe
	L-正亮氨酸	-	nLeu
	L-鸟氨酸	-	Orn

[0074] 发明详述

[0075] 本发明涉及一种含有脂质载体和天然表面活性蛋白 SP-C 的特定多肽类似物与包括 Mini-B 肽及其变型在内的天然表面活性蛋白 SP-B 的特定多肽类似物的组合的重组表面活性剂。

[0076] 我们已经肯定的发现,在 RDS 模型中,其中使用外源性表面活性剂制剂治疗未发育完全的新生儿并且不使用 PEEP,通式 (I) 的多肽和通式 (II) 的多肽的组合对肺顺应性确实起到作用。

[0077] 特别的,两种多肽的组合对肺气体容量起到协同作用,而肺气体容量是呼气末期肺泡开放程度的指标。

[0078] 上述结果证明本发明的重组表面活性剂能够以比只含有一种 SP-C 蛋白类似物或一种 SP-B 蛋白类似物的重组表面活性剂更好的方式稳定呼气末期肺泡中的磷脂膜。

[0079] 此外,请求保护的重组表面活性剂制剂被证明将呼吸功能改善至与施用修饰的天然表面活性剂后取得的程度相当或甚至稍好的程度,以潮气量表示所述呼吸功能。

[0080] 有利的是,SP-C 天然蛋白类似物是一种具有至少 20 个氨基酸残基并且不多于 40 个的多肽,其具有通式 (I) 表示的序列

[0081] $F_e G_e I_f P_f S_g SPVHLKRX_a BX_b (BX_c)_n GALL \Omega_p G_p L_p$ (I)

[0082] 其中:

[0083] X 是一个独立选自含有异亮氨酸、亮氨酸和正亮氨酸的组的氨基酸残基;

[0084] B 是一个独立选自含有赖氨酸、精氨酸、组氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和鸟氨酸的组的氨基酸残基;

[0085] S 任意被酰基取代,所述酰基含有 12-22 个碳原子,优选 16 个碳原子,并且通过酯键连接于侧链;

[0086] Ω 是一个选自含有蛋氨酸、硫原子被氧化的蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和正亮氨酸的组的氨基酸残基;

[0087] a 是一个数值为 1-8 的整数;

[0088] b 是一个数值为 1-19 的整数;

- [0089] c 是一个独立选自 3-8 的整数；
- [0090] e, f, g 和 p 是数值为 0 或 1 的整数；
- [0091] n 是一个数值为 0-3 的整数；
- [0092] 和
- [0093] $X_aBX_b(BX_c)_n$ 是含有最多 22 个氨基酸的序列, 优选含有 10-22 个氨基酸。
- [0094] 优选的, 通式 (I) 的多肽由至少 30 并且不多于 35 个氨基酸, 更加优选不超过 33 个氨基酸组成。
- [0095] 在特定的实施例中, 通式 (I) 的多肽由 30 或 33 或 35 个氨基酸组成。
- [0096] 优选的, SP-C 蛋白的多肽类似物被通式 (Ia) 所表示, 其中 e 和 n 是 0, 并且 g 是 1
- [0097] $I_fP_fSSPVHLKRX_aBX_bGALL\Omega_pG_pL_p$ (Ia)
- [0098] 其中：
- [0099] X、B 和 Ω 具有如下定义：
- [0100] a 为 1-8, 优选 1-3；更优选 1；
- [0101] b 为 1-19, 优选 5-15；更优选 14；
- [0102] f 和 p 是 0 或 1。
- [0103] 更优选的, SP-C 蛋白的多肽类似物被通式 (Ib) 所表示, 其中 f 是 1
- [0104] $IPSSPVHLKRX_aBX_bGALL\Omega_pG_pL_p$ (Ib)
- [0105] 其中：
- [0106] X、B、 Ω 、a 和 b 具有如下定义：
- [0107] p 是 0 或 1。
- [0108] 甚至更加优选的, SP-C 蛋白的多肽类似物被通式 (Ic) 所表示
- [0109] $IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLILLLILGALL\Omega_pG_pL_p$ (Ic)
- [0110] 其中：
- [0111] Ω 具有如下定义：
- [0112] p 是 0 或 1。
- [0113] 通式 (Ic) 的多肽的例子如下所示：
- [0114] $IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLILLLILGALLMGL$ (Id) (SEQ ID:1)
- [0115] $IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLILLLILGALLIGL$ (Ie) (SEQ ID:2)
- [0116] $IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLILLLILGALLLGL$ (If) (SEQ ID:3)
- [0117] $IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLILLLILGALLnLGL$ (Ig) (SEQ ID:4)
- [0118] $IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLILLLILGALL$ (Ih) (SEQ ID:5)
- [0119] 多肽 (Id) 在现有技术中也被称为 SP-C33。
- [0120] 最优选的, SP-C 类似物是选自由具有式 (Ie)、(If)、(Ig) 和 (Ih) 的多肽组成的组的多肽。
- [0121] 在本发明的一个优选实施例中, 通式 (I) 的多肽是下文被称为 SP-C33 (Leu)³¹ 的多肽 (If)。
- [0122] 有利的是, SP-B 天然蛋白的类似物由对应于天然 SP-B 蛋白的 N-末端的残基 8-25 和 C-末端的残基 63-78 (称为 Mini-B 肽) 或它的一个变型的两部分组成。
- [0123] 更有利的是, SP-B 天然蛋白的类似物是一种由下列通式 (II) 表示的多肽：

