(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 337 145**

(51) Int. Cl.:
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/12 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04734832 .1**
(96) Fecha de presentación : **26.05.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1628634**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2006**

(54) Título: **Mezclas de lípidos novedosas para tensioactivos sintéticos.**

(30) Prioridad: **30.05.2003 EP 03012417**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.04.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.04.2010

(73) Titular/es: **CHIESI FARMACEUTICI S.p.A.**
Via Palermo, 26/A
I-43100 Parma, IT

(72) Inventor/es: **Johansson, Jan;**
Curstedt, Tore y
Robertson, Bengt

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Mezclas de lípidos novedosas para tensioactivos sintéticos.

Antecedentes de la invención

El tensioactivo pulmonar endógeno reduce la tensión superficial en la interfaz aire-líquido del revestimiento alveolar, evitando que los pulmones colapsen al término de la espiración. La deficiencia de tensioactivos es un trastorno común en bebés prematuros y provoca el síndrome disneico agudo (SDA) que puede tratarse eficazmente con preparaciones que son extractos lipídicos de pulmón de mamífero picado o lavado pulmonar. Dichas preparaciones se conocen como tensioactivos naturales modificados y se componen principalmente de fosfolípidos (FL) como fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE) y fosfatidilglicerol (FG) y las proteínas de tensioactivo hidrófobas B y C (SP-B y SP-C).

Por razones de claridad, se enumeran a continuación los FL a los que se hace referencia en la solicitud de patente que sigue:

- fosfatidilcolina: FC,

- fosfatidiletanolamina: FE,

- fosfatidilglicerol: FG,

- fosfatidilinositol: FI,

- fosfatidilserina: FS,

- esfingomielina: EM,

- 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol, conocido generalmente como dipalmitoil-fosfatidilglicerol: DPFG,

- 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, conocido generalmente como dipalmitoil-fosfatidilcolina: DPFC,

- 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol, conocido generalmente como palmitoil-oleil-fosfatidilglicerol: POFG,

- 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfocolina conocido generalmente como palmitoil-oleil-fosfatidilcolina: POFC,

- 1,2-dioleil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol conocido generalmente como dioleil-fosfatidilglicerol: DOFG,

- 1-palmitoil-2-linoleil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, conocido generalmente como palmitoil-linoleil-fosfatidil colina: PLFC,

- 1-estearoil-2-araquidonoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, conocido generalmente como estearoil-araquidonoil-fosfocolina (EAFC),

- 1-palmitoil-2-araquidonoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (PAFC),

- 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, conocido generalmente como dipalmitoil-fosfatidiletanolamina: DPFE,

- 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, conocido generalmente como diestearoil-fosfatidiletanolamina: DEFE,

- 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina, conocido generalmente como dipalmitoil-fosfatidilserina: DPFS.

Las fracciones de glicerol de los fosfolípidos se esterifican principalmente con ácidos grasos de cadena larga (C_{14}-C_{20}), que a su vez pueden ser saturados (por ejemplo ácido mirístico, palmítico y esteárico), monoinsaturados (por ejemplo ácido oleico) o poliinsaturados (por ejemplo ácido linoleico y araquidónico).

Se conocen los fosfolípidos que contienen como residuos tipificadores fracciones neutras o zwitter-iónicas como glicerol (FG), inositol (FI) y serina (FS) como fosfolípidos ácidos. Otros ejemplos de fosfolípidos ácidos son DPFG, POFG y DPFS.

Normalmente, se administran tensioactivos a los bebés prematuros en forma de suspensiones acuosas mediante instilación en los pulmones a través de la tráquea. Se pueden administrar también a adultos aquejados por varias patologías que involucren una insuficiencia pulmonar severa como síndrome disneico agudo en el adulto (SDAA). Para alcanzar propiedades óptimas desde el punto de vista biofísico y farmacológico/terapéutico, una preparación de tensioactivos debería: i) reducir eficazmente la tensión superficial; ii) presentar una buena velocidad de dispersión; iii)

presentar una baja viscosidad para que pueda prepararse una suspensión concentrada en un medio acuoso con óptimas propiedades de administración y distribución a nivel alveolar, al ser administrada en pequeñas cantidades mediante instilación intratraqueal. La capacidad de los tensioactivos de reducir la tensión superficial, así como también otros parámetros como la velocidad de dispersión, puede evaluarse *in vitro* a través de la utilización de varios métodos, por ejemplo, el "método de la burbuja cautiva" según lo descrito en Schurch, S., Bachofen, H. Goerke, J., Possmayer, H. (1989) "A captive bubble method reproduces the *in situ* behaviour of lung surfactant monolayers" *J. Appl. Physiol*., 67: 2389-2396.

Uno de los componentes lipídicos más importantes de las preparaciones de tensioactivos es la 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPFC) ya que forma una película monomolecular en la interfaz aire-líquido durante la compresión, probablemente al someterse a una transición de fase (solidificación) durante compresión superficial, estabilizando así un sistema de alvéolos con diferentes tamaños.

En general, se reconoce también que los fosfolípidos ácidos son de suma importancia para alcanzar una buena actividad ya que favorecen la dispersión de la DPFC.

Por otra parte, las altas concentraciones de un FL saturado como la DPFC pueden afectar otras propiedades de la suspensión lipídica, como la viscosidad de la preparación.

La posibilidad de preparar una suspensión concentrada en pequeñas cantidades es una característica de particular importancia para la administración de tensioactivos a recién nacidos de bajo peso mediante instilación endotraqueal.

