

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 727**

51 Int. Cl.:

C07K 14/785 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2007** **E 07825212 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013** **EP 2078038**

54 Título: **Surfactantes reconstituidos con propiedades mejoradas**

30 Prioridad:

13.10.2006 EP 06021521

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.01.2014

73 Titular/es:

CHIESI FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
VIA PALERMO, 26/A
43100 PARMA, IT

72 Inventor/es:

JOHANSSON, JAN;
CURSTEDT, TORE y
ROBERTSON, BENGT

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 438 727 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Surfactantes reconstituidos con propiedades mejoradas

- 5 La presente invención se dirige a un surfactante reconstituido que comprende un portador lipídico, y una combinación de un análogo polipéptido particular de la proteína surfactante nativa SP-C con un análogo polipéptido particular de la proteína surfactante nativa SP-B.
- 10 La invención se dirige además a las composiciones farmacéuticas de los mismos y su uso para el tratamiento o profilaxis de RDS y otros trastornos respiratorios.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 El pulmón humano está compuesto de un gran número de pequeños sacos de aire, llamados alvéolos, en los que se intercambian los gases entre la sangre y los espacios de aire de los pulmones. En individuos sanos, este intercambio está mediado por la presencia de un complejo surfactante que contiene proteína que protege a los pulmones del colapso al final de la espiración.
- 20 El complejo surfactante pulmonar está compuesto principalmente de lípidos y contiene cantidades menores de varias proteínas. La ausencia de niveles adecuados de este complejo resulta en la disfunción del pulmón. Este síndrome se denomina Síndrome de Diestrés Respiratorio (RDS) y afecta comúnmente a los recién nacidos prematuros.
- 25 Dicho síndrome se trata eficazmente con preparaciones de surfactantes naturales modificados extraídos de pulmones de animales.
- Las preparaciones de surfactante modificado disponibles en el comercio son, por ejemplo, Curosurf, derivado de pulmón de cerdo, Infasurf, extraído del lavado de pulmón de ternero y Survanta, un extracto natural de pulmón bovino químicamente modificado.
- 30 Los principales constituyentes de estas preparaciones surfactantes son los fosfolípidos, tales como 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina comúnmente conocido como dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilglicerol (PG) y proteínas hidrófobas surfactantes B y C (SP-B y SP-C).
- 35 Debido a los inconvenientes de las preparaciones de surfactantes a partir de tejidos animales, tales como la complicación de la producción y procesos de esterilización y la posible inducción de reacciones inmunes, se han desarrollado los surfactantes sintéticos que mimetizan la composición de los surfactantes naturales modificados. Dichos surfactantes sintéticos se conocen como surfactantes reconstituidos.
- 40 Sin embargo, el desarrollo de surfactantes reconstituidos clínicamente activos ha resultado ser complicado ya que las proteínas hidrófobas nativas son demasiadas grandes para sintetizarse, son estructuralmente complejas e inestables en forma pura.
- 45 Para reemplazar dichas proteínas hidrófobas nativas, algunos polipéptidos sintéticos que corresponden parcialmente a sus secuencias y análogos de estos se han propuesto en la técnica anterior y se describen por ejemplo en WO 89/06657, WO 92/22315, WO 98/49191, WO 95/32992, US 6,660,833, EP 413,957 y WO 91/18015.
- 50 WO 00/47623 describe polipéptidos sintéticos que son análogos de la proteína nativa SP-C en donde: i) los residuos de cisteína en la posición 5 y 6 se reemplazan por los residuos de Ser; ii) los residuos de Val de la 'región central' de SP-C se sustituyen con otros residuos hidrófobos y neutros del grupo que consiste de Leu, Ile y norleucina (nL); iii) algunos de los aminoácidos neutros presentes en la 'región central' de SP-C se reemplazan con residuos voluminosos o polares seleccionados del grupo que consiste de Lys, Try, Phe, Tyr, y ornitina.
- 55 Dichos polipéptidos artificiales se caracterizan además porque son capaces de plegarse igual a la proteína nativa SP-C y, por tanto, interactuar apropiadamente con los lípidos del surfactante y sin causar auto-oligomerización.
- WO 00/76535 se refiere genéricamente a las preparaciones de surfactantes pulmonares que comprenden al menos una modificación de SP-B en conjunto con al menos una modificación de la proteína SP-C.
- 60 En Waring AJ y otros, (resumen presentado en el encuentro anual de la Sociedad Académica de Pediatría realizado en San Francisco el 29 de abril al 2 de Mayo de 2006) se llevó a cabo un estudio para examinar la actividad de un agente

tensioactivo sintético constituido de SP-C-mímico SP-Cff, que es un SP-C sintético de 34 residuos con fenilalanina en lugar de cisteína en las posiciones 4 y 5, y el SP-B-mímico Mini-B.

Sin embargo, de acuerdo con la literatura disponible, en estudios con animales, el tratamiento con surfactantes reconstituidos causa pobres volúmenes de gas pulmonar y grado de permeabilidad alveolar al final de la espiración, y se necesita una ventilación con una presión espiratoria final positiva (PEEP) para lograr una actividad in vivo comparable a la lograda con los surfactantes naturales modificados (Johansson J y otros J Appl Physiol 2003, 95, 2055-2063; Davis AJ y otros Am J Respir Crit Care Med 1998; 157, 553-559). Claramente, las preparaciones disponibles de surfactantes reconstituidos no son capaces de formar una película fosfolipídica estable en los alvéolos al final de la espiración.