- [0124] $C_f \Delta LCRALIKRIQA \Omega IPKGGR \Omega LPQLVCRLVL \Phi CS_f$ (II)
- [0125] 其中：
- [0126] Δ 是一个独立选自含有色氨酸和亮氨酸的组的氨基酸残基；
- [0127] Ω 是一个独立选自含有蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和正亮氨酸的组的氨基酸残基；
- [0128] Φ 是一个独立选自含有精氨酸和苏氨酸优选精氨酸的组的氨基酸残基；和
- [0129] f 是一个数值为 0 或 1 的整数。
- [0130] 在本发明的一个特定的实施例中，SP-B 类似物是一种具有通式 (IIa) 的多肽：
- [0131] CWLCRALIKRIQAMIPKGGRMLPQLVCRLVLRCS (IIa) (SEQID:6)
- [0132] 在本发明的其他实施例中，SP-B 类似物选自具有下列通式的多肽：
- [0133] CLLCRALIKRIQAMIPKGGRMLPQLVCRLVLRCS (IIb) (SEQ ID:7)
- [0134] CWLCRALIKRIQALIPKGGRLLPQLVCRLVLRCS (IIc) (SEQ ID:8)
- [0135] CLLCRALIKRIQALIPKGGRLLPQLVCRLVLRCS (IId) (SEQ ID:9)
- [0136] 在一个优选的实施例中，多肽 (IIa)、(IIb)、(IIc) 和 (IId) 可以是二硫键连接的分子的形式，其中分子内的二硫键是在位置 1 和位置 33 的两个半胱氨酸之间和 / 或在位置 4 和位置 27 的两个半胱氨酸之间。
- [0137] 二硫键连接的多肽 (IIa) 在现有技术中被称为氧化 Mini-B (oxMini-B)。
- [0138] 多肽 (IIc) 在下文中被称为 Mini-B(LIeu)，并且它的二硫键的连接形式被称为 ox Mini-B(Leu)。
- [0139] 通式 (I) 和 (II) 多肽可以通过本领域技术人员已知的合成方法或重组技术来制备。
- [0140] 固相肽合成的很多已知技术的很好的综述可见于 J.M.Steward 和 J.D.Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", W.H.Freeman Co., San Francisco, 1969 和 J.Meienhofer, Hormonal Proteins and Peptides", Vo 1.2, p.46, Academic Press(New York), 1983, 经典溶液合成的很多已知技术的很好的综述可见 E.Schroder 和 K.Kubke, "The Peptides", Vol.1, Academic Press(New York), 1965。本发明的多肽可使用 Merrifield 在 J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154(1963) 中最早描述的固相合成技术来制备。其他的多肽合成技术可以在例如 M.Bodanszky 等人, Peptide Synthesis, John Wiley&Sons, 2d Ed., (1976) 中以及其他本领域技术人员熟知的参考文献中找到。
- [0141] 用于这些合成的合适的保护基团可以在上述的文献和 J.F.W.McOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, New York, NY(1973) 中找到。
- [0142] 例如，通式 (I) 多肽可以根据 W000/47623 公开的方法制备，通式 (II) 多肽可以根据 Waring AJ 等人在 J Peptide Res2005, 66, 364-374 中报道的方法制备。
- [0143] 本发明也包括通式 (I) 和 (II) 多肽的药学可接受的盐和它们的例如通过乙酰化和酰胺化的 N 端和 / 或 C 端封闭的衍生物。
- [0144] 药学可接受的盐包括例如盐酸、醋酸和三氟乙酸的盐。
- [0145] 本发明的重组表面活性剂可以通过混合通式 (I) 和 (II) 多肽的溶液或混悬液和脂质，然后干燥混合物，或通过冷冻干燥或喷雾干燥来制备。
- [0146] 优选的，通式 (I) 多肽和通式 (II) 多肽以固定的量和定量比例作为固定的组合出