Los tensioactivos naturales modificados disponibles para uso terapéutico tienen una concentración comprendida generalmente entre 25 y 50 mg/ml. Sólo uno de ellos, "Curosurf ®", se encuentra disponible a una concentración superior, esto es 80 mg/ml.

Las preparaciones de tensioactivos obtenidas de tejidos animales presentan, de todos modos, algunos inconvenientes, como su disponibilidad en cantidades limitadas, la complejidad de la producción y los procesos de esterilización, y los significativos costos de producción: consecuentemente, se han realizado muchos esfuerzos para preparar los tensioactivos sintéticos.

Según Wilson (*Expert Opin Pharmacother* 2001, 2, 1479-1493), los tensioactivos sintéticos se dividen en:

tensioactivos "artificiales" desprovistos de proteínas de tensioactivos, compuestos simplemente por mezclas de compuestos sintéticos, fundamentalmente fosfolípidos y otros lípidos que se formulan para imitar la composición lipídica y el comportamiento del tensioactivo natural; y

tensioactivos "reconstituidos" que son tensioactivos artificiales a los que se les han añadido proteínas de tensioactivos aisladas de animales o fabricadas a través de tecnología recombinante, como los descritos en el documento WO 95/32992, o análogos de proteínas de tensioactivos sintéticos como los descritos en los documentos WO 89/06657, WO 92/22315 y WO 00/47623.

El desarrollo de tensioactivos reconstituidos se ha centrado en gran medida en los análogos de proteínas de tensioactivos y se le ha prestado menos atención a la composición lipídica.

No hay demasiada información disponible acerca de la composición y la concentración de la mezcla de lípidos de tensioactivos sintéticos en desarrollo.

En un estudio distribuido al azar multinacional enmascarado fundamental de fase III, se administraron 5,8 ml/kg o 175 mg/kg de Surfaxin® para comparar sus propiedades con relación a Exosurf® para prevenir el SDR (Moya F. *et al*. *Abstract* n.º 2643 de *the Annual Meeting de the Paediatric Academy Societies*, San Francisco, 1 a 4 de mayo de 2004). De los valores obtenidos, puede extrapolarse que se administró el Surfaxin® a una concentración de 30 mg/ml.

El Surfaxin®, presentado también como tensioactivo KL4, es un tensioactivo sintético que contiene péptidos que se prepara mezclando los fosfolípidos dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPFC) y 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (POFG) en una proporción 3:1 en peso con ácido palmítico (AP), 15% en peso en comparación con los fosfolípidos, en un solvente orgánico.

En un estudio previo, se utilizó también a dos concentraciones: 26,6 mg/ml y 35 mg/ml expresadas como concentración de fosfolípidos (*Am J Respir Crit Care Med 1996*, vol. 153, pp. 404-410).

Técnica previa

En la técnica previa, aparece información acerca de la composición lipídica de tensioactivos artificiales y/o reconstituidos en los siguientes documentos:

Suzuki *et al*. (*Eur J Respir Dis* 1986, 69, 336-345) describieron las propiedades *in vitro* e *in vivo* de un tensioactivo fabricado a partir de proteínas de tensioactivos de bajo peso molecular y una mezcla de fosfolípidos compuesta por

DPFC y 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (DPFG) en una proporción de 80:20 en peso. Aunque informaron que los fosfolípidos insaturados promueven una dispersión eficaz en la interfaz aire-líquido, se encontró que la DPFG era superior a la FG insaturada en un sistema de DPFC, recombinada con una apoproteína pequeña.

En Notter *et al*. (*Clin Perinatology* 1987, 14, 433-479), se revisan los efectos de los lípidos o fosfolípidos como dioleil-FC, FE, colesterol, FC saturado de cadena corta, ácidos grasos y glicéridos sobre las propiedades de redispersión de la DPFC. Los resultados generales muestran una redispersión dinámica mejorada en comparación con la DPFC sola. En el texto, se informa también que se han utilizado en la bibliografía tensioactivos artificiales fabricados a partir de DPFC:FG del huevo 7:3.

En Darfler FJ (*In vitro Cell Dev Biol*. 1990, 26(8), 779-83), se preparan microemulsiones de lípidos libres de proteínas adecuadas para uso en el cultivo tisular a partir de lípidos sintéticos purificados para producir una suspensión estable soluble en agua homogénea que puede filtrarse hasta esterilidad. Se optimizó la composición de la microemulsión a través de la observación de los efectos en el cultivo de células de ovario de hámster chino (OHC). Las microemulsiones preparadas presentadas en la Tabla 2 contienen alfa-tocoferol y al menos 16,3% de acetato de colesterol.

Los documentos WO 89/06657 y WO 92/22315 en nombre de Scripps se dirigen a un polipéptido análogo de SP-B, aunque en la memoria descriptiva se describe de forma genérica que la porción lipídica (de las composiciones de tensioactivos, nota del editor) *es preferentemente DPFC entre alrededor de 50 y alrededor de 90, más preferentemente entre alrededor de 50 y 75 por ciento en peso con la FC, la FG, los triacilgliceroles, el ácido palmítico, la esfingomielina restantes insaturados o una mezcla de los mismos*, en los ejemplos de ambas solicitudes, se evaluaron muestras de tensioactivos que contenían 4 o 10 mg/ml de una mezcla de DPFC: FG 3:1 (75:25) en peso para establecer sus propiedades *in vitro*. Para estudiar las propiedades *in vivo*, se utilizó una concentración de 20 mg/ml de la misma mezcla, que en algunos casos contenía además ácido palmítico.

