



(12) **PATENT**

(11) **342038**

(13) **B1**

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

C07K 14/785 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20091441	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2007.09.28 PCT/IB2007/002841
(22)	Inng.dag	2009.04.14	(85)	Videreføringsdag	2009.04.14
(24)	Løpedag	2007.09.28	(30)	Prioritet	2006.10.13, EP, 06021521
(41)	Alm.tilgj	2009.06.23			
(45)	Meddelt	2018.03.19			
(73)	Innehaver	Chiesi Farmaceutici SpA, Via Palermo, 26/A, IT-43100 PARMA, Italia			
(72)	Oppfinner	Jan Johansson, c/o Chiesi Farmaceutici SpA, Via Palermo, 26/A, IT-43100 PARMA, Italia Tore Curstedt, c/o Chiesi Farmaceutici SpA, Via Palermo, 26/A, IT-43100 PARMA, Italia Bengt Robertson, c/o Chiesi Farmaceutici SpA, Via Palermo, 26/A, IT-43100 PARMA, Italia			
(74)	Fullmektig	OSLO PATENTKONTOR AS, Postboks 7007 M, 0306 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Rekonstituerte surfaktanter med forbedrede egenskaper			
(56)	Anførte publikasjoner				
		WO 00/47623 A1, WARING A J ET AL, "The role of charged amphipathic helices in the structure and function of surfactant protein B", JOURNAL OF PEPTIDE RESEARCH, vol. 66, no. 6, side 364-374, EP 1481665 A1, PALMBLAD ET AL, "BIOPHYSICAL ACTIVITY OF AN ARTIFICIAL SURFACTANT CONTAINING AN ANALOGUE OF SURFACTANT PROTEIN (SP)-C AND NATIVE SP-B", BIOCHEMICAL JOURNAL, PORTLAND PRESS, LONDON, GB, 1999, vol. 339, no. 2, side 381-386			
(57)	Sammendrag				

Den foreliggende oppfinnelsen retter seg mot en rekonstituert surfaktant omfattende en lipidbærer, en polypeptidanalogue av opprinnelig surfaktantprotein SP-C, og en polypeptidanalogue av det opprinnelige surfaktantprotein SP-B. Oppfinnelsen retter seg også mot de farmasøytiske sammensetningene derav og til deres bruk for behandling eller profylakse av RDS og andre respiratoriske lidelser.

Den foreliggende oppfinnelsen retter seg mot rekonstruerte surfaktanter som omfatter en lipidbærer, og en kombinasjon av en spesiell polypeptidanalogue av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-C med en spesiell polypeptidanalogue av det opprinnelige proteinet SP-B, hvilken rekonstituert surfaktant har den sammensetningen som er angitt i krav 1.

Oppfinnelsen retter seg også mot de farmasøytiske sammensetningene derav og til deres anvendelse for fremstilling av medikamenter til behandling eller profylakse av RDS og andre åndedrettslidelser.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Den menneskelige lunge er sammensatt av et stort antall små sekker, kalt alveoli, i hvilke gasser veksles mellom blodet og luftrommene i lungene. I friske individer medieres denne vekslingen ved tilstedeværelsen av proteininnholdende surfaktantkomplekser som forhindrer lungene fra å kollapse ved slutten av utånding.

Lungesurfaktantkomplekser er primært sammensatt av lipid og inneholder mindre mengder av ulike proteiner. Et fravær av adekvate nivåer av dette komplekset bidrar til funksjonsfeil i lungene. Dette syndromet kalles akutt lungesviktssyndrom (RDS) og rammer vanligvis for tidlig fødte spedbarn.

Nevnte syndrom behandles effektivt med modifiserte naturlige surfaktantfremstillinger ekstrahert fra dyrelunger.

Kommersielt tilgjengelige modifiserte surfaktantfremstillinger er, f.eks., Curosurf, utledet fra svinelunger, Infracurf, ekstrahert fra klavelungeskylling og Survanta, et kjemisk modifisert naturlig kalvelungeekstrakt.

Hovedbestanddelene av disse surfaktantfremstillingene er fosforlipider slik som 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-fosfokolin vanlig kjent som dipalmitoyl-fosfatidylkolin (DPPC), fosfatidylglycerol (PG) og surfaktant-hydrofobiske proteiner B og C (SP-B og SP-C).

Grunnet ulempene av surfaktantfremstillinger fra dyrevæv, slik som komplikasjonen av produksjons- og steriliseringsprosesser og mulig induksjon av immunreaksjoner, har syntetiske surfaktanter som etterligner sammensetningen av de modifiserte

naturlige surfaktantene blitt utviklet. Nevnte syntetiske surfaktanter er kjent som rekonstituerte surfaktanter.

Imidlertid har utviklingen av klinisk aktive rekonstituerte surfaktanter vist seg å være kompliserte siden de opprinnelige hydrofobiske proteinene er for store til å
5 syntetisere, strukturelt komplekse og er ustabile i ren form.

For å erstatte nevnte opprinnelige hydrofobiske proteiner har noen syntetiske polypeptider delvis korresponderende til deres sekvenser og analoger derav blitt foreslått i den tidligere teknikk og er f.eks. beskrevet i WO 89/06657, WO 92/22315, WO 98/49191, WO 95/32992, US 6660833, EP 413,957 og WO
10 91/18015, samt WO 00/47623 A1, Waring A et al. «The role of charged amphipathic helices in the structure and function of surfactant protein B» S. of peptide Res. vol. 66, no. 6 side 364-374; EP 1481665 A1 og Palmblad et al. "Biophysical activity of an artificial surfactant containing an analogue of surfactant protein (SP) – (and native SP-B" Chem. J. Portland Press, London, GB, vol. 339, no.
15 2, side 381-386.

WO 00/47623 beskrev syntetiske polypeptider som er analoger av det opprinnelige proteinet SP-C hvori: i) cysteinresiduer i posisjon 5 og 6 har blitt erstattet av Ser-residuer; ii) Val-residuene av "midtregionen" av SP-C har blitt substituert med andre nøytrale og hydrofobiske residuer valgt fra gruppen bestående av Leu, Ile og
20 norleucin (nL); iii) noen av de nøytrale aminosyrene til stede i "midtregionen" av SP-C har blitt erstattet med massive eller polare residuer valgt fra gruppen bestående av Lys, Try, Phe, Tyr, og Ornitin.

