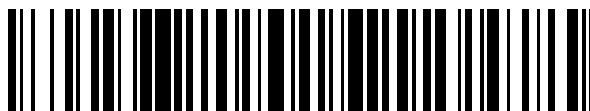


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 286**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 31/683 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2011 E 11746932 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2538960**

54 Título: **Composiciones de tensioactivo que comprenden complejos polipéptidos**

30 Prioridad:

10.12.2010 ZA 201008905

27.02.2010 ZA 201007800

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

04.10.2016

73 Titular/es:

**STELLENBOSCH UNIVERSITY (100.0%)
4th Floor, Admin B Victoria Street
Stellenbosch7600 Western Cape Province, ZA**

72 Inventor/es:

**SMITH, JOHAN;
VAN ZYL, JOHANN, MARTIN;
VAN DER BIJL, PIETER y
HAWTREY, ARTHUR, OWEN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 585 286 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

Composiciones de tensioactivo que comprenden complejos polipéptidos

5 Esta invención se refiere a una composición de tensioactivo y a su uso para tratar o prevenir una o más enfermedades o afecciones relacionadas con la disfunción o deficiencia del tensioactivo pulmonar, para aumentar la permeabilidad de membranas o para actuar como vehículo farmacológico de compuestos farmacéuticos para el uso en el tratamiento de otras enfermedades o afecciones.

Antecedentes de la invención

10 Los tensioactivos pulmonares se hallan en la superficie alveolar, y son esenciales para la respiración. Consisten de una mezcla compleja de fosfolípidos (85%), lípidos neutros (5%), y varias proteínas tensioactivas específicas (5%) que reducen la tensión superficial en la superficie alveolar, lo que permite un intercambio gaseoso rápido. Las propiedades de difusión únicas del tensioactivo pulmonar reducen la tensión superficial, por lo que se favorece la expansión pulmonar (también conocida como distensibilidad) durante la inspiración, y se evita el colapso pulmonar durante la espiración.

15 Sin tensioactivo, los sacos alveolares o alveolos de los pulmones se colapsan y son incapaces de absorber suficiente oxígeno. Esto se puede manifestar como una inhibición del intercambio de gases en los pulmones, que provoca una afección conocida como enfermedad de la membrana hialina (EMH), también conocida como síndrome de dificultad respiratoria (SDR). Esta afección se da con más frecuencia en recién nacidos prematuros, pero también se da a menudo en niños mayores y en adultos. Los niños mayores y los adultos pueden presentar una amplia gama de afecciones pulmonares que incluyen, pero sin limitación, intoxicación por hidrocarburos (p.ej., parafina), casi-ahogamiento, enfermedades pulmonares relacionadas con el VIH/SIDA, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA) o lesión pulmonar aguda (LPA), asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), tuberculosis (TB), y síndrome respiratorio agudo grave (SRAG).

20 La observación de que los recién nacidos prematuros con SDR padecen una deficiencia del material tensioactivo alveolar condujo al tratamiento de la afección con sustitutos exógenos del tensioactivo, y en la actualidad hay disponibles comercialmente diversos tensioactivos pulmonares, tales como los enumerados a continuación en la Tabla 1. Estos incluyen tensioactivos derivados de mamíferos o naturales, que contienen proteínas tensioactivas y mezclas de lípidos sin proteínas sintéticas:

Tabla 1: Una selección de tensioactivos pulmonares disponibles comercialmente

Nombre genérico	Nombre comercial	Fabricante
Beractant	Survanta [®]	Abbott Laboratories (EE.UU.)
Surfactant-TA	Surfacten [®]	Tokoyo Tanabe (Japón)
Tensioactivo porcino	Curosurf [®]	Chiesi Pharmaceuticals (Italia)
Tensioactivo pulmonar de ternero (CLSE)	Infasurf [®]	Forest Laboratories (EE.UU.)
SF-RI 1	Alveofact [®]	Boehringer (Alemania)
Compuesto de expansión pulmonar artificial (ALEC)	Pneumactant [®]	Britannia Pharmaceuticals (R.U.)
Palmitato de colfoscerilo, hexadecanol, tiloxapol	Exosurf [®]	Glaxo Wellcome Co (EE.UU.)