En Cochrane *et al*. (*Science*, 1991, 254, 566-568), se investiga el comportamiento *in vitro* de péptidos simplificados, como KL_4 y FL, fabricados a partir de DPFC y FG 3:1, DPFC y 1-palmitoil-2-oleil FG (POFG) 3:1, DPFC y 1-palmitoil-2-oleil-FC (POFC) 3:1. Se ensayó KL_4 a una concentración de 3% y los otros péptidos a una concentración del 3 al 5%. Las propiedades *in vivo* de KL_4 al 3% en una mezcla de lípidos de DPFC:POFG (un fosfolípido monoinsaturado) en una proporción 3:1 y se sometió a prueba también el ácido palmítico al 15%. Los autores concluyen de forma general que la combinación de estos péptidos simplificados y DPFC:POFG proporcionan un excelente tensioactivo en conejos fetales de 27 días y monos Rhesus fetales de 130 días.

En Yu *et al*. (*Biochimica and Biophysica Acta* 1992, 1126, 26-34), se utilizó la técnica de la burbuja pulsante para estudiar la actividad superficial de una mezcla de fosfolípidos binarios que contienen DPFC y FL ácidos insaturados como FG del huevo, POFG o huevo-ácido fosfatídico en la proporción 7:3 p/p en combinación con SP-B al 1%.

En la solicitud de patente WO 95/32992 en nombre de Byk Gulden dirigida a polipéptidos análogos de SP-C, se informa generalmente que la porción de fosfolípido podría comprender DPFC, POFG (o FG) y una sal como Ca o Mg o cloruro de Na para reducir la viscosidad. En los ejemplos, se utilizó una mezcla de DPFC: POFG:ácido palmítico 7:3:0,25 + $CaCl_2$.

Curstedt *et al*. (9.º Taller internacional sobre reemplazo de tensioactivos, Jerusalén, 22 a 25 de mayo de 1994) expusieron acerca de la actividad *in vitro* del análogo de SP-C recombinado con las siguientes mezclas de lípidos: DPFC:POFC:DOFG 55:35:10, donde POFG y DOFG son monofosfolípidos insaturados; DPFC:FG 7:3; DPFC:FG: ácido palmítico 68:22:9, con o sin $CaCl_2$. La preparación que contenía DPFC:FG:ácido palmítico 68:22:9 exhibió una tasa de adsorción más rápida y una tensión superficial de equilibrio inferior a las de las otras mezclas de lípidos.

Krill *et al*. (*Chemistry and Physics of Lipids* 71, 47-59, 1994) llegaron a las mismas conclusiones; en un estudio dirigido a evaluar las propiedades *in vitro* de las composiciones de tensioactivos compuestas por un fragmento de proteína B sintética, DPFC y POFG, sugirieron que la presencia de ácido palmítico contribuye a establecer película lipídica estable de DPFC, capaz de alcanzar valores de tensión superficial bajos. No se realizó ninguna indicación acerca de la proporción entre los componentes.

En el documento WO 00/47623 en nombre del solicitante, dirigida a los péptidos análogos de SP-C, se informa genéricamente que se pueden seleccionar lípidos/fosfolípidos adecuados del grupo compuesto de FC (preferentemente DPFC), FG, ácido palmítico, triacilglicerales, esfingomielina. En los ejemplos, se han probado *in vitro* las preparaciones de tensioactivos fabricadas a partir de uno de los péptidos reivindicados, por ejemplo, SP-C(LKS) en combinación con DPFC:FG 7:3 p/p o DPFC:FG: ácido palmítico 68:22:9 p/p/p.

En Palmblad *et al*. (*Biochem J* 1999, 339, 381-386), se presentan los mismos datos que en WO 00/47623. En este documento, se establece también que se obtuvieron características *in vitro* óptimas en la preparación que contenía SP-C(LKS), SP-B, DPFC y FG, es decir cuando se omitió el ácido palmítico de la mezcla de lípidos.

Diemel *et al*. (*J Biol Chem*, 2002, 277, 21179-21188) disertaron acerca de las propiedades estructurales de las mezclas de tensioactivos fabricadas a partir de SP-B y DPFC:DPFG 80:20 o DPFC:POFG 80:20 o DPFC:POFC:DPFG 60:20:20.

En la última mezcla, se utilizaron fosfolípidos saturados (DPFG) y monoinsaturados (POFC).

El documento WO 02/06301 se refiere a un método para tratar afecciones asociadas con la oxidación de lípidos o la proliferación microbiana, e incluye el paso de administrar una composición que comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un compuesto de proteínas de tensioactivo pulmonar antimicrobianas o antioxidantes, como las proteínas A y D y derivados de las mismas. En el texto, se establece genéricamente que los métodos según la invención comprenden administrar dichos compuestos en combinación con un vehículo que puede ser un solvente orgánico, fosfatidilcolina, colesterol o fosfolípidos de tensioactivos. En los ejemplos, se utilizó una mezcla de lípidos de tensioactivos, compuesta por fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPFC), colesterol y 1-oleoil-2-linoleoil-sn-glicero-3 fosfocolina (1:1:0,15:0,15, p/p, respectivamente) como un sustrato para verificar la capacidad de las proteínas de tensioactivos pulmonares para prevenir la oxidación de lípidos. En esta mezcla, FC de huevo y DPFC estuvieron presentes en cantidades de 43%, mientras que 1-oleoil-2-linoleoil-sn-glicero-3 fosfocolina y colesterol estuvieron presentes en una cantidad de 7%, respectivamente, en el peso total de la mezcla. La mezcla no contenía fosfolípidos ácidos.