现在在本发明的重组表面活性剂中。

[0147] 通式 (I) 和 (II) 多肽相对于重组表面活性剂的比例可以变化。有利的是,每种多肽占表面活性剂重量的 0.5-10% (w/w), 优选为 1-5%, 最优选为 1-3%。

[0148] 在一个优选的实施例中, 重组表面活性剂含有 1-3% 重量比的多肽 (If), 1-3% 重量比的多肽 (IIa), 优选被氧化的形式。

[0149] 在另一个优选的实施例中, 重组表面活性剂含有 1-3% 重量比的多肽 (If), 1-3% 重量比的多肽 (IIc), 优选被氧化的形式。

[0150] 有利的, 脂质载体包括天然肺表面活性制剂含有的磷脂, 如磷脂酰胆碱 (PC), 例如二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) 和棕榈酰油酰磷脂酰胆碱 (POPC), 以及磷脂酰甘油 (PG), 例如棕榈酰油酰磷脂酰甘油 (POPG) 和二棕榈酰磷脂酰甘油 (DPPG)。

[0151] 其他可以被有利的应用的磷脂是磷脂酰肌醇 (PI)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰丝氨酸和鞘磷脂 (SM)。

[0152] 在一个特别的实施例中, 脂质载体可以包括其它成分, 如中性脂质例如三酰甘油、游离脂肪酸和 / 或胆固醇。

[0153] 有利的, 根据本发明的重组表面活性剂含有 90-99% 重量比的脂质载体, 优选 92-98%, 更优选 94-96%, 并且两种肽重量之和占 1-10% 重量比, 优选选 2-8%, 更优选 4-6%。

[0154] 发明的一个实施例中, 重组表面活性剂含有 96% 重量比的脂质载体, 2% 重量比的通式 (I) 多肽和 2% 重量比的通式 (II) 多肽。

[0155] 在一个特别的实施例中, 脂质载体只由磷脂构成, 更优选由 DPPC 和选自 POPG 或与其与 POPC 组成的混合物的棕榈酰油酰磷脂以 95:5 到 50:50 的重量比构成, 优选 80:20 到 60:40。

[0156] DPPC 和 POPG 的重量比优选 75:25 到 65:35, 更优选是 68:31。在 DPPC :POPG :POPC 混合物中, 优选使用的磷脂重量比是 60:20:20 或 68:15:16。

[0157] 在另一个实施例中, 脂质载体由 DPPC、DPPG 和胆固醇构成。

[0158] 在本发明的一个优选实施例中, 重组表面活性剂含有 1-5% 重量比的通式 (Ia) 多肽的一种, 1-5% 重量比的通式 (II) 多肽的一种和 DPPC 与 POPG 以 68:31 的重量比组成的混合物。