30 El tensioactivo derivado de mamíferos, también denominado en la presente memoria tensioactivo pulmonar nativo o natural, consiste principalmente en fosfolípidos, y el fosfolípido principal es dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC). También incluye fosfatidil glicerol (PG) y las proteínas tensioactivas (SP) A, B, C, y D. La formación de mielina tubular, que es la forma extracelular *in vivo* activa del tensioactivo pulmonar nativo, requiere la presencia de DPPC, PG, SP-A, SP-B, y calcio. Se cree que SP-B y SP-C ayudan a los tensioactivos naturales a manifestar un comportamiento superficial *in vivo* e *in vitro* superior (Dizon-Co *et al* 1994). De los diversos componentes proteicos del tensioactivo pulmonar, SP-B parece tener una función esencial en el mantenimiento de la expansión alveolar. De hecho, se ha demostrado que simplemente complementando los fosfolípidos artificiales con SP-B y/o SP-C hidrófobos, de fuentes nativas o recombinantes, da como resultado una función *in vivo* e *in vitro* mejorada (Dizon-Co *et al* 1994; Ikegami y Jobe 1998; Davis *et al* 1998). Se ha demostrado que la ausencia de SP-B da como resultado una deficiencia de SP-C, y también provoca una insuficiencia respiratoria letal en recién nacidos a término (Nogee *et al* 1993; Clark *et al* 1995).

Los tensioactivos derivados de mamíferos han estado disponibles durante muchos años, pero son caros y su

aplicación terapéutica se ha centrado en el uso en la existencia de EMH/SDR en recién nacidos prematuros. Estas formulaciones tensioactivas contienen normalmente proteínas derivadas de fuentes bovinas o porcinas, y por lo tanto plantean un riesgo potencial por la transmisión de patógenos asociados a animales y respuestas alérgicas.

5 Los tensioactivos lipídicos sintéticos iniciales sin proteínas, tales como Exosurf[®], han demostrado una eficacia inferior en experimentos en animales y en ensayos en recién nacidos humanos, en comparación con las formulaciones tensioactivas que contienen proteínas (Grossman *et al* 1984; Cummings *et al* 1992; Halliday 1997; Ainsworth *et al* 2000). Los tensioactivos sintéticos posteriores, tales como Lucinactant (Surfaxin[®], Discovery Laboratories, Filadelfia), que contienen sinapultida KL4, han demostrado una eficacia superior con respecto al riesgo de mortalidad, enfermedad pulmonar crónica y otras morbilidades asociadas a la prematuridad en recién nacidos que tienen EMH/SDR o que corren el riesgo de desarrollar la afección. Sin embargo, en dos ensayos en los que se compararon dichos tensioactivos sintéticos que contiene proteínas con un extracto de tensioactivo derivado de animales, no se observó ninguna diferencia estadística en cuanto a muerte o enfermedad crónica (Cochrane Syst Review, 2007). Además, Lucinactant es un gel a temperatura ambiente, y se debe calentar antes de usarlo para que esté en forma líquida. Lucinactant todavía no ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento en EMH/SDR neonatal.

La eficacia de las preparaciones actuales disponibles comercialmente se ha estudiado en modelos animales de SDR y en ensayos clínicos que implicaron a recién nacidos humanos con la misma afección. En conjunto, las formulaciones sintéticas sin proteínas disponibles demuestran una eficacia inferior *in vivo* en comparación con la de las formulaciones naturales que contienen proteínas. Sin embargo, se ha cuestionado la seguridad de los tensioactivos que contienen proteínas exógenas. Las desventajas adicionales de las preparaciones tensioactivas derivadas de tejidos animales incluyen la complejidad de los procesos necesarios de fabricación y de esterilización. Los tensioactivos reconstituidos incluyen en general proteínas hidrófobas añadidas, aisladas de tejidos animales u obtenidas por medio de técnicas recombinantes, o derivados peptídicos sintéticos de tales proteínas. Las propiedades y la actividad de los tensioactivos reconstituidos, por lo tanto, depende en gran medida no solamente de la composición de la mezcla de fosfolípidos, sino también de los componentes de péptidos/proteínas.