El documento US 2002/0072540 se dirige a una composición de tensioactivo pulmonar que comprende un tensioactivo pulmonar, que cuando se dispersa como polvo o partículas en cloruro de sodio al 0,9% p/p en una concentración de 10% p/p a temperatura ambiente es capaz de formar, en el curso del proceso inflamatorio, una red birrefringente o túbulos en una interfaz aire-líquido-sólido, en un período de tiempo entre alrededor de 0,5 min y alrededor de 120 minutos, según se observa mediante microscopía de polarización. En el texto se establece genéricamente que una composición de tensioactivo pulmonar según la invención comprende fosfolípidos como, por ejemplo, fosfolípidos saturados e insaturados o mezclas de los mismos. Los fosfolípidos pueden comprender dipalmitoil fosfatidilcolina (DPFC).

Evans *et al*. (*Lipids* 15, 524-535) plantean que las viscosidades superficiales de la mayoría de de los fosfolípidos totalmente saturados son muy altas y las de ciertos otros insaturados son muy bajas. Plantean también que el colesterol reduce las viscosidades superficiales en las monocapas de DPFC. Sin embargo, no muestran cómo ajustar la composición de la mezcla de lípidos de una preparación de tensioactivos de modo de reducir su viscosidad y mantener al mismo tiempo la capacidad de reducir efectivamente la tensión superficial baja durante la compresión de películas.

En la mayoría de los documentos de la técnica previa que hacen referencia a las mezclas de lípidos como vehículos para tensioactivos pulmonares, se utilizan o sugieren composiciones de lípidos que comprenden un contenido de FL saturado, y en particular DPFC, igual o superior a 70% en peso en combinación con FG o POFG como preferibles, en particular, para disminuir la tensión superficial a valores bajos.

Sin embargo, un contenido relativamente alto de FL saturado puede afectar las propiedades reológicas al aumentar la viscosidad de la preparación, en particular cuando se desea una composición de tensioactivos sintéticos concentrada, es decir igual o superior a alrededor de 30 mg/ml, preferentemente superior a 40 mg/ml, más preferentemente superior a 50 mg/ml. Una viscosidad alta puede afectar negativamente la dispersión del tensioactivo y por consiguiente su distribución en la parte broncoalveolar de los pulmones (King *et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002, 282, L277-L284). Además, para preparar suspensiones concentradas de mezclas de lípidos que comprenden altos contenidos de FL saturado con una viscosidad aceptable, es necesario recurrir a procedimientos de calentamiento y agitación vigorosa.

En vista de estos inconvenientes, sería muy ventajoso proporcionar mezclas para su utilización en la preparación de tensioactivos sintéticos que, aunque logren alcanzar buenas propiedades *in vitro* e *in vivo*, sean capaces de mantener la baja viscosidad de las preparaciones de tensioactivos concentradas, favoreciendo su administración y distribución en la parte broncoalveolar de los pulmones durante su administración.

Resumen de la invención

La presente invención se dirige a una mezcla de lípidos para preparar un tensioactivo sintético compuesto por al menos un 95% en peso de fosfolípidos, fosfolípidos que comprenden:

1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPFC) en una cantidad de al menos 40% en peso, preferentemente comprendida entre 40% y 65% en peso, más preferentemente comprendida entre 45% y 60% y en particular comprendida entre 45% y 55% en peso; fosfolípidos poliinsaturados en una cantidad superior a 10% en peso, preferentemente superior a 20% en peso, más preferentemente comprendida entre 20% y 45% en peso, y en particular entre 30% y 40% en peso; y fosfolípidos ácidos saturados o monoinsaturados en una cantidad superior a 10% en peso, preferentemente comprendida entre 10% y 30% en peso más preferentemente comprendida entre 15% y 30% en peso, y todas las cantidades se calculan en peso total de la mezcla de lípidos; que comprenden opcionalmente además un lípido neutro en una cantidad de hasta 5% en peso.

En efecto, se ha descubierto que con la utilización de una mezcla de lípidos con dicha composición es posible preparar las preparaciones de tensioactivos caracterizadas por buenas propiedades *in vitro*, es decir baja tensión superficial y alta velocidad de dispersión durante la compresión de película, así como también buena actividad biológica. Los experimentos *in vivo* llevados a cabo en conejos recién nacidos inmaduros han efectivamente probado que los

tensioactivos reconstituidos que contienen una mezcla de lípidos de la invención producen altos valores de volúmenes mareales y volúmenes de gas en los pulmones.

En particular, se ha descubierto que los tensioactivos reconstituidos que contienen una cantidad de FL insaturados superior al 30% y de fosfolípidos ácidos superior al 10% producen mejores rendimientos en términos de volúmenes de gas en el pulmón que aquéllos que contienen una cantidad menor.

Las preparaciones de tensioactivos sintéticos que contienen las mezclas de lípidos de la invención presentan características tecnológicas que permiten la preparación de una suspensión acuosa concentrada, igual o superior a 30 mg/ml, preferentemente superior a 40 mg/ml, más preferentemente superior a 50 mg/ml hasta 80 mg/ml de una mezcla de fosfolípidos, caracterizada por una baja viscosidad, comprendida ventajosamente entre 5 y 20 centipoises y preferentemente entre 6 y 15 centipoises, favoreciendo así su administración y distribución en los pulmones al ser administrada.