[0159] 本发明的重组表面活性剂以本领域技术人员已知的方式给药, 优选气管内滴入 (installation) (浸剂或大丸剂) 或喷雾法。

[0160] 本发明也涉及了含有本发明的重组表面活性剂的药物组合物。所述组合物有利地通过溶液、分散液、混悬液或干粉的形式给药。重组表面活性剂的所述组合物优选含有溶解或混悬于合适的溶剂或再悬浮介质中。

[0161] 所述药物组合物优选以在一次性使用的玻璃小瓶中的在缓冲生理盐水溶液中的悬浮液形式供给使用。有利的是, 重组表面活性剂的浓度 (以磷脂含量表示) 在每 ml 约 2- 约 160mg 活性剂的范围, 优选在 10-100mg/ml, 更优选 20-80mg/ml。

[0162] 所述组合物可以进一步含有电解质, 例如钙、镁和 / 或钠盐, 优选氯化钙。

[0163] 本发明的药物组合物适合于预防和 / 或治疗早产儿的呼吸窘迫综合征 (RDS) 或其他与表面活性物质缺乏或机能障碍有关的疾病, 其包括成人呼吸窘迫综合征 (ARDS)、胎便吸入综合征 (MAS) 和支气管肺发育不良 (BPD)。

[0164] 它们也可用于预防和 / 或治疗其他呼吸疾病例如肺炎、支气管炎、COPD (慢性阻塞性肺疾患)、哮喘和囊性纤维化病以及用于治疗浆液性中耳炎(胶耳)。

[0165] 下列实施例详细地说明本发明。

实施例

[0166] 实施例 1- 多肽 SP-C33 (Leu)³¹ 和 SP-C33 的合成与纯化

[0167] 多肽 SP-C33 (Leu)³¹ 通过基于 Fmoc 化学和连续 TFA 裂解的标准 SPPS (固相肽合成) 方法制备。

[0168] 共得到 186.0g 的 SP-C33 (Leu)³¹ 粗品。

[0169] 使物质经历逆流分配法 (CCD) 纯化多肽, 以 H₂O/n-BuOH/AcOEt/AcOH4:1:4:1 为双相溶剂系统。

[0170] 这次纯化得到 78.9g 纯度 > 60% 的 SP-C33 (Leu)³¹。

[0171] 最终的纯化使用制备性 HPLC 实现, 以在 50mm×300mm 钢柱中的 PLRP-S 为固定相, 在 75 分钟内使用 25% B 到 100% B 的线性梯度。流动相由缓冲液 A = 含有 0.1%TFA 的 ACN/H₂O1:4 和缓冲液 B = 含有 0.1%TFA 的 IPA 组成。

[0172] 纯化的多肽溶解于 90% AcOH 中, 经过装填 Dowex 离子交换树脂(醋酸盐形式) 的柱子, 经过冷冻干燥, 得到 5.8g (= 5.4%) 醋酸盐形式的最终产品。

[0173] 多肽 SP-C33 以类似的方式制备。

[0174] 符号表

[0175]

ACN	乙腈
AcO	乙酸乙酯
Et	
AcO	乙酸
H	
Boc	叔丁氧羰基
n-B	正丁醇
uOH	
Fmo	9-芴甲氧羰基
c	
IPA	异丙醇
TFA	三氟乙酸