Todos los documentos mencionados anteriormente guardan silencio sobre el problema de la permeabilidad alveolar al final de la espiración y el efecto de las preparaciones descritas de los mismos.

Por lo tanto existe todavía una necesidad insatisfecha de un surfactante reconstituido con propiedades mejoradas en términos de conformidad pulmonar.

En particular, existe una necesidad de una preparación de surfactante reconstituido que sea capaz de garantizar la estabilidad alveolar, y mantener por lo tanto la permeabilidad alveolar al final de de la espiración sin necesitar ventilación con PEEP.

Ahora se encontró, y es el objeto de la presente invención, que análogos particulares de la proteína nativa SP-C, y preferentemente los polipéptidos de WO 00/47623, se puede combinar ventajosamente con análogos particulares de la proteína nativa SP-B para proporcionar una preparación de surfactante reconstituido con propiedades mejoradas en términos de conformidad pulmonar, y en particular la capacidad para mantener eficazmente la permeabilidad alveolar al final de la espiración sin necesitar ventilación con PEEP.

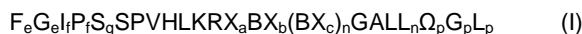
En particular, se encontró que, en un modelo de RDS en donde los recién nacidos inmaduros se trataron con preparaciones de surfactantes exógenos sin aplicar PEEP, una combinación de dichos análogos particulares de las proteínas SP-C y SP-B actúa sobre los volúmenes de gas pulmonar que es un índice de la permeabilidad alveolar al final de la espiración.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se dirige a un surfactante reconstituido que comprende un portador lipídico, y una combinación de un análogo polipéptido particular de la proteína surfactante nativa SP-C con un análogo polipéptido particular de la proteína surfactante nativa SP-B.

Particularmente la invención se dirige a un surfactante reconstituido que comprende:

- a) un portador lipídico;
- b) un polipéptido de al menos 20 residuos de aminoácido y no más de 40 residuos de aminoácido con la secuencia representada por la fórmula general (I)



en donde

- X es un residuo de aminoácido independientemente seleccionado del grupo que consiste de I, L, y nL;
- B es un residuo de aminoácido independientemente seleccionado del grupo que consiste de K, R, H, W, F, Y, y Orn;
- S es opcionalmente sustituido con grupos acilo que contienen 12-22 átomos de carbono, preferentemente 16 átomos de carbono, unidos a la cadena lateral a través de un enlace éster;
- Ω es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de M o M oxidado en el átomo de azufre, I, L, y nL;
- a es un entero que tiene un valor comprendido de 1 a 8;
- b es un entero que tiene un valor comprendido de 1 a 19;
- c es un entero que tiene un valor independientemente seleccionado de 3 a 8;
- e, f, g y p son enteros que tienen un valor de 0 o 1;
- n es un entero que tiene un valor comprendido de 0 a 3; y

con la condición de que la $X_a BX_b (BX_c)_n$ es una secuencia que tiene un máximo de 22 aminoácidos.

c) un polipéptido representado por la Fórmula general (II):



en donde

A es un residuo de aminoácido independientemente seleccionado del grupo que consiste de W y L;

Ω es un residuo de aminoácido independientemente seleccionado del grupo que consiste de M, I, L y nL;

Φ es un residuo de aminoácido independientemente seleccionado del grupo que consiste de R y T, preferentemente R; y

f es un entero que tiene un valor de 0 o 1.

La invención incluye además las sales farmacéuticamente aceptables de dichos polipéptidos y sus derivados N- y/o C-terminal bloqueados, por ejemplo a través de la acetilación y amidación.

La invención se dirige además a las composiciones farmacéuticas de estos y a su uso para la profilaxis y/o tratamiento del síndrome de diestrés respiratorio (RDS) y otros trastornos respiratorios.

La invención se dirige además al uso de los polipéptidos de la fórmula general (II) para la preparación de un surfactante reconstituido para mejorar la permeabilidad alveolar al final de la espiración.

Finalmente, la invención proporciona un método para la profilaxis y/o tratamiento del síndrome de diestrés respiratorio (RDS) y otros trastornos respiratorios, dicho método comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un surfactante reconstituido que comprende un portador lipídico, un polipéptido de la fórmula general (I), y un polipéptido de la fórmula general (II).

FIGURAS

Figura 1 muestra la secuencia de la proteína SP-C humana. Los residuos Cys están palmitoilados en la SP-C nativa.

Figura 2 muestra la secuencia de la proteína SP-B humana.

Figura 3 muestra los resultados en términos de volúmenes de gas pulmonar (ml/kg).

Figura 4 muestra los resultados en términos de volúmenes tidales (ml/kg) en función de tiempo/presión.

DEFINICIONES

La función respiratoria después del tratamiento *in vivo* con las preparaciones surfactantes exógenas se lleva a cabo midiendo dos parámetros:

i) el volumen tidal que es un índice de la conformidad pulmonar y

ii) el volumen de gas pulmonar que es un índice de la expansión de aire o permeabilidad alveolar al final de la espiración, y por lo tanto de la capacidad de formar una película fosfolipídica estable en los alvéolos al final de la espiración.

En la presente solicitud, el término "surfactante reconstituido" significa un portador lipídico al que, se añaden los análogos polipéptidos de las proteínas surfactantes, fabricadas a través de tecnología recombinante o métodos sintéticos.

El término "portador lipídico" significa una mezcla de fosfolípidos y componentes lipídicos opcionalmente adicionales, por ejemplo lípidos neutrales tales como triacilgliceroles, ácidos grasos libres y/o colesterol.