Descripción detallada de la invención

Las características de las mezclas de lípidos de la invención y las preparaciones de tensioactivos sintéticas correspondientes se describirán en la siguiente descripción detallada.

Ventajosamente, la mezcla de lípidos se compone de al menos un 95% de fosfolípidos en peso, preferentemente al menos 98% en peso. La fracción de fosfolípidos contiene 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPFC) en una cantidad de al menos un 40% en peso, preferentemente comprendida entre 40% y 65% en peso, más preferentemente comprendida entre un 45% y un 60% y en particular comprendida entre un 45% y un 55% en peso calculada sobre el peso total de la mezcla de lípidos.

Puede prepararse DPFC ya sea por vía sintética como a partir de una fuente natural. Ventajosamente la fracción de fosfolípidos contiene una cantidad de fosfolípidos poliinsaturados superior a un 10% en peso, preferentemente superior a un 20% en peso, más preferentemente comprendida entre un 20% y un 45% en peso y en particular entre un 30% y un 40% en peso, calculada sobre el peso total de la mezcla de lípidos.

Por fosfolípidos poliinsaturados se pretende designar a los fosfolípidos (FL) según la definición anterior en los que al menos uno de los residuos de ácidos grasos esterificantes contiene más de un enlace doble en la cadena alifática. Residuos de ácidos grasos poliinsaturados típicos son ácido linoleico, ácido linolénico y ácido araquidónico. Los fosfolípidos poliinsaturados de esta naturaleza son fosfatidilcolina (FC), fosfatidilinositol (FI), fosfatidiletanolamina (FE), fosfatidilserina (FS), fosfatidilglicerol (FG) y esfingomielina (EM).

Los fosfolípidos poliinsaturados preferidos son 1-palmitoil-2-linoleil-sn-glicero-3- fosfocolina (PLFC), 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina (PAFC) y 1- estearoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfo-colina (EAFC).

Los fosfolípidos poliinsaturados se encuentran generalmente disponibles a nivel comercial y pueden prepararse por vía sintética u obtenerse de una fuente natural, por ejemplo, de tejidos mamíferos.

En una realización de la invención, pueden utilizarse extractos naturales como fuente de fosfolípidos poliinsaturados. Por ejemplo, pueden utilizarse también fosfatidiletanolaminas aisladas del huevo (FE del huevo) o una mezcla de fosfolípidos que contiene ácidos grasos poliinsaturados obtenidos del aislamiento del hígado (FL hepático). Las FE del huevo contienen diferentes ácidos esterificantes y, entre otros, los ácidos linoleico y araquidónico poliinsaturados. Los FL hepáticos tienen habitualmente una composición porcentual media de alrededor de un 50% de FC, un 25% de FE, un 10% de esfingomielina, un 15% de fosfolípidos ácidos en peso, donde algunas de las especies de FL están esterificadas con ácidos poliinsaturados. El experto en la técnica utilizará las FE del huevo y/o las FL hepáticos en una cantidad tal que la composición final de la mezcla de lípidos cumpla con los requerimientos de la mezcla de lípidos de la invención.

Ventajosamente, la fracción de fosfolípidos contiene fosfolípidos saturados o monoinsaturados en una cantidad superior a un 10% en peso, preferentemente comprendida entre un 10% y un 30% en peso, más preferentemente comprendida entre un 15% y un 30% en peso, calculada sobre el peso total de la mezcla de lípidos.

Por fosfolípidos ácidos saturados se pretende designar a fosfolípidos como fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina donde los ácidos grasos esterificantes son saturados, mientras que por fosfolípidos ácidos monoinsaturados pretendemos significar aquéllos en los que al menos uno de los ácidos grasos esterificantes es monoinsaturado. Ejemplos típicos de FL saturados son 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (DPFG) y 1,2-dioleil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (DOFG) y 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (DPFS). Ejemplos de FL monoinsaturados son 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (POFG) y 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POFC). Preferentemente, los fosfolípidos ácidos en la mezcla de lípidos de la invención serán 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (DPFG), 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (POFG) y sus mezclas.

Además de DPFC, fosfolípidos poliinsaturados y fosfolípidos ácidos saturados o monoinsaturados, la fracción de fosfolípidos de la mezcla de lípidos de la invención puede contener otros fosfolípidos en los que los ácidos grasos

esterificantes son saturados o monoinsaturados. Fosfolípidos típicos de dicha clase son 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPFE) y 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DEFE).

Ventajosamente, en la mezcla de lípidos de la invención, la proporción entre fosfolípidos saturados e insaturados (monoinsaturados y poliinsaturados) quedará comprendida entre 65:35 y 40:60 en peso, preferentemente entre 55:45 y 45:55 en peso, y la proporción entre los fosfolípidos ácidos y los otros fosfolípidos quedará comprendida entre 10:90 y 30:70 en peso, preferentemente entre 15:85 y 25:75 en peso.

Opcionalmente, la mezcla de lípidos de la invención contiene hasta un 5% en peso de lípidos neutros, preferentemente en una cantidad igual o inferior a un 2% en peso. Los lípidos neutros comprenden triacilglicerales, colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos como ácido palmítico.

El lípido neutro preferido es el colesterol ya que puede contribuir a reducir la viscosidad de la mezcla de lípidos.