Nevnte kunstige polypeptider er karakterisert ved at de er i stand til å folde seg sammen som det opprinnelige proteinet SP-C og, derfor, samarbeide passende med
25 sufraktantlipidene og gir ikke økning av selv-oligomerisering.

WO 00/76535 omhandler generelt lungesurfaktantfremstillinger omfattende minst én modifikasjon av SP-B i kombinasjon med minst én modifikasjon av SP-C-protein.

I Waring AJ *et al*, (sammendrag presentert ved Paediatric Academy Society Annual
30 mote holt i San Francisco 29. April - 2. Mai. 2006) ble en studie igangsatt for å undersøke aktiviteten av en syntetisk surfaktant som utgjør SP-C-etterlignende SP-

Cff, som er et syntetisk 34-residu SP-C med fenylalanin i stedet for cystein i posisjoner 4 og 5, og SP-B-etterlignende Mini-B.

Imidlertid, i henhold til den tilgjengelige litteraturen, gir i dyrestudier, behandlingen med gjenopprettede surfaktanter grobunn for svake lungegassvolumer og en grad
5 av alveolar åpenhet ved slutten av utånding, og en ventilasjon er påkrevd med et positivt endeåndedrettstrykk (PEEP) for å oppnå en in vivo-aktivitet som er sammenlignbar med den oppnådd med modifiserte naturlige surfaktanter (Johansson J et al J Appl Physiol 2003, 95, 2055-2063; Davis AJ et al Am J Respir Crit Care Med 1998; 157, 553-559). De tilgjengelige gjenopprettede
10 surfaktantfremstillingene er i aller høyeste grad ikke i stand til å danne en stabil fosfolipidisk film i alveolen ved slutten av utånding.

Alle de tidligere nevnte dokumentene er tause om problemet angående alveolar åpenhet ved slutten av utånding og effekten av de beskrevne fremstillingene derav.

Derfor finnes det fremdeles et utilfredsstilt behov for en rekonstituert surfaktant
15 med forbedrede egenskaper med tanke på lungesamsvar.

Særlig er det et behov for en rekonstituert surfaktantfremstilling som er i stand til å garantere alveolar stabilitet, og som følgelig opprettholder alveolar åpenhet ved slutten av utånding uten å kreve ventilasjon med PEEP.

Det har nå blitt funnet, og det er et formål med den foreliggende oppfinnelsen, at
20 særlige analoger av det opprinnelige SP-C-proteinet som angitt i krav 1, og fortrinnsvis polypeptider av WO 00/47623, fordelaktig kan kombineres med særlige analoger av det opprinnelige proteinet SP-B for å tilveiebringe en rekonstituert surfaktantfremstilling med forbedrede egenskaper med tanke på lungesamsvar, og særlig kapasitet til å effektivt opprettholde alveolar åpenhet ved slutten av
25 utånding uten å kreve ventilasjon med PEEP.

Særlig har det blitt funnet at, i en modell av RDS hvori den for tidlig fødte ble behandlet med eksogene surfaktantfremstillinger uten å anvende PEEP, en kombinasjon av nevnte særlige analoger av proteinene SP-C og SP-B virker på lungegassvolumene som er en indeks for den alveolare åpenheten ved slutten av
30 utånding.

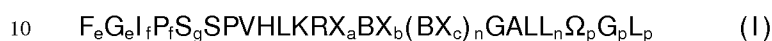
SAMMENDRAG AV OPPFINNELSEN

Den foreliggende oppfinnelsen retter seg mot en rekonstituert surfaktant omfattende en lipidbærer, og en kombinasjon av en særlig polypeptidanalogue av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-C med en spesiell polypeptidanalogue av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-B, slik som angitt i krav 1.

Særlig retter oppfinnelsen seg mot en rekonstituert surfaktant omfattende:

a) en lipidbærer

b) et polypeptid av minst 20 aminosyreresiduer og ikke mer enn 40 aminosyreresiduer som har sekvensen representert ved den generelle formelen (I)



hvor:

X er et aminosyreresidu uavhengig valgt fra gruppen bestående av nL;

B er et aminosyreresidu uavhengig valgt fra gruppen bestående av K, R, H, W, F, Y, og Orn;

S er et aminosyreresidu eventuelt substituert med acylgrupper inneholdende 12-22 karbonatomer, fortrinnsvis 16 karbonatomer, bundet til sidekjeden via en esterbinding;

Ω er en aminosyre valgt fra gruppen bestående av M eller M oksidert på svovelatomet I, L og nL;

a er et heltall som har en verdi i område fra 1 til 8;

b er et heltall som har en verdi i område fra 1 til 19;

c er et heltall som har en verdi uavhengig valgt fra 3 til 8;

e, f, g og p er heltall som har en verdi på 0 eller 1;

n er et heltall som har en verdi i området fra 0 til 3; og

med det forbehold at $X_aBX_b(BX_c)_n$ er en sekvens som har maksimum 22 aminosyrer, og hvor nevnte polypeptidanalogue av det opprinnelige surfaktantpropeinet S.

5 et polypeptid som har formelen (II):

$C_\Delta\text{ALCRALIKRIQA}\Omega\text{IPKGGR}\Omega\text{LPQLVCRLVL}\Phi\text{CS}^f$ (II)

hvor:

Δ er et aminosyreresidu uavhengig valgt fra gruppen bestående av W og L;

10 Ω er et aminosyreresidu uavhengig valgt fra gruppen bestående av M, I, L og nL;

Φ er et aminosyreresidu uavhengig valgt fra gruppen bestående av R og T, fortrinnsvis R; og

f er et heltall som har en verdi på 0 eller 1.

15 Oppfinnelsen inkluderer også de farmasøytisk akseptable saltene av nevnte polypeptider og deres blokkerte N- og/eller C-terminus derivater, f.eks. via acetylering og amidering.

Oppfinnelsen retter seg også mot de farmasøytiske sammensetningene derav og deres anvendelse ved fremstilling av medikamenter til profylakse og/eller behandling av akutt lungesviktssyndrom (RDS) og andre åndedrettslidelser.

20 Oppfinnelsen retter seg ytterligere mot anvendelsen av polypeptidene av generell formel (II) for fremstillingen av en rekonstituert surfaktant for å forbedre den alveolare åpenheten ved slutten av utånding.