El término "análogos polipéptidos de la proteína surfactante nativa SP-C", incluye polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos en la que, comparada con las proteínas nativas, uno o más aminoácidos están ausentes o se han reemplazado por otros aminoácidos, mientras que los polipéptidos, en una mezcla con un portador lipídico, muestran actividad de surfactante pulmonar.

El término "análogos polipéptidos de la proteína surfactante nativa SP-B", incluye polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos en la que, comparada con las proteínas nativas, uno o más aminoácidos están ausentes o se han reemplazado por otros aminoácidos, mientras que los polipéptidos, en una mezcla con un portador lipídico, muestran actividad de surfactante pulmonar.

El término "mini-B" se refiere a un polipéptido de 34 residuos basado en los residuos N-terminal 8-25 y residuos C-terminal 63-78 de la proteína nativa SP-B cuya estructura se describió genéricamente en una presentación tomada del sitio web del Instituto de Nanosistemas de California. Su secuencia completa se describió posteriormente en el banco de datos de proteína RCSB.

En Waring AJ y otros J Peptide Res 2005, 66, 364-374, se reportó más información sobre su estructura y actividad.

El término "variantes" se refiere a polipéptidos análogos del péptido Mini-B que tiene una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos se han reemplazado por otros aminoácidos, mientras que los péptidos, en una mezcla con un portador lipídico, retienen la actividad de Mini-B.

Las secuencias de aminoácidos se muestran de acuerdo con el código de tres letras con el aminoácido que porta el grupo amino libre en el extremo izquierdo (amino terminal) y el aminoácido que porta el grupo carboxilo libre en el extremo derecho (carboxi terminal).

El término "sinérgico" significa que la eficacia de los dos polipéptidos está por encima de la que puede esperarse sumando su respectiva eficacia individual en un ensayo dado.

Todos los residuos de aminoácidos identificados en la presente se encuentran en la configuración-L natural y las secuencias identificadas en la presente se reportan de acuerdo con las abreviaturas estándares para los residuos de aminoácidos como se muestra en la Tabla de Correspondencia a continuación.

TABLA DE CORRESPONDENCIA

AMINOÁCIDO	SÍMBOLO	
	Una-letra	Tres-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-triptófano	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-glutámico	E	Gln
L-histidina	H	His
L-treonina	T	Thr
L-fenilalanina	F	Phe
L-nor-leucina	-	nLeu

AMINOÁCIDO	SÍMBOLO	
	Una-letra	Tres-letras
L-ornitina	-	Orn

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 La presente invención está dirigida a un surfactante reconstituido que comprende un portador lipídico y una combinación de análogos polipéptidos particulares de la proteína surfactante nativa SP-C con análogos polipéptidos particulares de la proteína surfactante nativa SP-B, incluyendo el péptido Mini-B y variantes de estos.

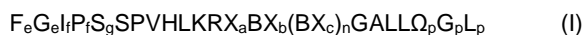
10 Claramente, encontramos que, en un modelo de RDS en donde el recién nacido inmaduro se trató con preparaciones de surfactante exógeno sin aplicar PEEP, una combinación de un polipéptido de fórmula general (I), con un polipéptido de fórmula general (II) actúa positivamente en la conformidad pulmonar.

En particular, se encontró que la combinación de los dos polipéptidos actúa de una manera sinérgica en los volúmenes de gas pulmonar que es un índice de la permeabilidad alveolar al final de la espiración.

15 Dicho resultado demuestra que el surfactante reconstituido de la invención es capaz de estabilizar la película de fosfolípidos en los alvéolos al final de la espiración de una mejor manera que el reconstituido que comprende sólo un análogo de la proteína SP-C o un análogo de la proteína SP-B.

20 Además, la preparación de surfactante reconstituido reivindicada resultó mejorar la función respiratoria según lo expresado por los volúmenes tidales en una medida comparable o incluso ligeramente superior a la alcanzada después de la administración de un surfactante natural modificado.

25 De manera favorable, el análogo de la proteína nativa SP-C es un polipéptido de al menos 20 residuos de aminoácido y no más de 40 residuos de aminoácido, con la secuencia representada por la fórmula general (I)



30 en donde

- X es un residuo de aminoácido independientemente seleccionado del grupo que consiste de I, L, y nL;
 B es un residuo de aminoácido independientemente seleccionado del grupo que consiste de K, R, H, W, F, Y, y Orn;
 S es opcionalmente sustituido con grupos acilo que contienen 12-22 átomos de carbono, preferentemente 16 átomos de carbono, unidos a la cadena lateral a través de un enlace éster;
 35 Ω es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de M o es oxidado en el átomo de azufre, I, L, y nL;
 a es un entero que tiene un valor comprendido de 1 a 8;
 b es un entero que tiene un valor comprendido de 1 a 19;
 C es un entero que tiene un valor independientemente seleccionado de 3 a 8;
 e, f, g y p son enteros que tienen un valor de 0 o 1;
 40 n es un entero que tiene un valor comprendido de 0 a 3; y

con la condición de que la $X_a B X_b (B X_c)_n$ es una secuencia que tiene un máximo de 22 aminoácidos, preferentemente comprendida entre 10 y 22 aminoácidos.

45 Preferentemente, el polipéptido de la fórmula general (I) consiste de al menos 30 y no más de 35 aminoácidos, con mayor preferencia no más de 33 aminoácidos.

En modalidades particulares los polipéptidos de la fórmula general (I) consiste de 30 o 33 o 35 aminoácidos.