La solicitud de patente de EE.UU. N° 2008/069778A1 de Pargaonkar describe microesferas de fosfolípidos encapsulados en polímeros formadas de capas de poli-L-lisina y poli-ácido L-glutámico; Pilbat *et al.* (Langmuir 2007, 23, 8236-8242) describe barreras similares a biomembranas que se forman a partir de capas de poli-L-lisina y poli-ácido L-glutámico; Ciobanu *et al.* (International Journal of Pharmaceutics 344, 2007, 154-157) se refiere a liposomas convencionales que están revestidos con capas alternas de poli-L-lisina y poli-ácido L-glutámico; y Matsumura *et al.* (Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 92, 1994, 87-93) se refiere a liposomas que están revestidos de diversas concentraciones de poli-L-lisina o poli-ácido L-glutámico, pero no ambos. Sin embargo, ninguno de los documentos mencionados anteriormente describe un complejo preformado de estos péptidos.

Por lo tanto, existe la necesidad de una composición de tensioactivo pulmonar sintético que tenga propiedades tensioactivas equivalentes a las del tensioactivo natural.

Sumario de la invención

Según una primera realización de la invención, se proporciona una composición que comprende:

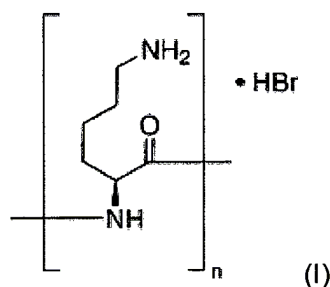
un vehículo lipídico; y un complejo peptídico de

poli-L-lisina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y

40 poli-ácido L-glutámico o poli-ácido L-aspártico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

en la que el complejo peptídico tiene una región de carga neutralizada y una región cargada positivamente.

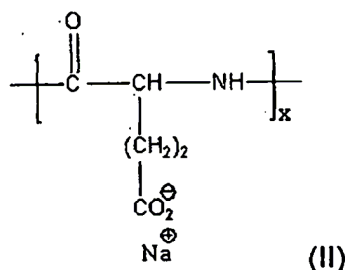
La sal de poli-L-lisina puede ser poli-L-lisina.HBr, y preferiblemente tiene la fórmula (I), en la que n oscila de alrededor de 100 a alrededor de 135, de alrededor de 103 a alrededor de 135, o de alrededor de 103 a alrededor de 119:



45

La sal de poli-ácido L-glutámico puede ser la sal sódica de poli-ácido L-glutámico, que tiene preferiblemente la

fórmula (II), en la que x es al menos 50, al menos 68 o al menos 86:



5 La cadena de poli-L-lisina o la sal de la misma puede ser más larga que las cadenas de poli-ácido L-glutámico o poli-ácido L-aspartico o la sal de los mismos en al menos 17 residuos, en al menos 50 residuos o en al menos 85 residuos. Por ejemplo, la cadena de poli-L-lisina o la sal de la misma puede ser más larga en alrededor de 17 a 49 residuos, alrededor de 50 a 85 residuos o alrededor de 35 a 67 residuos.

El vehículo lipídico puede comprender uno o más de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilglicerol (1,2-Diacil-sn-glicero-3-fosfo-[1-rac-glicerol]) (PG), hexadecanol, colesterol, tiloxapol o cloruro sódico.

Por ejemplo, la composición puede comprender lo siguiente:

- 10 dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC);
 fosfatidilglicerol (PG);
 hexadecanol;
 tiloxapol;
 poli-L-lisina.HBr;
- 15 sal sódica de poli-ácido L-glutámico; y
 cloruro sódico.

La composición puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 La composición se usa en general para prevenir o tratar una enfermedad o afección relacionada con la disfunción o deficiencia del tensioactivo pulmonar, tal como la enfermedad de la membrana hialina (EMH), síndrome de dificultad respiratoria (SDR), intoxicación por hidrocarburos, casi-ahogamiento, enfermedades pulmonares relacionadas con el VIH/SIDA, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA) o lesión pulmonar aguda (LPA), asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), tuberculosis (TB) o síndrome respiratorio agudo grave (SRAG).