Como ejemplo de mezclas de lípidos de la invención, se utilizaron DPFC:PLFC:EAFC:DPFG:POFG en la proporción 45:30:10:5:10 (en peso) y DPFC:FL hepático:POFG en la proporción 50:40:10 (en peso).

Las mezclas de lípidos de la invención pueden ser particularmente útiles en la preparación de un tensioactivo reconstituido.

En una realización particular, la presente invención se refiere a un tensioactivo reconstituido que comprende una de las mezclas de lípidos previamente descritas en combinación con una proteína de tensioactivo aislada de animales o fabricada con tecnología recombinante, como las descritas en WO 95/32992, o con análogos sintéticos de las proteínas de tensioactivos SP-B o SP-C, como los descritos en WO 89/06657, WO 92/22315 y WO 00/47623, o con mezclas de los mismos.

La proteína puede ser cualquier proteína de tensioactivo, seleccionada de SP-A, SP-B, SP-C, SP-D o un análogo sintético o recombinante de las mismas.

El tensioactivo reconstituido de la invención puede comprender también una polimixina, preferentemente polimixina B, como sustituto funcional de la proteína de tensioactivo SP-B.

Preferentemente como análogos sintéticos de SP-C, se utilizará un péptido de la fórmula general (I) según un código de aminoácidos de una letra:

$$F_eG_fIPZZPVHLKR(X_aB)_n(X_bB)_n(X_cB)_mX_dGALL\Omega GL \qquad (I)$$

En la que:

X es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por I, L y nL (norleucina);

B es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto de K, I, W, F, Y y ornitina;

Z es S opcionalmente sustituido con grupos acilo que contienen de 12 a 22 átomos de carbono enlazados a la cadena lateral a través de un enlace de éster;

Ω es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por M, I, L y nL (norleucina);

a es un número entero de 1 a 19, preferentemente de 1 a 11;

b es un número entero de 1 a 19, preferentemente de 1 a 8;

c es un número entero de 1 a 21, preferentemente de 1 a 5;

d es un número entero de 0 a 20, preferentemente de 1 a 11;

e es 0 ó 1;

f es 0 ó 1;

n es 0 ó 1;

m es 0 ó 1;

donde, preferentemente:

- $n+m \geq 0$;

- $f \geq e$,

- $(X_aB)_n(X_bB)_n(X_cB)_mX_d$ es una secuencia que tiene un máximo de 22 aminoácidos, preferentemente de 10 a 22.

Se prefiere aún más el uso de péptidos de fórmula (II)

IPSSPVHLKRLBLLLLLLLLILLLILGALLΩGL (II)

en la que:

B es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por K, W, F, Y y ornitina

Ω es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por M, I, L y nL (norleucina);

y en la que la serina puede estar acilada opcionalmente, por ejemplo, con palmitoílo.

El péptido (SP-C33) que se presenta a continuación, en la forma no acilada, es el más preferido de la invención:

IFSSPVHLKRLKLLLLLLLLILLLILGALLMGL (SP-C33)

Dichos péptidos pueden prepararse de conformidad con el método presentado en el documento WO 00/47623.

La cantidad de proteína de tensioactivo o de péptido en el tensioactivo reconstituido variará en el intervalo del 0,1% al 5%, preferentemente del 0,5% al 3%, más preferentemente entre el 1% y el 2% en peso de la mezcla total.

Los tensioactivos reconstituidos reivindicados se prepararán mezclando soluciones en disolventes orgánicos de la mezcla de lípidos con el péptido o la proteína y secando subsiguientemente la preparación hasta la obtención de un polvo seco.

La invención se refiere también a formulaciones farmacéuticas compuestas por un tensioactivo sintético que comprende una mezcla de lípidos de la invención para administración a sujetos necesitados de un tratamiento terapéutico por deficiencia de tensioactivos.

Dichas formulaciones farmacéuticas se administrarán intratraquealmente o mediante nebulización en forma de suspensiones en un medio acuoso o mediante administración en aerosol en un propelente adecuado. Preferentemente, se administrarán intratraquealmente como una suspensión en una solución acuosa de cloruro de sodio al 0,9%. Ventajosamente, la concentración de tensioactivo (expresada como contenido de fosfolípidos) será superior a 30 mg/ml, preferentemente superior a 40 mg/ml, más preferentemente superior a 50 mg/ml, aún más preferentemente entre 50 y 80 mg/ml.

A una concentración de tensioactivo comprendida entre 50 y 80 mg/ml, la viscosidad del tensioactivo medida a 250ºC con la aplicación de un gradiente de cizallamiento en el intervalo de 100 y 500 s^{-1} quedará ventajosamente comprendida entre 2 y 30 centipoises, preferentemente entre 5 y 20 centipoises, más preferentemente comprendida entre 6 y 15 centipoises, aún más preferentemente entre 6 y 10 centipoises.

El tensioactivo que comprende la mezcla de lípidos de la invención puede utilizarse para el tratamiento terapéutico de todos los casos de deficiencias de tensioactivos y, típicamente, para el tratamiento terapéutico del síndrome disneico agudo neonatal (SDAN), síndrome disneico agudo agudo en adultos (SDRA), síndrome de aspiración del meconio (SAM), varios tipos de neumonía y displasia broncopulmonar.