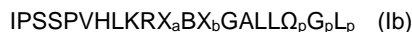
50 Preferentemente, el análogo de polipéptido de la proteína SP-C se representa por la fórmula general (Ia) en la cual e y n son 0, y g es 1



55 en donde

X, B y Ω son como se definió anteriormente;
 a es de 1 a 8, preferentemente de 1 a 3; con mayor preferencia 1;
 b es de 1 a 19, preferentemente de 5 a 15; con mayor preferencia 14;
 f y p son 0 o 1.

Con mayor preferencia, el análogo de polipéptido de la proteína SP-C se representa por la fórmula general (Ib) en la cual f es 1



en donde

X, B, Ω , a y b son como se definió anteriormente;
 p es 0 o 1.

Aún con mayor preferencia, el análogo de polipéptido de la proteína SP-C se representa por la fórmula general (Ic)



en donde

Ω es como se define anteriormente
 p es 0 o 1

Los ejemplos de polipéptidos de la fórmula (Ic) se reportan más abajo:

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLMGL (Id) (sec. con núm. de ident.:1)
 IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLIGL (Ie) (sec. con núm. de ident.:2)
 IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLLGL (If) (sec. con núm. de ident.:3)
 IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALL n LGL (Ig) (sec. con núm. de ident.:4)
 IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALL (Ih) (sec. con núm. de ident.:5)

El polipéptido (Id) se refirió además en la técnica anterior como SP-C33.

Con la máxima preferencia, el análogo de SP-C es un polipéptido seleccionado del grupo de polipéptidos con las fórmulas (Ie), (If), (Ig) y (Ih).

En una modalidad preferida de la invención, el polipéptido de la fórmula general (I) es el polipéptido (If) de aquí en adelante referido como SP-C33(Leu)³¹.

De manera favorable, el análogo de la proteína nativa SP-B consiste de dos porciones correspondientes a los residuos N-terminal 8-25 y a la parte C-terminal 63-78 de la proteína nativa SP-B (denominado como péptido Mini-B) o una variante de este.

De manera más favorable, el análogo de la proteína nativa SP-B es un polipéptido representado por la siguiente fórmula general (II):



en donde

A es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de W y L;
 Ω es un residuo de aminoácido independientemente seleccionado del grupo que consiste de M, I, L, y nL;
 Φ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de R y T, preferentemente R; y
 f es un entero que tiene un valor de 0 o 1.

En una modalidad particular de la invención, el análogo de SP-B es un polipéptido representado por la fórmula (IIa)



En otras modalidades de la invención el análogo de SP-B se selecciona de aquellos que tienen las siguientes fórmulas

CLLCRALIKRIQAMIPKGGRRMLPQLVCRLVLRCS (IIb) (sec. con núm. de ident.:7)
 CWLCRALIKRIQALIPKGGRRLLPQLVCRLVLRCS (IIc) (sec. con núm. de ident.:8)
 CLLCRALIKRIQALIPKGGRRLLPQLVCRLVLRCS (IId) (sec. con núm. de ident.:9)

En una modalidad preferida, los polipéptidos (IIa), (IIb), (IIc) y (IId) pueden estar en forma de molécula enlazada a disulfuro en donde el enlace disulfuro intramolecular está entre los dos residuos de Cys en las posiciones 1 y 33 y/o entre los dos residuos de Cys en las posiciones 4 y 27.

El polipéptido enlazado a disulfuro (IIa) se denominó en la técnica como Mini-B oxidado (Mini-B ox).

El polipéptido (IIc) se denominará en adelante Mini-B(Lleu) y su forma enlazada a disulfuro como Mini-B ox(Lleu).

Los polipéptidos de las fórmulas generales (I) y (II) pueden prepararse de acuerdo con métodos sintéticos o técnicas recombinantes bien conocidas por aquellos con experiencia en la técnica.

Un excelente resumen de muchas técnicas disponibles pueden encontrarse en J.M. Steward y J.D. Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", W.H. Freeman Co., San Francisco, 1969, y J. Meienhofer, "Hormonal Proteins and Peptides", Vol.2, pág. 46, Academic Press (Nueva York), 1983 para la síntesis de péptido en fase sólida, y E. Schroder and K. Kubke, "The Peptides", Vol. 1, Academic Press (Nueva York), 1965 para la síntesis de soluciones clásicas. Los polipéptidos de la invención pueden prepararse además usando la técnica de síntesis en fase sólida inicialmente descrita por Merrifield, en J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154 (1963). Otras técnicas de síntesis de polipéptidos pueden encontrarse, por ejemplo, en M. Bodanszky y otros, "Peptide Synthesis", John Wiley & Sons, 2d Ed., (1976) así como en otros trabajos de referencia conocidos por aquellos con experiencia en la técnica.

Los grupos protectores adecuados para usar en tales síntesis se encontrarán en los textos anteriores así como en J.F.W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, Nueva York, NY (1973).

Por ejemplo, los polipéptidos de la fórmula general (I) pueden prepararse de acuerdo con el método descrito en WO 00/47623, mientras que los polipéptidos de la fórmula general (II) pueden prepararse de acuerdo con el método reportado en Waring AJ y otros J Peptide Res 2005, 66, 364-374.

La invención incluye además las sales farmacéuticamente aceptables de los polipéptidos de las fórmulas generales (I) y (II) y sus derivados N- y/o C-terminales bloqueados, por ejemplo a través de la acetilación y amidación.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, sales de ácido clorhídrico, ácido acético, y ácido trifluoroacético.