FIGURER

25 Figur 1 viser sekvensen av humant protein SP-C. Cys-residuene er palmitoylert i opprinnelig SP-C.

Figur 2 viser sekvensen av humant protein SP-B.

Figur 3 viser resultatene med tanke på lungegassvolumer (ml/kg).

Figur 4 viser resultater i termer av tidale volumer (ml/kg) som en funksjon av tid/trykk.

5 DEFINISJONER

Åndedrettsfunksjon etter in vivo behandling med de eksogene surfaktantfremstillingene utføres ved å måle to parametere:

i) det tidale volumet som er en indeks på lungesamsvar og

ii) lungegassvolumet som er en indeks på den alveolare luftekspansjonen
 10 eller åpenheten ved slutten av utånding, og følgelig også evnen til å danne en stabil fosfolipidisk film i alveolen ved slutten av utånding.

I den foreliggende søknaden betyr "rekonstituert surfaktant" en lipidbærer til hvilken polypeptidanaloger av surfaktantproteinene, gjort gjennom rekombinant teknologi eller syntetiske fremgangsmåte, har blitt tilsatt.

15 Begrepet "lipidbærer" betyr en blanding av fosfolipider og eventuelt ytterligere lipidkomponenter, f.eks. nøytrale lipider slik som triacylglyseroler, frie fettsyrer og/eller kolesterol.

Begrepet "polypeptidanaloger av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-C", inkluderer polypeptider som har en aminosyresekvens hvor, sammenlignet med de
 20 opprinnelige proteinene, én eller flere aminosyrer mangler eller har blitt erstattet av andre aminosyrer, så lenge polypeptidene i en blanding med en lipidbærer, viser lungesurfaktantaktivitet.

Begrepet "polypeptid-analoger av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-B", inkluderer peptider som har en aminosyresekvens, hvor sammenlignet med de
 25 opprinnelige proteinene, én eller flere aminosyrer mangler så lenge polypeptidene, i en blanding med en lipidbærer, viser lungesurfaktantaktivitet.

Begrepet "mini-B" betyr et 34-residu polypeptid basert på N-terminal-residuer 8-25 og C-terminal-residuer 63-78 av det opprinnelige SP-B proteinet, hvilken struktur først ble generelt beskrevet i en presentasjon tatt fra California NanoSystems

Institute hjemmeside. Dens fulle sekvens har etter dette blitt beskrevet i RCSB Protein Data Bank.

I Waring AJ et al J Peptide Res 2005, 66, 364-374, ble mer informasjon om dens struktur og aktivitet rapportert.

- 5 Begrepet "varianter" betyr polypeptidanaloger av Mini-B peptid som har en aminosyresekvens i hvilken én eller flere aminosyrer har blitt erstattet av andre aminosyrer, så lenge peptidene, i en blanding med en lipidbærer, beholder aktiviteten av Mini-B.

- 10 Aminosyresekvensene er vist i henhold til tre-bokstavkoden med aminosyren som bærer den frie aminogruppen på den venstre enden (amino terminus) og aminosyren som bærer den frie karboksylgruppen på den høyre enden (karboksy terminus).

- 15 Begrepet "synergistisk" betyr at effektiviteten av de to polypeptidene er mer enn forventet ved å oppsummere deres respektive individuelle effektivitet i en gitt assay.

Alle aminosyreresiduene identifisert heri er i den naturlige L-konfigurasjonen og sekvensene identifisert heri rapporteres i henhold til standardforkortelser for aminosyreresiduer som vist i den følgende korrespondansetabellen.

KORRESPONDANSETABELL

- 20 AMINOSYRE SYMBOL

	<u>Én-bokstav</u>	<u>Tre-bokstaver</u>	
	Glycin	G	Gly
	L-prolin	P	Pro
	L-isoleucine	I	Ile
25	L-leucin	L	Leu
	L-tyrosin	Y	Tyr
	L-cystein	C	Cys
	L-tryptofa	W	Trp
	L-alanin	A	Ala

	L-lysin	K	Lys
	L-arginin	R	Arg
	L-glutamin	Q	Glu
	L-metionin	M	Met
5	L-serin	S	Ser
	L-valin	V	Val
	L-aspargin	N	Asn
	L-asparginsyre	D	Asp
	L-glutaminsyre	E	Gln
10	L-histidin	H	His
	L-treonin	T	Thr
	L-fenylalanin	F	Phe
	L-nor-leucin	-	nLeu
	L-ornitin	-	Orn

15 DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Den foreliggende oppfinnelsen retter seg mot en rekonstituert surfaktant av den typen som er angitt i krav 1 og som omfatter en lipidbærer og en kombinasjon av særlige polypeptidanaloger av den opprinnelige surfaktantproteinet SP-C med særlige polypeptidanaloger av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-B inkludert

20 Mini-B peptidet og varianter derav.

Det har blitt funnet at, i en modell av RDS hvori den for tidlig fødte ble behandlet med eksogene surfaktantfremstillinger uten å påføre PEEP, en kombinasjon av polypeptid av generell formel (I), med et polypeptid av generell formel (II) som positiv forsterker virker på lungesamsvar.

25 Særlig ble kombinasjonen av de to polypeptidene funnet å virke på en synergistisk måte på lungegassvolumer som er en indeks på den alveolare åpenheten ved slutten av utånding.

Nevnte resultat viser at den rekonstituerte surfaktanten av oppfinnelsen er i stand til å stabilisere fosfolipidfilmen i alveolen ved slutten av utåndingen på bedre måte enn rekonstituert surfaktant omfattende kun en analog av proteinet SPC eller en

30 analog av protein SP-B.

Videre viste den krevde rekonstituerte surfaktantfremstillingen seg å forbedre åndedrettsfunksjonen som uttrykt ved de tidale volumene til en grad sammenlignbar, eller til og med noe bedre enn det oppnådd etter administrasjon av en modifisert naturlig surfaktant.