[0176] 实施例 2- 多肽 ox Mini-B (Leu) 和 ox Mini-B 的合成与纯化

[0177] 多肽 ox Mini-B (Leu) 通过基于 Fmoc 化学和连续 TFA 裂解的标准 SPPS (固相肽合成) 方法制备。

- [0178] 多肽粗品通过使用 TFA 系统的制备性 HPLC 纯化,通过冷冻干燥分离。
- [0179] 通过纯化肽的空气氧化得到在 Cys¹ 和 Cys³³ 之间形成二硫键的单环序列。单环肽通过使用 TFA 系统的制备性 HPLC 纯化,通过冷冻干燥分离。
- [0180] Cys⁴ 和 Cys²⁷ 之间的第二个二硫键通过使用碘来形成。
- [0181] 氧化以后,产品通过使用 TFA 系统的制备性 HPLC 纯化,通过冷冻干燥分离。分离得到 1.12g (= 1.7%) 纯度 > 89% 的最终化合物。
- [0182] 多肽 ox Mini-B 以类似的方式制备。
- [0183] 实施例 3- 基于 ox Mini-B 和 SP-C33 的重组表面活性剂的体内实验
- [0184] 表面活性剂制剂的实验以早产的新生家兔进行,其通过在妊娠期第 27 天的子宫切除术得到。实验不使用呼气末期正压(PEEP)。
- [0185] 作为 SP-C 的类似物,使用根据实施例 1 制备的、被称为 SP-C33 的多肽。
- [0186] 作为 SP-B 蛋白的类似物,使用根据实施例 2 制备的氧化 Mini-B (ox Mini-B)。
- [0187] 动物在出生后就以包含脂质载体,DPPC:POPG 的重量比为 68:31w/w 的磷脂混合物的重组表面活性剂处理。磷脂与 2 或 4% 重量比的 SPC-33,2% 重量比的 ox Mini-B 或 2% 重量比的 SPC-33 加上 2% 重量比的 ox Mini-B 混合。
- [0188] 动物接受相同剂量的 **Curosurf**[®] 作为阳性对照,以未接受处理的同窝仔作为阴性对照。
- [0189] 所有的表面活性剂制剂都以 80mg/ml 的浓度和 2.5ml/kg 的标准剂量给药。
- [0190] 未发育成熟的新生家兔使用标准化序列的峰值吹入压力进行平行通气。为了打开肺,初始压力被设定为 35cm 水柱,持续 1min,经过该募集操作后,压力降至 25cm 水柱,持续 15min,并且进一步为 20 和 15cm 水柱。最后,压力再次升至 25cm 水柱,持续 5min,之后肺再以氮气额外通气 5min,然后进行气体容量的测量。
- [0191] 以 ml/kg 表示的肺气体容量和潮气量都被测量,结果以中位数的形式分别记录在图 3 和图 4 中。
- [0192] 通过图 3 可以看出,使用含 2% 重量比的 ox Mini-B 的重组表面活性剂治疗的动物与接受 2% 重量比的 SP-C33 的动物相比(约 2ml/kg vs 约 4ml/kg),具有更低的肺气体容量。
- [0193] 将 2% 重量比的 ox Mini-B 加入 SP-C33 产生了比任何肽单用(约 8ml/kg vs 约 6ml/kg)都明显大得多的肺气体容量的增加。
- [0194] 如图 4 所示,发现了潮气量相似的趋势,给予肽的组合以后,观察到了与给予 **Curosurf**[®] 取得的效果相当或甚至稍好的改善。
- [0195] 还发现,SP-C33 含量从重量比 2% 到 4% 的增加没有增加肺气体容量,这说明呼气末期肺泡中磷脂膜的稳定效果与 ox Mini-B 的加入有关。
- [0196] 上述结果证明本发明的重组表面活性剂能够以比只含有一个 SP-C 蛋白类似物或一个 SP-B 蛋白类似物的重组表面活性剂更好的方式稳定呼气末期肺泡中的磷脂膜。
- [0197] 此外,请求保护的重组表面活性剂制剂被证明将潮气量表示的呼吸功能改善至与使用修饰的天然表面活性剂取得的效果相当或甚至稍好的程度。

NH ₂	Phe	Gly	Ile	Pro	Cys	Cys	Pro	Val	His	Leu	Lys
1					5					10	
		Arg	Leu	Leu	Iso	Val	Val	Val	Val	Val	Val
					15					20	
		Leu	Ile	Val	Val	Val	Ile	Val	Gly	Ala	Leu
					25					30	
		Leu	Met	Gly	Leu	COOH					