El surfactante reconstituido de la invención puede prepararse mediante el mezclado una solución o una suspensión de los polipéptidos de fórmula general (I) y (II) y lípidos y secando posteriormente la mezcla, de cualquier otra forma, pueden prepararse por liofilización o secado por aspersión.

Preferentemente, los polipéptidos de fórmula general (I) y los polipéptidos de fórmula general (II) están presentes en los surfactantes reconstituidos de la invención en una cantidad fija y relación cuantitativa como una combinación fija.

La proporción de los polipéptidos de las fórmulas generales (I) y (II) con relación al surfactante reconstituido puede variar. De manera favorable cada polipéptido puede estar presente en una cantidad comprendida entre 0.5 y 10% basado en el peso del surfactante (p/p), preferentemente entre 1 y 5%, con la máxima preferencia entre 1 y 3%.

En una modalidad preferida, el surfactante reconstituido comprende de 1 a 3% en peso del polipéptido (If), de 1 a 3% en peso del polipéptido (IIa), preferentemente en forma oxidada.

En otra modalidad preferida el surfactante reconstituido comprende de 1 a 3% en peso del polipéptido (If), de 1 a 3% en peso del polipéptido (IIc), preferentemente en forma oxidada.

De manera favorable, el portador lipídico comprende los fosfolípidos que están contenidos en las preparaciones naturales de surfactante pulmonar, por ejemplo, fosfatidilcolinas (PC) tales como dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), y fosfatidilglicerol (PG), tales como palmitoiloleoilfosfatidilglicerol (POPG) y dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG).

Otros fosfolípidos que pueden usarse favorablemente son fosfatidilinositoles (PI), fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilserinas y esfingomielinas (SM).

En una modalidad particular, el portador lipídico puede comprender otros componentes, por ejemplo, lípidos neutros tales como triacilglicerolos, ácidos grasos libres y/o colesterol.

De manera favorable el surfactante reconstituido de acuerdo con la invención comprende 90 a 99% en peso de un portador lipídico, preferentemente 92 a 98%, con mayor preferencia 94 a 96%, y 1 a 10% en peso de la suma de ambos péptidos, preferentemente 2 a 8%, con mayor preferencia 4 a 6%.

En una de las modalidades de la invención el surfactante reconstituido comprende 96% en peso de un portador lipídico, 2% en peso de un polipéptido de fórmula general (I) y 2% en peso de un polipéptido de fórmula general (II).

En una modalidad particular, el portador lipídico consiste solamente de fosfolípidos, con mayor preferencia de una mezcla de DPPC y un palmitoiloleilfosfolípido seleccionado de POPG o una mezcla de estos con POPC en relaciones de peso en el intervalo de 95:5 a 50:50, preferentemente de 80:20 a 60:40.

La relación de peso entre DPPC y POPG está preferentemente en el intervalo de 75:25 a 65:35, y con mayor preferencia 68:31. En el caso de mezclas DPPC:POPG:POPC, los fosfolípidos se usan preferentemente en relaciones de peso de 60:20:20 o 68:15:16.

En otra modalidad, el portador lipídico puede consistir de DPPC, DPPG y colesterol.

En una modalidad preferida de la invención, el surfactante reconstituido comprende de 1 a 5% en peso de uno de los polipéptidos de la fórmula general (Ia), de 1 a 5% en peso de uno de los polipéptidos de la fórmula general (II) y una mezcla de DPPC y POPG en una relación de peso de 68:31.

La administración del surfactante reconstituido de la invención se lleva a cabo de una manera conocida por la persona con experiencia en la técnica, preferentemente mediante instalación intratraqueal (infusión o bolo) o mediante nebulización.

La presente invención se refiere además a las composiciones farmacéuticas que comprenden el surfactante reconstituido de la invención. Dichas composiciones se administran de manera favorable en forma de una solución, dispersión, suspensión o polvo seco. Preferentemente dichas composiciones comprenden el surfactante reconstituido disuelto o suspendido en un disolvente o medio de resuspensión adecuado.

Preferentemente dichas composiciones farmacéuticas se suministran como suspensión en una solución acuosa salina fisiológica tamponada en viales de vidrio de un solo uso. De manera favorable la concentración del surfactante reconstituido (expresada como contenido de fosfolípido) está en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 160 mg de surfactante por ml, preferentemente entre 10 y 100 mg/ml, con mayor preferencia entre 20 y 80 mg/ml.

Dichas composiciones pueden comprender además electrolitos, tales como sales de calcio, magnesio y/o sodio, preferentemente cloruro de calcio.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención son adecuadas para la profilaxis y/o tratamiento del síndrome de diestrés respiratorio (RDS) en recién nacidos de forma prematura u otras enfermedades relacionadas con una deficiencia o disfunción de surfactante que incluyen RDS en adultos (ARDS), síndrome de aspiración de meconio (MAS), y displasia broncopulmonar (BPD).

Pueden ser útiles además en la profilaxis y/o tratamiento de otros trastornos respiratorios tales como neumonía, bronquitis, COPD (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), asma, y fibrosis quística, así como para el tratamiento de la otitis media serosa (oído pegajoso).

Los siguientes ejemplos ilustran con más detalles la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Síntesis y purificación de los polipéptidos SP-C33(Leu)³¹ y SP-C33.

El polipéptido SP-C33(Leu)³¹ se preparó por métodos estándares de SPPS (Síntesis de Péptido en Fase Sólida) basados en la química de Fmoc y escisiones con TFA consecutivas.

En total se obtuvieron 186.0 g de SP-C33(Leu)³¹ crudo.