Las ventajas de la presente invención se ilustrarán con los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Preparación de los tensioactivos reconstituidos

Materiales

Se utilizaron los fosfolípidos 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPFC), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (DPFG), 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (POFG), 1-palmitoil-2-linoleil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (PLFC), 1-estearoil-2-araquidonoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (EAFC) y la mezcla de fosfolípidos obtenida por aislamiento del hígado (FL hepático) para preparar la mezclas de lípidos y se adquirieron comercialmente.

El péptido SP-C33 se sintetizó según el método presentado en WO 00/47623.

Preparación de los tensioactivos reconstituidos

Se mezclaron los lípidos, disueltos en cloroformo/metanol 98:2 (v/v), en las proporciones DPFC:PLFC:EAFC: DPFG:POFG y DPFC:FL de hígado: POFG en la proporción 45:30:10:5:10 y 50:40:10 en peso, respectivamente, para obtener mezclas de lípidos según lo divulgado en la presente invención (mezclas de lípidos A y B). Se prepararon las preparaciones de tensioactivos reconstituidos correspondientes (tensioactivo A y B) mediante la adición de SP-C33 a la mezcla de lípidos, en una cantidad del 2% en peso. Se evaporó el tensioactivo A en nitrógeno y se resuspendió en NaCl 150 mmol/l a concentraciones de lípido de 10 mg/ml y 80 mg/ml, respectivamente, mientras que el tensioactivo B se resuspendió a una concentración de lípido de 80 mg/ml.

La composición de fosfolípidos del FL hepático del tensioactivo B se caracteriza de la siguiente manera: un 50% de fosfatidilcolina (FC), un 25% de fosfatidiletanolamina (FE), un 10% de esfingomielina (EM), 15% de fosfolípidos ácidos.

Ejemplo 2

Actividad in vitro

Se determinaron las propiedades superficiales en un tensioactivómetro de burbuja cautiva. La cámara se llenó con una solución de sacarosa y se inyectaron 2 μl del tensioactivo A (10 mg/ml); se creó entonces una burbuja a través de la insuflación de 10 microlitros de aire. Se determinó la tensión superficial en la interfaz aire-líquido a partir de la forma de la burbuja durante adsorción por película y subsiguiente compresión del área cíclica *cuasi* estática.

El tensioactivo A demostró un buen rendimiento en términos de compresión del área superficial requerida para alcanzar la tensión superficial mínima.

Ejemplo 3

Actividad in vivo del tensioactivo A

Se suministraron fetos pretérmino de ratones (n = 34) a una edad gestacional de 27 días por cesárea (término =31 días). Durante el suministro, se anestesiaron los animales con sodio pentobarbital intraperitoneal (0,1 ml; 6 mg/ml), se les realizó una traqueotomía, se paralizaron con bromuro de pancuronio intraperitoneal (0,1-0,15 ml; 0,2 mg/ml) y se mantuvieron en un sistema de pletismografía a 37°C. Se ventilaron mecánicamente en paralelo con un Servo-Ventilador modificado que administraba oxígeno al 100%. Después de la instilación de tensioactivo, se elevó en primer lugar la presión pico a 35 cm de H_2O durante 1 min para facilitar la distribución del tensioactivo en los pulmones, y luego se redujo a 25 cm de H_2O. Los animales se ventilaron entonces con una presión pico de 25 cm de H_2O durante 15 min, que se redujo a 20 cm de H_2O durante 5 min y luego a 15 cm de H_2O durante 5 min, y entonces se elevó nuevamente a 25 cm de H_2O durante 5 min. Se registraron los volúmenes mareales a intervalos de 5 min a través de un neumotacógrafo conectado a la caja pletismográfica.

La frecuencia era de 40 por minuto y la relación temporal inspiración:espiración 1:1. No se aplicó presión espiratoria final positiva.

Los conejos recién nacidos inmaduros recibieron aleatoriamente al nacer 2,5 ml/kg de peso corporal del tensioactivo A (80 mg/ml) a través de una cánula traqueal. En los animales de control, no se instiló material alguno en las vías respiratorias. Todos los animales recibieron ventilación durante 30 min.

Se midieron los volúmenes corrientes (V_{Tc}) con un sistema pletismógrafo, según lo descrito en Sun y col., *Eur Respir J* 1991, 4, 364-370, y se estimaron los volúmenes de gas en los pulmones (VGP) en la espiración final a partir de la diferencia entre el volumen pulmonar y el peso húmedo pulmonar (Scherle *et al. Mikroscopie* 1970, 26, 57).

En estos experimentos, se observó que el tensioactivo A exhibió altos volúmenes corrientes. También, los volúmenes de gas en los pulmones aumentaron notoriamente.

Ejemplo 4

Actividad in vivo del tensioactivo B

Se comparó el tensioactivo B (80 mg/ml) con un tensioactivo natural modificado comercialmente disponible (Curosurf) (80 mg/ml) por el volumen corriente y el volumen de gas en los pulmones en el mismo modelo animal del Ejemplo 3: el tensioactivo reconstituido B preparado de conformidad con la invención exhibió una actividad comparable con la del tensioactivo natural modificado.

REIVINDICACIONES

1. Una mezcla de lípidos para preparar un tensioactivo sintético; estando dicha mezcla de lípidos compuesta principalmente de:

al menos un 95% en peso de fosfolípidos; comprendiendo estos fosfolípidos:

1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPFC) en una cantidad de al menos un 40% en peso, fosfolípidos poliinsaturados en una cantidad superior a un 10% en peso y fosfolípidos saturados o monoinsaturados ácidos en una cantidad superior a un 10% en peso;

estando todas las cantidades calculadas sobre el peso total de la mezcla de lípidos.