25 De manera alternativa, la composición se puede usar para incrementar la permeabilidad de un compuesto o composición farmacéutica a través de una membrana de un sujeto o para actuar como un vehículo farmacológico. El compuesto farmacéutico, composición o fármaco puede ser, pero sin limitación, un agente antineoplásico, antiinflamatorio, agente inmunosupresor, agente antidiurético, péptido portador, péptido microbicida, inhibidor de ACTH, análogo de cortisol o agente para terapia de sustitución de hormonas, y se puede administrar de manera concurrente con la composición descrita anteriormente, o se puede incluir en ella.

30 La composición puede ser adecuada para la administración mediante inhalación, intubación o administración pulmonar directa.

Según una realización adicional de la invención, se proporciona un método para la fabricación de la composición descrita anteriormente, y el método comprende las etapas de:

- mezclar dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), hexadecanol, y fosfatidilglicerol (PG) en un disolvente orgánico;
 eliminar el disolvente orgánico y obtener una película de fosfolípidos;
- 35 mezclar, en una disolución acuosa, poli-L-lisina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y poli-ácido L-glutámico o poli-ácido L-aspartico, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y obtener un complejo peptídico;
 añadir el complejo peptídico a la película de fosfolípidos;
 agitar la mezcla, y

añadir tiloxapol.

Breve descripción de las figuras

- 5
Figura 1: es un gráfico de la elipticidad molar (mdeg) frente a la longitud de onda (nm) que muestra el espectro de dicroísmo circular (DC) del complejo de poli-L-lisina y poli-ácido L-glutámico como se describe en el Ejemplo 1;
- Figura 2: es un gráfico de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ frente al tiempo (min) que muestra el perfil de oxigenación de conejos tratados con la composición del Ejemplo 1, exosurf genérico (EG), o EG y Ca^{2+} como se describe en el Ejemplo 2, $p: = 6,6 \times 10^{-6}$ para los conjuntos de datos A y C; $p: = 0,0002$ para los conjuntos de datos C y B, y $p: = 0,04$ para los conjuntos de datos A y B;
- 10
Figura 3: es un gráfico de barras que muestra el efecto de la sustitución del tensioactivo pulmonar sobre el grosor del tabique (Tsept) (μm) en $n= 6$ corderos tratados con EG, EG y Ca^{2+} (EG + Ca), o la composición de la invención como se describe en el Ejemplo 2;
- Figura 4: es un gráfico de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ frente al tiempo (min) que muestra el perfil de oxigenación sistémica media de $n= 6$ corderos tratados con la composición de la invención y Survanta[®], como se describe en el Ejemplo 3, $p: = 0,936$;
- 15
Figura 5: es un gráfico de $\log_e \text{PaO}_2$ frente al tiempo (min) que muestra las medias observadas y las medias de las curvas ajustadas de $n= 6$ corderos tratados con la composición de la invención y Survanta[®], como se describe en el Ejemplo 3;
- Figura 6: es un gráfico de la distensibilidad respiratoria (Cdyn/kg) a lo largo del tiempo (min) en los $n= 6$ corderos tratados con la composición de la invención y Survanta[®] como se describe en el Ejemplo 3 ($p = 0,242$);
- 20
Figura 7: es una representación de regresión de la oxigenación sistémica (PaO_2 en mmHg) frente a la distensibilidad respiratoria dinámica (Cdyn/kg) en los $n= 6$ corderos tratados con la composición de la invención y Survanta[®] como se describe en el Ejemplo 3;
- Figura 8: es un gráfico de PaO_2 (mmHg) frente al tiempo (min) que muestra una comparación de la oxigenación entre la composición de la invención, Survanta[®] modificado, Survanta[®] bovino; tensioactivo pulmonar de oveja, Survanta[®] (este estudio);
- 25
Figura 9: es un gráfico de la composición de la invención y los datos de distensibilidad respiratoria dinámica media de Survanta[®] frente al tiempo (min) que muestra las medias observadas y las medias de las curvas ajustadas de $n= 6$ corderos tratados con la presente composición y Survanta[®], como se describe en el Ejemplo 3;
- 30
Figura 10: es un gráfico de Pa_2/FiO_2 a lo largo del tiempo (min) que muestra el perfil de oxigenación de los corderos tratados con la composición de la invención, Curosurf[®] o solución salina como se describe en el Ejemplo 3;
- Figura 11: es un gráfico del índice de oxigenación ($\text{cm H}_2\text{O}/\text{kPa}$) a lo largo del tiempo (min) de los corderos tratados con la composición de la invención, Curosurf[®], o solución salina como se describe en el Ejemplo 3;
- 35
Figura 12: es un gráfico del volumen corriente (Vte) (ml/kg) a lo largo del tiempo (min) de los corderos tratados con la composición de la invención, Curosurf[®], o solución salina como se describe en el Ejemplo 3;
- Figura 13: es un gráfico de la presión de dióxido de carbono arterial (PaCO_2) a lo largo del tiempo, que muestra el perfil de PaCO_2 de los corderos tratados con la composición de la invención, Curosurf[®] o solución salina como se describe en el Ejemplo 3;
- 40
Figura 14: es un gráfico de la distensibilidad respiratoria dinámica (cdyn/kg) a lo largo del tiempo (min) en los corderos tratados con la composición de la invención, Curosurf[®] o solución salina como se describe en el Ejemplo 3;
- Figura 15: es un gráfico que muestra los valores de flujo medio de arecolina en presencia de la composición de la invención y Exosurf[®] a través de tejido pulmonar porcino;
- 45
Figura 16: es un gráfico que muestra los valores de flujo medio de arecolina en presencia de la composición de la invención y Exosurf[®] a través de tejido de mucosa vaginal humana;
- Figura 17: es un gráfico que muestra los valores de flujo medio de estradiol en presencia de la composición de la invención y Exosurf[®] a través de tejido pulmonar porcino;
- 50