El polipéptido se purificó al someter el material a distribución contracorriente (CCD) usando H₂O/n-BuOH/AcOEt/AcOH 4:1:4:1 como sistema solvente bifásico.

Esta purificación produjo 78.9 g de SP-C33(Leu)³¹ con una pureza de > 60%.

La purificación final se llevó a cabo mediante HPLC preparativo usando PLRP-S como fase estacionaria en una columna de acero de 50 x 300 mm aplicando un gradiente lineal de 25% B a 100% B en 75 minutos. La fase móvil consistió de tampón A = 0.1 % TFA en ACN/H₂O 1:4 y tampón B = 0.1 % TFA en IPA.

El polipéptido purificado se disolvió en 90% de AcOH y se pasó a través de una columna empaquetada con resina de intercambio iónico Dowex (forma de acetato) para proporcionar, después de la liofilización, 5.8 g (= 5.4%) del producto final como el acetato.

El polipéptido SP-C33 se preparó de manera análoga.

Leyenda

ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
Boc	t-Butiloxicarbonilo
n-BuOH	n-Butanol
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxicarbonilo
IPA	Alcohol Isopropílico
TFA	Ácido trifluoroacético

Ejemplo 2 - Síntesis y purificación de los polipéptidos Mini-B ox(Leu) y Mini-B-ox.

El polipéptido Mini-B-ox(Leu) se preparó por métodos estándares de SPPS (Síntesis de Péptido en Fase Sólida) basados en la química de Fmoc y escisiones consecutivas con TFA.

El polipéptido crudo se purificó con HPLC preparativo usando un sistema de TFA y se aisló mediante liofilización.

La oxidación del aire del péptido purificado rindió la secuencia monocíclica con el enlace disulfuro entre Cys¹ y Cys³³. El péptido monocíclico se purificó con HPLC preparativo usando un sistema de TFA y se aisló mediante liofilización.

El segundo puente disulfuro entre Cys⁴ y Cys²⁷ se formó usando yodo.

Después de la oxidación, el producto se purificó con HPLC preparativo usando un sistema de TFA y se aisló mediante liofilización. 1.12 g (= 1.7%) del compuesto final se aislaron con una pureza de >89%.

El polipéptido Mini-B ox se preparó de manera análoga.

Ejemplo 3 - Experimentos in vivo con un surfactante reconstituido basado en Mini-B ox y SP-C33

Las preparaciones de surfactantes se ensayaron en conejos recién nacidos prematuros, obtenidos por histerectomía en la edad gestacional de 27 días. Los experimentos se llevaron a cabo sin aplicar una presión espiratoria final positiva (PEEP).

Como análogo de SP-C, se usó el polipéptido referido como SP-C33 que se preparó de acuerdo con el Ejemplo 1.

Como análogo de la proteína SP-B, se usó el Mini-B oxidado (Mini-B ox) que se preparó de acuerdo con el Ejemplo 2.

Los animales se trataron en el nacimiento con las preparaciones de surfactante reconstituido que contienen, como portador lipídico, la mezcla de fosfolípido DPPC:POPG en la relación de 68:31 p/p. Los fosfolípidos se mezclaron con 2 o 4% p/p de SPC-33, 2% p/p de Mini-B ox o 2% p/p de SPC-33 más 2% p/p de Mini-B ox.

5 Los animales que recibieron la misma dosis de Curosurf® sirvieron como controles positivos y de la misma camada no tratados como controles negativos.

Todas las preparaciones surfactantes se administraron a una concentración de 80 mg/ml y a una dosis estándar de 2.5 ml/kg.

10 Los conejos recién nacidos inmaduros se ventilaron en paralelo con una secuencia estandarizada de presiones de pico de insuflación. Para abrir los pulmones, la presión se estableció primero en 35 cm H₂O por 1 min. Después de esta maniobra de reclutamiento, la presión se redujo a 25 cm H₂O por 15 min y más adelante en 20 y 15 cm H₂O. Finalmente, la presión se elevó de nuevo a 25 cm H₂O por 5 min, después que los pulmones se ventilaron por otros 5 minutos con nitrógeno y escindieron después para mediciones de volumen de gas.

Tanto los volúmenes de gas pulmonar como los volúmenes tidales expresados como ml/kg se midieron y los resultados, dado como valores promedios, se presentan en las Figuras 3 y 4, respectivamente.

20 En la Figura 3 se puede apreciar que los animales tratados con la preparación de surfactante reconstituido que contiene 2% p/p de Mini-B ox tuvieron volúmenes de gas pulmonar inferiores a los animales que recibieron 2% p/p de SP-C33 (aproximadamente 2 ml/kg ± vs aproximadamente 4 ml/kg).

25 La adición de 2% p/p de Mini-B ox al surfactante SP-C33 produjo un aumento significativamente mayor en los volúmenes de gas pulmonar que cualquier péptido solo (8 ml/kg vs aproximadamente 6 ml/kg).

Como se muestra en la Figura 4, se observó una tendencia similar para los volúmenes tidales y, después de la administración de los péptidos en combinación se observó una mejoría comparable o incluso ligeramente mejor que la alcanzada después de la administración de Curosurf®.

30 Se encontró además que el aumento de la forma del contenido de SP-C33 de 2 a 4% w/w no aumentó los volúmenes de gas pulmonar indicando que el efecto estabilizador de la película de fosfolípido en los alvéolos al final de la espiración se debe a la adición de Mini-B ox.