2. Una mezcla de lípidos según la reivindicación 1 que contiene además un lípido neutro en una cantidad de hasta un 5% en peso del peso total de la mezcla de lípidos.

3. Una mezcla de lípidos según la reivindicación 2 en la que el lípido neutro se selecciona del grupo compuesto por triacilglicerales, colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos.

4. Una mezcla de lípidos según las reivindicaciones 1 a 3 en la que la cantidad de DPFC está comprendida entre un 40% y un 65% en peso.

5. Una mezcla de lípidos según la reivindicación 4 en la que la cantidad de DPFC está comprendida entre un 45% y un 55% en peso.

6. Una mezcla de lípidos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que la cantidad de fosfolípido poliinsaturado es superior a un 20% en peso.

7. Una mezcla de lípidos según la reivindicación 6 en la que la cantidad de fosfolípido poliinsaturado está comprendida entre un 30% y un 40% en peso.

8. Una mezcla de lípidos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que la cantidad de fosfolípidos ácidos está comprendida entre un 15% y un 30% en peso.

9. Una mezcla de lípidos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el fosfolípido poliinsaturado se selecciona del grupo compuesto por 1-palmitoil-2-linoleil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (PLFC), 1-palmitoil-2-araquidonoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (PAFC) y 1-estearoil-2-araquidonoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (EAFC), fosfatidiletanolamina aislada del huevo (FE del huevo) o una mezcla de fosfolípidos obtenida por aislamiento hepático (FL hepático).

10. Una mezcla de lípidos, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el fosfolípido ácido se selecciona del grupo compuesto por 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (DPFG), 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (POFG), 1,2-dioleil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (DOFG), 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POFC) y 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (DPFS).

11. Una mezcla de lípidos según la reivindicación 10 en la que el fosfolípido ácido se selecciona de DPFG, POFG y una mezcla de las mismas.

12. Una mezcla de lípidos según las reivindicaciones 1 a 11 en la que la proporción entre fosfolípidos saturados e insaturados (monoinsaturados y poliinsaturados) está comprendida entre 65:35 y 40:60 en peso.

13. Una mezcla de lípidos según las reivindicaciones 1 a 11 en la que la proporción entre los fosfolípidos ácidos y los otros fosfolípidos está comprendida entre 10:90 y 30:70 en peso.

14. Un tensioactivo reconstituido que comprende una mezcla de lípidos de las reivindicaciones 1 a 13 en combinación con una o más proteínas de tensioactivos seleccionadas entre SP-A, SP-B, SP-C, SP-D, sus análogos sintéticos o recombinantes.

15. Un tensioactivo reconstituido según la reivindicación 14 en el que la proteína de tensioactivo está presente en una cantidad de alrededor de un 0,1% a un 5% en peso de la mezcla total.

16. Un tensioactivo reconstituido según las reivindicaciones 14 y 15 en el que la proteína de tensioactivo es un análogo sintético o recombinante de SP-C de fórmula general (I), según el código de aminoácidos de una letra:

$$F_eG_fIPZZPVHLKR(X_aB)_n(X_bB)_n(X_cB)_mX_dGALL\square GL \qquad (I)$$

caracterizado por lo siguiente:

X es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por I, L y nL (norleucina);

B es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por K, I, W, F, Y y ornitina;

Z es S opcionalmente sustituido con grupos acilo que contienen de 12 a 22 átomos de carbono enlazados a la cadena lateral a través de un enlace de éster;

Ω es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por M, I, L, nL;

a es un número entero de 1 a 19;

b es un número entero de 1 a 19;

c es un número entero de 1 a 21;

d es un número entero de 0 a 20;

e es 0 ó 1;

f es 0 ó 1;

n es 0 ó 1;

m es 0 ó 1;

donde

- $n+m \geq 0$;

- $f > e$,

- (XaB)n(XbB)n(XcB)mXd es una secuencia que tiene un máximo de 22 aminoácidos, preferentemente de 10 a 22.

17. Un tensioactivo reconstituido según la reivindicación 16 en el que el análogo de SP-C tiene la fórmula (II):

IPSSPVHLKRLBLLLLLLLLILLLILGALL□GL (II)

en la que

B es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por K, W, F, Y y ornitina; y

Ω es un aminoácido seleccionado del grupo compuesto por M, I, L y nL.

18. Un tensioactivo reconstituido según la reivindicación 17 en el que el análogo de SP-C tiene la siguiente composición de aminoácidos:

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLILLLILGALLMGL

19. Una formulación farmacéutica que comprende un tensioactivo reconstituido de las reivindicaciones 14 a 18.

20. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 19 en forma de suspensión en una solución acuosa de cloruro de sodio al 0,9%, siendo la concentración de tensioactivo (expresada como contenido de fosfolípidos) superior a 30 mg/ml.

21. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 20 en la que la concentración de tensioactivo es superior a 40 mg/ml.

22. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 21 en la que la concentración de tensioactivo es superior a 50 mg/ml.

23. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 22 en la que la concentración de tensioactivo está comprendida entre 50 mg/ml y 80 mg/ml.

24. Una formulación farmacéutica según las reivindicaciones 19 a 23 **caracterizada** por una viscosidad comprendida entre 5 y 20 mPa·s (centipoises).

25. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 24 **caracterizada** por una viscosidad comprendida entre 6 y 15 mPa·s (centipoises).