- 5 Fordelaktig er analogen av det opprinnelige proteinet SP-C et polypeptid på minst 20 aminosyreresiduer og ikke flere enn 40 aminosyreresiduer, som har sekvensen representert ved den generelle formelen (I)

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

hvor:

- 10 X er et aminosyreresidu uavhengig valgt fra gruppen bestående av I, L, og nL;

B er et aminosyreresidu uavhengig valgt fra gruppen bestående av K, W, F, Y, og Orn;

- S er et aminosyresidu eventuelt substituert med acyl grupper som inneholder 12-22 karbonatomer, foretrukket 16 karbonatomer, bundet til sidekjeden via en esterbinding;
- 15

Ω er et aminosyreresidu valgt fra gruppen bestående av M eller dens oksiderte form på svovelatomet, I, L, og nL;

a er et heltall som har en verdi i området fra 1 til 8;

b er et heltall som har en verdi i området fra 1 til 19;

- 20 c er et heltall som har en verdi uavhengig valgt fra 3 til 8;

e, f, g og p er heltall som har en verdi på 0 eller 1;

n er et heltall som har en verdi i område fra 0 til 3; og

med det forbehold at $X_a BX_b (BX_c)_n$ er en sekvens som har et maksimum på 22 aminosyrer, fortrinnsvis omfattet mellom 10 og 22 aminosyrer.

Fortrinnsvis består polypeptidet av generell formel (I) av minst 30 og ikke mer enn 35 aminosyrer, mer foretrukket ikke mer en 33 aminosyrer.

I særlige utførelsesformer består polypeptidene av generell formel (I) av 30 eller 33 eller 35 aminosyrer.

- 5 Foretrukket er polypeptidanalogen av SP-C-proteinet representert ved den generelle formelen (Ia) hvori e og n er 0 og g er 1.



hvori

X, B og Ω er som definert ovenfor;

- 10 a er fra 1 til 8, foretrukket fra 1 til 3; mer foretrukket 1;

b er fra 1 til 19, foretrukket fra 5 til 15; mer foretrukket 14;

f og p er 0 eller 1.

Mer foretrukket er polypeptidanalogen av SP-C proteinet representert ved den generelle formelen (Ib) hvori f er 1



hvori:

X, B, Ω , a og b er som definert ovenfor;

p er 0 or 1.

- 20 Enda mer foretrukket, er polypeptidanalogen av SP-C-proteinet representert ved den generelle formelen (Ic)



hvori:

Ω er som definer ovenfor

p er 0 eller 1

Eksempler på polypeptider av formel (Ic) er rapportert nedenfor:

- IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLMGL (Id) (SEKV ID :1)
 5 IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLIGL (Ie) (SEKV ID :2)
 IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLLGL (If) (SEKV ID :3)
 IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLnLGL (Ig) (SEKV ID :4)
 IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALL (Ih) (SEKV ID :5)

Polypeptidet (Id) har også blitt referert til i tidligere teknikk som SP-C33.

- 10 Mest foretrukket er SP-C-analogen et polypeptid valgt fra gruppen av polypeptider som har formlene (Ie), (If), (Ig) og (Ih).

I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen, er polypeptidet av generell formel (I) polypeptidet heretter referert til som SP-C33(Leu)³¹.

- Fordelaktig består analogen av det opprinnelige proteinet SP-B av to deler
 15 korresponderende til N-terminalresiduen 8-25 og til 63-78 C-terminaldelen av det opprinnelige SO-B-proteinet (referert til som Mini-B-peptid) eller en variant derav.

Mer fordelaktig er analogen av det opprinnelige proteinet SP-B et polypeptid representert ved den følgende generelle formelen (II):



- 20 hvori:

Δ er et aminosyreresidu valgt fra gruppen bestående av W og L;

Ω er et aminosyreresidu uavhengig valgt fra gruppen bestående av M, I, L, og nL;

- Φ is et aminosyreresidu valgt fra gruppen bestående av R og T, foretrukket R;
 25 og

f er et heltall som har en verdi på 0 eller 1.

I en særlig utførelsesform av oppfinnelsen er SP-B analogen et polypeptid representert av formel (IIa).

CWLCRALIKRIQAMIPKGGRMLPQLVCRLVLRCS (IIa) (SEKV ID :6)

- 5 I andre utførelsesformer av oppfinnelsen velges SP-B analogen fra de som har den følgende formelen

CLLCRALIKRIQAMIPKGGRMLPQLVCRLVLRCS (IIb) (SEKV ID :7)

CWLCRALIKRIQALIPKGGRLLPQLVCRLVLRCS (IIc) (SEKV ID :8)

CLLCRALIKRIQALIPKGGRLLPQLVCRLVLRCS (IId) (SEKV ID :9)

- 10 I en foretrukket utførelsesform kan polypeptidene (IIa), (IIb), (IIc) og (IId) være i formen av et disulfidbundet molekyl hvori det intramolekylære disulfidforbindelsen er mellom de to Cys-residuene i posisjon 1 og 33 og/eller mellom de to Cys-residuene i posisjon 4 og 27.

- 15 Det disulfidbundne polypeptidet (IIa) har blitt referert til i teknikken til oksidert Mini-B (ox Mini-B).

Polypeptidet (IIc) refereres heretter til som Mini-B (Leu) og det disulfidforbundne form som ox Mini-B(Leu).

- 20 Polypeptidene av generell formel (I) og (II) kan fremstilles i henhold til syntetiske fremgangsmåte eller rekombinante teknikker velkjente for personen med kjennskap til teknikken.

- 25 Et utmerket sammendrag av de mange teknikkene som er tilgjengelige kan bli funnet i J.M. Steward og J.D. Young, "Solid Fase Peptide Synthesis", W.H. Freeman Co., San Francisco, 1969, og J. Meienhofer, "Hormonal Proteins og Peptides", Vol.2, p. 46, Academic Press (New York), 1983 for fastfase peptidsyntese, og E. Schroder og K. Kubke, "The Peptides", Vol. 1, Academic Press (New York), 1965 for klassisk løsningssyntese. Polypeptidene ikke oppfinnelsen kan også fremstilles ved å anvende fastfase synteseteknikk opprinnelig beskrevet av Merrifield, i J. Am. Chem.

Soc. 85: 2149-2154 (1963). Andre polypeptidsynteseteknikker kan bli funnet, f.eks. i M. Bodanszky et al., Peptide Synthesis, John Wiley & Sons, 2d Ed., (1976) så vel som andre referansearbeider kjent for dem med kjennskap til teknikken.

Egnede beskyttende grupper for anvendelse i slike synteser vil bli funnet i tekstene
 5 ovenfor så vel som i J.F.W. McOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, New York, NY (1973).