35 Dicho resultado demuestra que el surfactante reconstituido de la invención es capaz de estabilizar la película de fosfolípido en los alvéolos al final de la espiración de una mejor manera que el reconstituido que comprende sólo un análogo de la proteína SP-C o un análogo de la proteína SP-B.

40 Además, la preparación de surfactante reconstituido reivindicado resultó mejorar la función respiratoria como expresado por los volúmenes tidales en una medida comparable o incluso ligeramente mejor a la alcanzada después de la administración de un surfactante natural modificado.

LISTADO DE SECUENCIA

45 <110> Chiesi Farmaceutici spa
 <120> Surfactantes reconstituidos con propiedades mejoradas
 <130> 1113PCT
 <160> 9
 <170> PatentIn versión 3.3
 50 <210> 1
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Péptido Artificial
 <220>
 55 <223> Péptido Artificial
 <400> 1

ES 2 438 727 T3

Ile Pro Ser Ser Pro Val His Leu Lys Arg Leu Lys Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Leu Ile Leu Gly Ala Leu Leu Met Gly
20 25 30

Leu

<210> 2
<211> 33
<212> PRT
<213> Péptido Artificial

<220>
<223> IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLILGALLIGL

<400> 2

Ile Pro Ser Ser Pro Val His Leu Lys Arg Leu Lys Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Leu Ile Leu Gly Ala Leu Leu Ile Gly
20 25 30

Leu

<210> 3
<211> 33
<212> PRT

<213> Péptido Artificial
<220>
<223> Péptido Artificial

<400> 3

Ile Pro Ser Ser Pro Val His Leu Lys Arg Leu Lys Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Leu Ile Leu Gly Ala Leu Leu Leu Gly
20 25 30

Leu

<210> 4
<211> 34
<212> PRT
<213> Péptido Artificial

<220>
<223> Péptido Artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 4

5

Ile Pro Ser Ser Pro Val His Leu Lys Arg Leu Lys Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Leu Ile Leu Gly Ala Leu Leu Xaa Leu
20 25 30

Gly Leu

<210> 5

<211> 30

10

<212> PRT

<213> Péptido Artificial

<220>

15

<223> Péptido Artificial

<400> 5

Ile Pro Ser Ser Pro Val His Leu Lys Arg Leu Lys Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Leu Ile Leu Gly Ala Leu Leu
20 25 30

20

<210> 6

<211> 34

<212> PRT

<213> Péptido Artificial

25

<220>

<223> Péptido Artificial

<400> 6

30

Cys Trp Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro
1 5 10 15

Lys Gly Gly Arg Met Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg Leu Val Leu Arg
20 25 30

Cys Ser

<210> 7

<211> 33

35

<212> PRT

<213> Péptido Artificial

<220>

<223> Péptido Artificial

40

<400> 7

ES 2 438 727 T3

Cys Leu Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro
1 5 10 15

Lys Gly Gly Arg Met Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg Leu Val Leu Arg
20 25 30

Cys

5

<210> 8
<211> 34
<212> PRT
<213> Péptido Artificial

10

<220>
<223> Péptido Artificial
<400> 8

Cys Trp Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Ile Gln Ala Leu Ile Pro
1 5 10 15

15

Lys Gly Gly Arg Leu Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg Leu Val Leu Arg
20 25 30

Cys Ser

20

<210> 9
<211> 34
<212> PRT
<213> Péptido Artificial

25

<220>
<223> Péptido Artificial
<400> 9

Cys Leu Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Ile Gln Ala Leu Ile Pro
1 5 10 15

Lys Gly Gly Arg Leu Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg Leu Val Leu Arg
20 25 30

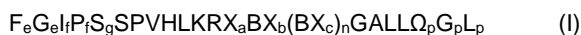
30

Cys Ser

REIVINDICACIONES

1. Un surfactante reconstituido que comprende una mezcla de fosfolípidos y una combinación de un análogo de polipéptido de la proteína surfactante nativa SP-C con un análogo de polipéptido de la proteína surfactante nativa SP-B

en donde dicho análogo de polipéptido de la proteína surfactante nativa SP-C es un polipéptido de al menos 20 residuos de aminoácido y no más de 40 residuos de aminoácido con la secuencia representada por la fórmula general (I)



en donde

X es un residuo de aminoácido independientemente seleccionado del grupo que consiste de I, L, y nL;
 B es un residuo de aminoácido independientemente seleccionado del grupo que consiste de K, W, F, Y, y Orn;
 S es opcionalmente sustituido con grupos acilo que contienen 12-22 átomos de carbono, preferentemente 16 átomos de carbono, unidos a la cadena lateral a través de un enlace éster;
 Ω es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de M o es oxidado en el átomo de azufre, I, L, y nL;
 A es un entero que tiene un valor comprendido de 1 a 8;
 B es un entero que tiene un valor comprendido de 1 a 19;
 C es un entero que tiene un valor independientemente seleccionado de 3 a 8;
 e, f, g y p son enteros que tienen un valor de 0 o 1;
 N es un entero que tiene un valor comprendido de 0 a 3;

con la condición de que la $X_a B X_b (B X_c)_n$ es una secuencia que tiene un máximo de 22 aminoácidos; y
 en donde dicho análogo de polipéptido de la proteína surfactante nativa SP-B es un polipéptido de la fórmula general (II):



en donde

Δ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de W y L;
 Ω es un residuo de aminoácido independientemente seleccionado del grupo que consiste de M, I, L, y nL;
 Φ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de R y T; y
 f es un entero que tiene un valor de 0 o 1.