图 1

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

图 2

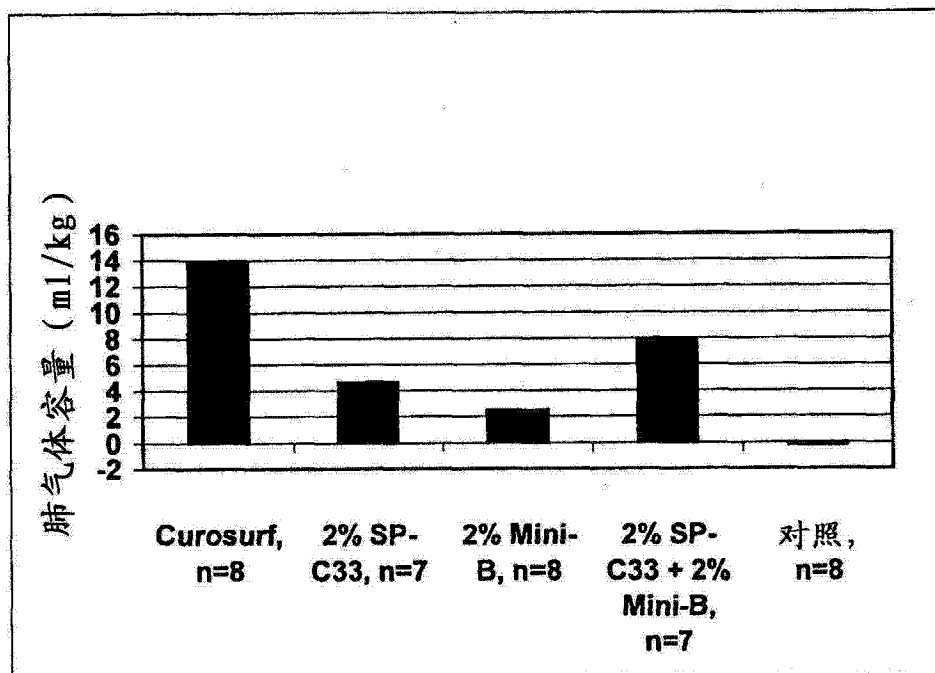


图 3

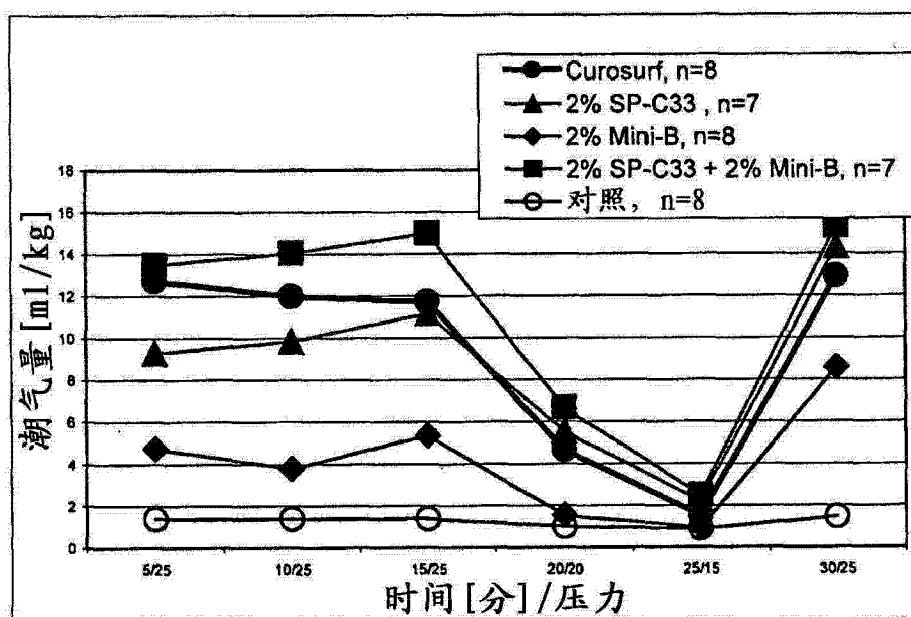


图 4