F.eks. kan polypeptidene av den generelle formelen (I) fremstilles i henhold til fremgangsmåte beskrevet i WO 00/47623, mens polypeptidene av generell formel (II) kan bli fremstilt i henhold til fremgangsmåte rapportert i Waring AJ et al J
 10 Peptide Res 2005, 66, 364-374.

Den rekonstituerte surfaktanten av oppfinnelsen kan fremstilles ved å blande en løsning eller en suspensjon av polypeptidene av generell formel (I) og (II) og lipider og ved å etterfølgende tørke blandingen, ellers kan de fremstilles ved lyofilisering eller sprøytetørking.

15 Foretrukket er polypeptidene av generell formel (I) og polypeptidene av generell formel (II) til stede i de rekonstituerte surfaktantene av oppfinnelsen i en fastsatt mengde og kvantitativt forhold som en fastsatt sammensetning.

Proporsjonen av polypeptidene av generell formel (I) og (II) relative til surfaktanten kan variere. Fordelaktig kan hvert polypeptid være til stede i en
 20 mengde omfattende mellom 0,5 og 10 % basert på vekten av surfaktanten (w/w), fortrinnsvis mellom 1 og 5 %, mest foretrukket mellom 1 og 3 %.

I en foretrukket utførelsesform omfatter den rekonstituerte surfaktanten fra 1 til 3 vekt% av polypeptidet (If), fra 1 til 3 vekt% av polypeptidet (IIa), fortrinnsvis i oksidert form.

25 Fordelaktig omfatter lipidbæreren fosfolipidene som er inneholdt i naturlig lungesurfaktantfremstillinger, f.eks. fosfatidylkolin (PC) slik som dipalmitoylfosfatidylkolin (DPPC) og palmitoyloleoylfosfatidylkolin (POPC), og fosfatidylglyseroler (PG), slik som palmitoyloleoylfosfatidylgluserol (POPG) og dipalmitoylfosfatidylglyserol (DPPG).

Andre fosfolipider som fordelaktig kan anvendes, er fosfatidylinositoler (PI), fosfatidyletanomlaminer (PE), fosfatidylseriner og sfingomyeliner (SM).

I en særlig utførelsesform kan lipidbæreren omfatte ytterligere komponenter, f.eks. nøytrale lipider slik som triacylglyseroler, frie fettsyrer og/eller kolesterol.

- 5 Fordelaktig omfatter den rekonstituerte surfaktanten i henhold til oppfinnelsen 90 til 99 vekt% av en lipidbærer, fortrinnsvis 92 til 98 %, mer fortrinnsvis 94 til 96 %, og 1 til 10 vekt% av summen av begge peptider, fortrinnsvis 2 til 8 %, mer fortrinnsvis 4 til 6 %.

- 10 I én av utførelsesformene av oppfinnelsen omfatter den rekonstituerte surfaktanten 96 vekt% av en lipidbærer, 2 vekt% av et polypeptid av generell formel (I) og 2 vekt% av et polypeptid av generell formel (II).

- 15 I en særlig utførelsesform består lipidet båret kun av fosforipider mer foretrukket en blanding av DPPC og et palmitoyloleylfosfolipid valgt fra POPG eller en blanding derav med POPC i vektforhold som strekker seg fra 95:5 til 50:50, fortrinnsvis fra 80:20 til 60:40.

Vektforholdet mellom DPPC og POPG strekker seg fortrinnsvis fra 75:25 til 65:35, og er mer foretrukket 68:31. I tilfellet av DPPC:POPG:POPC blandinger, er fosfolipidene fortrinnsvis anvendt i vektforhold på 60:20:20 eller 68:15:16.

I en annen utførelsesform kan lipidbæreren bestå av DPPC, DPPG og kolesterol.

- 20 I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen omfatter den rekonstituerte surfaktanten fra 1 til 5 vekt% av én av polypeptidene av generell formel (Ia), fra 1 til 5 vekt% av én av polypeptidene av generell formel (II) og en blanding av DPPC og POPG i et vektforhold på 68:31.

- 25 Administrasjon av den rekonstruerte surfaktanten av oppfinnelsen utføres på en måte kjent for personen med kjennskap til teknikken, fortrinnsvis ved intratrakeal installasjon (infusjon eller pille) eller ved forstøving.

Den foreliggende oppfinnelsen angår også farmasøytiske sammensetninger omfattende den rekonstituerte surfaktanten av oppfinnelsen. Nevnte sammensetning administreres fordelaktig i formen av en løsning, dispersjon,

suspensjon eller tørt pulver. Foretrukket omfatter nevnte sammensetninger den rekonstituerte surfaktanten oppløst eller suspendert i en passende løsemiddel eller resuspensjonsmedium.

Foretrukket tilføres nevnte farmasøytiske sammensetninger som suspensjon i en
 5 buffret fysiologisk salin vandig løsning i engangsglassampuller. Fordelaktig er den rekonstituerte surfaktantkonsentrasjonen (uttrykt som fosfolipidinnhold) i området fra omtrent 2 til omtrent 160 mg av surfaktant per ml, fortrinnsvis mellom 10 og 100 mg/ml, mer foretrukket mellom 20 og 80 mg/ml.

Nevnte sammensetninger kan ytterligere omfatte elektrolytter, slik som kalsium,
 10 magnesium og/eller natriumsalter, fortrinnsvis kalsiumklorid.

De farmasøytiske sammensetningene i henhold til oppfinnelsen er egnet for profylaksen og/eller behandlingen av akutt lungesviktssyndrom (RDS) i for tidlig fødte babyer eller andre sykdommer relatert til en surfaktantsvikt eller dysfunksjon inkludert RDS i voksne (ARDS), mekoniumaspirasjon-syndrom (MAS), og
 15 bronkopulmonar dysplasi (BPD).

Det kan også være anvendelig i profylaksen og/eller behandlingen av andre åndedrettslidelser slik som lungebetennelse, bronkitt, COPD (kronisk obstruktiv lungesykdom), astma og cystisk fibrose så vel som for behandlingen av seriøs ørebetennelse (glue ear).

20 De følgende eksemplene illustrerer oppfinnelsen i mer detalj.

EKSEMPLER

Eksempel 1 - Syntese og rensing av polypeptider SP-C33(Leu)³¹ og SP-C33.