2. El surfactante reconstituido de acuerdo con la reivindicación 1 en donde Φ es R.

3. El surfactante reconstituido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en donde el análogo de la proteína surfactante nativa SP-C y el análogo de la proteína surfactante nativa SP-B están presentes en una combinación fijada.

4. La composición de surfactante reconstituido de acuerdo con cualquier una de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el polipéptido (II) está en forma de molécula enlazada a disulfuro con el enlace disulfuro intramolecular entre los dos residuos de Cys en las posiciones 1 y 33 y/o entre los dos residuos de Cys en las posiciones 4 y 27.

5. La composición del surfactante reconstituido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el análogo de la proteína surfactante nativa SP-B se representa por la fórmula general (IIa)



6. El surfactante reconstituido de acuerdo con la reivindicación 5 en donde el análogo de la proteína surfactante nativa SP-C se representa por la fórmula general (Ia)

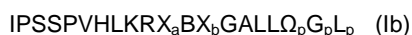


en donde

X, B y Ω son como se definió anteriormente;

a es de 1 a 8, preferentemente de 1 a 3; con mayor preferencia 1;
b es de 1 a 19, preferentemente de 5 a 15; con mayor preferencia 14; y
f y p son 0 o 1.

- 5 **7.** La composición del surfactante reconstituido de acuerdo con la reivindicación 6 en donde el análogo de la proteína surfactante nativa SP-C se representa por la fórmula general (Ib)



10 en donde:

X, B, Ω , a y b son como se definió anteriormente; y
p es 0 o 1.

- 15 **8.** La composición del surfactante reconstituido de acuerdo con la reivindicación 7 en donde el análogo de la proteína surfactante nativa SP-C se representa por la fórmula general (Ic)



20 en donde:

Ω es como se definió anteriormente; y
p es 0 o 1.

- 25 **9.** La composición del surfactante reconstituido de acuerdo con la reivindicación 8 en donde el análogo de la proteína surfactante nativa SP-C se selecciona del grupo que consiste de:



- 35 **10.** El surfactante reconstituido de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el análogo de polipéptido de la proteína surfactante nativa SP-C es



y el análogo de polipéptido de la proteína surfactante nativa SP-B es



- 45 **11.** El surfactante reconstituido de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el análogo de polipéptido de la proteína surfactante nativa SP-C es



y el análogo de polipéptido de la proteína surfactante nativa SP-B es



- 50 **12.** El surfactante reconstituido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la mezcla de fosfolípido consiste de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) y un palmitoil oleoil fosfolípido seleccionado de palmitoil oleoil fosfatidilglicerol (POPG) o una mezcla de estos con palmitoil oleoil fosfatidilcolina (POPC) con relaciones de peso en el intervalo de 95:5 a 50:50.

13. El surfactante reconstituido de acuerdo con la reivindicación 12 en donde la mezcla de fosfolípido consiste de DPPC y POPG en una relación de peso de 68:31.
- 5 14. Una composición farmacéutica que comprende el surfactante reconstituido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
15. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14 en forma de una solución, o dispersión, o suspensión o polvo seco.
- 10 16. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15 en forma de suspensión acuosa.
17. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 16 que comprende el surfactante reconstituido en una concentración comprendida entre 2 y 160 mg/ml.
- 15 18. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17 en donde la concentración del surfactante reconstituido está comprendida entre 20 y 80 mg/ml.
- 20 19. Un surfactante reconstituido de acuerdo con cualquier una de las reivindicaciones 1 a 13 para uso en el tratamiento o profilaxis del síndrome de diestrés respiratorio (RDS) en recién nacidos prematuros o en el tratamiento o profilaxis de otras enfermedades relacionadas con una deficiencia o disfunción de surfactante.
- 25 20. Un surfactante reconstituido para usar en la reivindicación 19 en donde las enfermedades relacionadas a una deficiencia o disfunción de surfactante incluyen RDS en adultos (ARDS) síndrome de aspiración de meconio (MAS), y displasia broncopulmonar (BPD).

Figura 1

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					

Figura 2

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 3

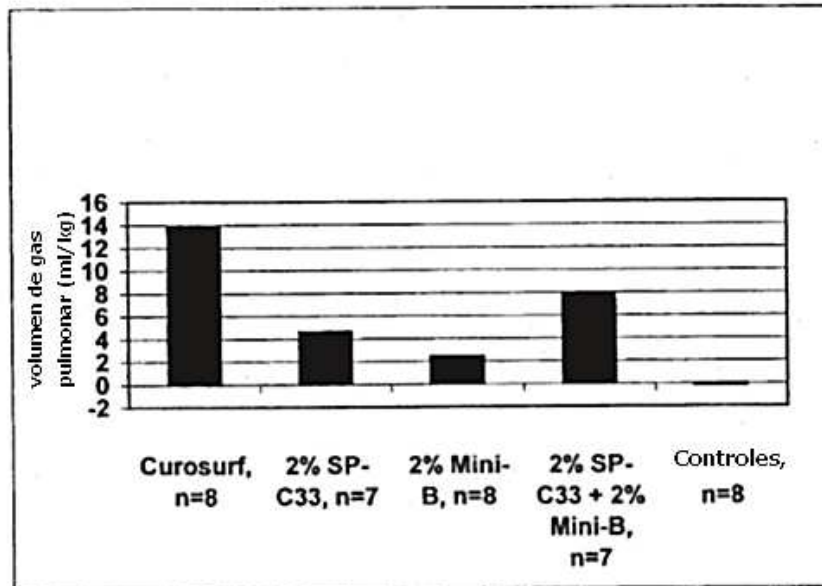


Figura 4