Polypeptidet SP-C33(Leu)³¹ ble fremstilt ved standard SPPS (Fastfase peptidsyntese) fremgangsmåter basert på Fmoc-kjemi og etterfølgende TFA-spaltninger.
 25

Totalt ble 186,0 g av råmaterialet SP-C33(Leu)³¹ oppnådd.

Polypeptidet ble rensed ved å utsette materialet til motstrømdistribusjon (CCD) ved å anvende H₂O/n-BuOH/AcOEt/AcOH 4:1:4:1 som bifasisk løsemiddelsystem.

Rensingen ga 78,9 g av SP-C33(Leu)³¹ med en renhet på > 60 %.

Den endelige rensingen ble utført ved preparativ HPLC ved å anvende PLRP-S som stasjonær fase i en stålkolonne på 50 x 300 mm ved å anvende en lineær gradient på 25 % B til 100 % B i 75 minutter. Den mobile fasen besto av buffer A = 0,1 %
 5 TFA i ACN/H₂O 1:4 og buffer B = 0.1% TFA i IPA.

Det rensede polypeptidet ble løst i 90 % AcOH og passert gjennom en kolonne pakket med Dowex ionebytterresin (acetatform) for å gi, etter lyofilisering, 5,8 g (= 5,4 %) av sluttproduktet som acetatet.

Polypeptidet SP-S33 ble fremstilt på analog måte.

10 **Forkortelser**

ACN Acetonitril

AcOEt Etylacetat

AcOH Eddiksyre

Boc t-Butyloksykarbonyl

15 n-BuOH n-Butanol

Fmoc 9-Fluorenylmetyloksykarbonyl

IPA Isopropylalkohol

TFA Trifluoreddiksyre

20 **Eksempel 2- Syntese og rensning av polypeptider ox Mini-B(Leu) og ox-Mini-B.**

Polypeptidet ox-Mini-B(Leu) ble fremstilt ved standard SPPS (Fastfase peptidsyntese) fremgangsmåter basert på Fmoc-kjemi og etterfølgende TFA-spaltninger.

Det urene polypeptidet ble rensset ved preparativ HPLC ved å anvende et TFA-system og isolert ved lyofilisering.

Luftoksidering av det rensede peptidet ga den monosykliske sekvensen med disulfidbåndet mellom Cys¹ og Cys³³. Det monosykliske peptidet ble rensset med
5 preparativ HPLC ved å anvende et TFA-system og isolert ved lyofilisering.

Den andre disulfidbroen mellom Cys⁴ og Cys²⁷ ble dannet ved å anvende jod.

Etter oksidering, ble produktet rensset med preparativ HPLC ved å anvende et TFA-system og isolert ved lyofilisering. 1,12 g (= 1,7 %) av sluttforbindelsen ble isolert med en renhet på > 89 %.

10 Polypeptidet ox Mini-B ble fremstilt på en analog måte.

Eksempel 3 - In vivo eksperimenter med en rekonstituert surfaktant basert på ox Mini-B og SP-C33

Surfaktantfremstillingene ble undersøkt i premature nyfødte kaniner, oppnådd ved hysterektomi ved gestasjonsalder på 27 dager. Eksperimentene ble utført uten å
15 påføre positivt sluttåndedrettstrykk (PEEP).

Som SP-C analog, ble polypeptidet referert til som SP-C33 anvendt slik som fremstilt i henhold til eksempel 1.

Som analog av proteinet ble SP-B, oksidert Mini-B (ox Mini-B) anvendt slik som fremstilt i henhold til eksempel 2.

20 Dyrene ble behandlet ved fødselen med rekonstituerte surfaktantfremstillinger inneholdende, som lipidbærer, fosfolipidblandingen DPPC:POPG i forholdet 68:31 w/w. Fosfolipidene ble blandet med 2 eller 4 % w/w SPC-33, 2 % w/w ox Mini-B eller 2 % w/w SPC-33 pluss 2 % w/w ox Mini-B.

Dyr som mottok den samme dosen av Curosurf[®] tjente som positive kontroller og
25 ikke-behandlede dyr fra samme kull som negativ kontroll.

Alle surfaktantfremstillinger ble administrert ved en konsentrasjon på 80 mg/ml og ved en samme standarddose på 2,5 ml/kg.

De for tidlig fødte kaninene ble ventilert parallelt med en standardisert sekvens av toppinsufflasjonstrykk. For å åpne lungene ble trykk først satt til 35 cm H₂O i 1 minutt. Etter denne rekrutteringsmanøveren ble trykket senket til 25 cm H₂O i 15 minutter og videre til 30 og 15 cm H₂O. Til slutt ble trykket igjen økt til 25 cm H₂O i 5 minutter, etter hvilket lungene ble ventilert i ytterligere 5 minutter med nitrogen og deretter skåret bort for gassvolummålinger.

Begge lungegassvolumer og tidale volumer uttrykt som ml/kg ble målt og resultatene, gitt som medianverdier, rapporteres i henholdsvis figurer 3 og 4.

Fra fig. 3 kan det observeres at dyr behandlet med den rekonstituerte surfaktantfremstillingen inneholdende 2 % w/w ox Mini-B hadde lavere lungegassvolumer enn dyr som mottok 2% w/w SP-C33 (omtrent 2 ml/kg vs omtrent 4 ml/kg).

Tilsetning av 2% w/w ox Mini-B til SP-C33-surfaktant ga en signifikant større stigning i lungegassvolumer enn hvilket som helst peptid alene (8 ml/kg vs omtrent 6 ml/kg).

Som vist i fig. 3 ble en lignende tendens observert for de tidale volumene og, etter administrasjon av peptidene i kombinasjon, en forbedring sammenlignbar eller til og med noe bedre enn den oppnådd etter administrasjon med Curosurf®.

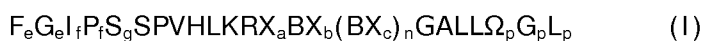
Det har også blitt funnet at økning av SP-C33-innhold danner 2 til 4 % w/w ikke økte lungegassvolumene noe som indikerer at den stabiliserende effekten av fosfolipidfilmen i alveoli ved slutten av utånding skyldes tilsetningen av ox Mini-B.

Nevnte resultat viser at den rekonstituerte surfaktanten ifølge oppfinnelsen er i stand til å stabilisere fosfolipidfilmen i alveolen ved slutten av utånding på en bedre måte enn rekonstituert surfaktant omfattende kun det analoge av proteinet SP-C eller en analog av proteinet SP-B.

Videre viste den krevde rekonstituerte surfaktantfremstillingen seg å forbedre åndedrettsfunksjonen som uttrykt ved de tidale volumene i en utstrekning som er sammenlignbar eller til og med noe bedre enn den oppnådd etter administrasjon av en modifisert naturlig surfaktant.

KRAV

1. Rekonstituert surfaktant omfattende en blanding av fosfolipider og en kombinasjon av en polypeptidanalogue av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-C med en polypeptidanalogue av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-B
- 5 hvori nevnte polypeptidanalogue av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-C er et polypeptid på minst 20 aminosyreresiduer og ikke flere enn 40 aminosyreresiduer som har sekvensen representert av den generelle formelen (I)



hvor:

- 10 X er et aminosyreresidu uavhengig valgt fra gruppen bestående av I, L, og nL;

B er et aminosyreresidu uavhengig valgt fra gruppen bestående av K, W, F, Y, og Orn;

- S er et aminosyreresidu eventuelt substituert med acyl-grupper inneholdende 12-22 karbonatomer, fortrinnsvis 16 karbonatomer, forbundet til sidekjeden via en esterbinding;
- 15

Ω er et aminosyreresidu valgt fra gruppen bestående av M eller dens oksidert form på svovelatomet I, L, og nL;

a er et heltall som har en verdi i området fra 1 til 8;

b er et heltall som har en verdi i området fra 1 til 19;

- 20 c er et heltall som har en verdi uavhengig valgt fra 3 til 8;

e, f, g og p er heltall med en verdi på 0 eller 1;

n er et heltall som har en verdi i området fra 0 til 3;

med det forbehold at $X_a B X_b (B X_c)_n$ er en sekvens som har et maksimum på 22 aminosyrer; og

hvor i nevnte polypeptidanalogue av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-B er et polypeptid av generell formel (II):



hvor i:

5 Δ er et aminosyreresidu valgt fra gruppen bestående av W og L;

Ω er et aminosyreresidu uavhengig valgt fra gruppen bestående av M, I, L, og nL;

Φ er et aminosyreresidu uavhengig valgt fra gruppen bestående av R og T; og

f er et heltall som har en verdi på 0 eller 1.

10 2. Rekonstituert surfaktant i henhold til krav 1 hvor i Φ er R.

3. Rekonstituert surfaktantsammensetning i henhold til kravene 1 eller 2, hvor i analogen av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-C og analogen av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-B er til stede i en fastsatt kombinasjon.

15 4. Rekonstituert surfaktantsammensetning i henhold til ethvert av kravene 1 til 3, hvor i polypeptidet (II) er i form av et disulfidbundet molekyl med den intramolekylære disulfidforbindelsen mellom de to Cys-residuene i posisjon 1 og 33 og/eller mellom de to Cys-residuene i posisjon 4 og 27.

20 5. Rekonstituert surfaktantsammensetning i henhold til ethvert av kravene 1 til 3, hvor i analogen av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-B representeres ved den generelle formelen (IIa)



6. Rekonstituert surfaktant i henhold til krav 5, hvor i analogen av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-C representeres ved den generelle formelen (Ia)

21



hvori

X , B og Ω er som definert ovenfor;

a er fra 1 til 8, foretrukket fra 1 til 3; mer foretrukket 1;

5 b er fra 1 til 19, foretrukket fra 5 til 15; mer foretrukket 14; og

f og p er 0 eller 1.

7. Rekonstituert surfaktantsammensetning i henhold til krav 6, hvori analogen av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-C representeres av den generelle formelen (Ib)



hvor:

X, B, Ω, a og b er som defineret ovenfor; og

p er 0 eller 1.

8. Rekonstituert surfaktantsammensetning i henhold til krav 7, hvori analogen
15 av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-C representeres av den generelle
formelen (Ic)



hvor:

Ω er som definert ovenfor; og

20 p er 0 eller 1.

9. Rekonstituert surfaktantsammensetning i henhold til krav 8, hvori analogen av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-C velges fra gruppen bestående av:



22

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLLGL (If)

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLnLGL (Ig)

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALL (Ih)

10. Rekonstituert surfaktant i henhold til krav 1, hvori polypeptidanalogen av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-C er

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLLGL (If)

og polypeptidanalogen av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-B er

CWLCRALIKRIQAMIPKGGRMLPQLVCRLVLRCS (IIa)

11. Rekonstituert surfaktant i henhold til krav 1, hvori polypeptidanalogen av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-C er

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALLLGL (If)

og polypeptidanalogen av det opprinnelige surfaktantproteinet SP-B er

CWLCRALIKRIQALIPKGGRLLPQLVCRLVLRCS (IIc)

12. Rekonstituert surfaktant i henhold til ethvert av de foregående krav, hvori fosfolipidblandingen omfattes av dipalmitoylfosfatidylkolin (DPPC) og et palmitoyloleoylfosfolipid valgt fra palmitoyloleoylfosfatidylglyserol (POPG) eller en blanding derav med palmitoyloleoylfosfatidylkolin (POPC) i vektforhold som strekker seg fra 95:5 til 50:50.

13. Rekonstituert surfaktant i henhold til krav 12, hvori fosfolipidblandingen omfatter DPPC og POPG i et vektforhold på 68:31.

14. Farmasøytisk sammensetning omfattende den rekonstituerte surfaktanten i henhold til ethvert av kravene 1 til 13.

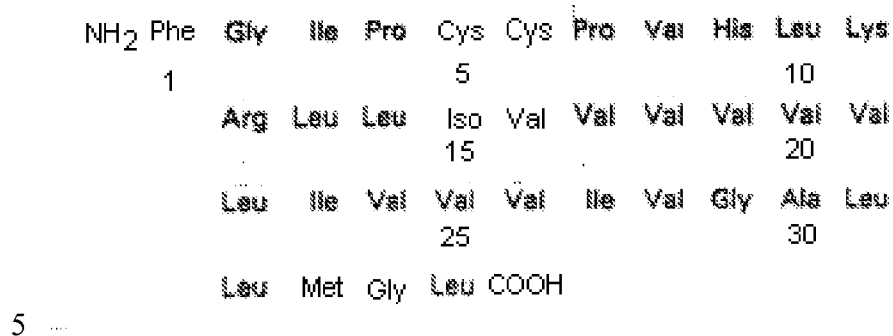
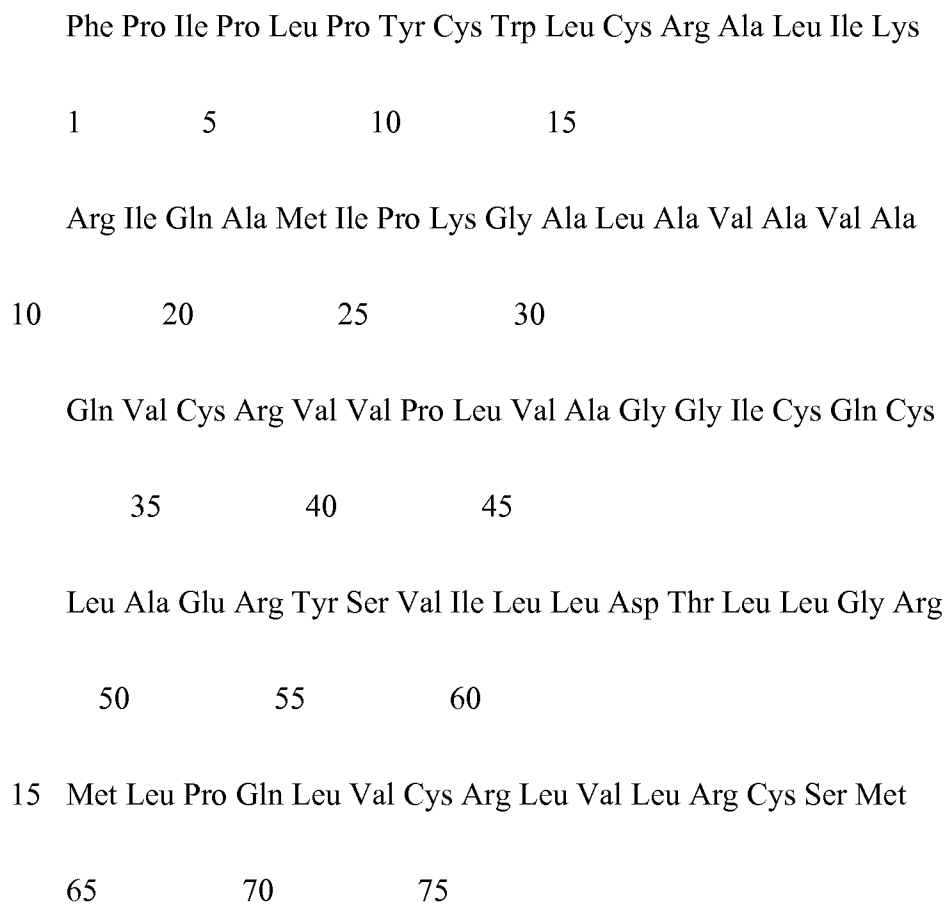
15. Farmasøytisk sammensetning i henhold til krav 14 i form av enten en løsning, eller dispersjon, eller suspensjon eller tørt pulver

16. Farmasøytisk sammensetning i henhold til krav 15, i form av en vandig løsning.

17. Farmasøytisk sammensetning i henhold til krav 16, omfattende den rekonstituerte surfaktanten i en konsentrasjon omfattende mellom 2 og 160 mg/ml.

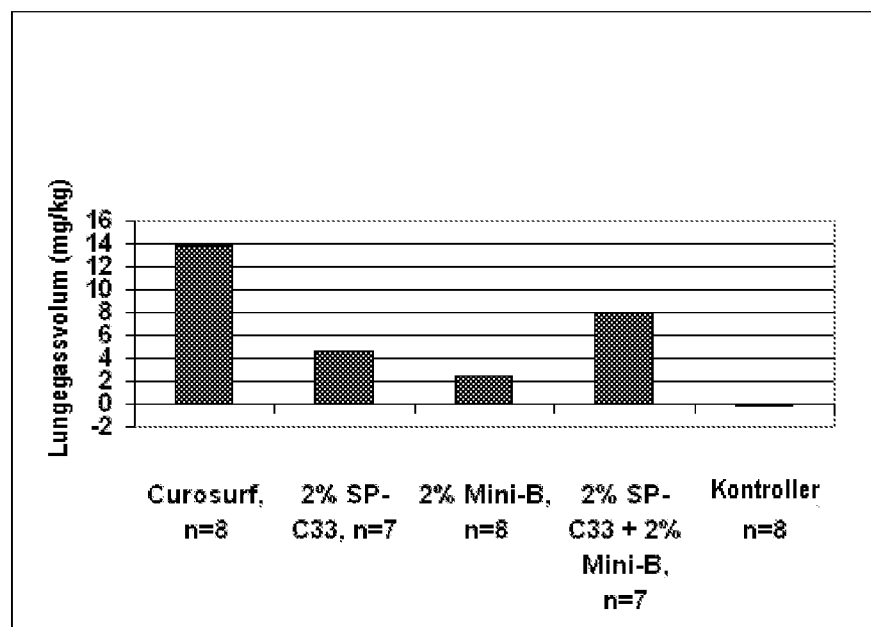
18. Farmasøytisk sammensetning i henhold til krav 17, hvori konsentrasjonen av den rekonstituerte surfaktanten omfatter mellom 20 og 80 mg/ml.
19. Anvendelse av en rekonstituert surfaktant i henhold til ethvert av kravene 1 til 13, for fremstilling av et medikament til behandling eller profylaks av akutt
5 lungesviktsyndrom (RDS) i for tidlig fødte babyer eller i behandlingen eller profylakse av andre sykdommer forbundet med surfaktantsvikt eller dysfunksjon.
20. Anvendelse i henhold til krav 19, hvori sykdommer forbundet med en surfaktantsvikt eller dysfunksjon inkluderer RDS i voksne (ARDS) mekoniumaspirasjonssyndrom (MAS), og bronkopulmonal dysplasi.

1/2

Figur 1**Figur 2**

2/2

Figur 3



5 Figur 4