Figura 18: es un gráfico que muestra los valores de flujo medio de arecolina en presencia de la composición de la invención y Exosurf[®] a través de tejido de mucosa bucal porcina;

Figura 19: es un gráfico que muestra los valores de flujo medio de arecolina en presencia de la composición de la invención, Curosurf[®], y Survanta[®] a través de tejido pulmonar porcino;

5 Figura 20: es un gráfico que muestra los valores de flujo medio de estradiol en presencia de la composición de la invención a través de tejido de arteria pulmonar porcina;

Figura 21: es un gráfico que muestra los valores de flujo medio de vasopresina en presencia de la composición de la invención a través de tejido de arteria pulmonar porcina;

10 Figura 22: es un gráfico que muestra los valores de flujo medio de dexametasona en presencia de la composición de la invención a través de tejido pulmonar porcino;

Figura 23: es un gráfico que muestra los valores de flujo medio de hidrocortisona en presencia de la composición de la invención a través de tejido pulmonar porcino; y

Figura 24: es un gráfico que muestra los valores de flujo medio de MDY-19 marcado con FITC en presencia de la composición de la invención a través de tejido de mucosa vaginal humana.

15 Descripción detallada de la invención

En la presente memoria se describe una composición que comprende un vehículo lipídico y un complejo peptídico formado por dos polipéptidos. El primer polipéptido es poli-L-lisina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y el segundo polipéptido es poli-ácido L-glutámico o poli-ácido L-aspartico, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

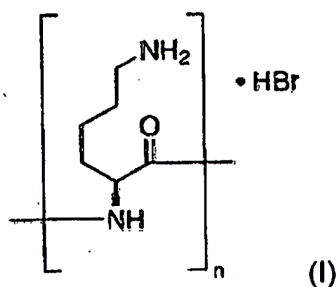
20 La composición se usa para sustituir temporalmente el tensioactivo pulmonar natural en un pulmón de mamífero en el que tal tensioactivo pulmonar natural no está presente, es disfuncional o está presente a una concentración baja. A diferencia de otras composiciones tensioactivas, la presente composición no contiene ninguna proteína derivada de fuentes no humanas.

25 La composición se puede usar para prevenir o tratar una afección relacionada con una disfunción del tensioactivo pulmonar, tal como la enfermedad de la membrana hialina (EMH), síndrome de dificultad respiratoria (SDR), intoxicación por hidrocarburos, casi-ahogamiento, enfermedades pulmonares relacionadas con el VIH/SIDA, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), tuberculosis (TB) o síndrome respiratorio agudo grave (SRAG). De manera alternativa, la composición se puede usar para incrementar la permeabilidad de un compuesto o composición farmacéutica a través de una membrana de un sujeto o para actuar como vehículo farmacológico. El compuesto farmacéutico, composición o fármaco puede ser, pero sin limitación, un agente antineoplásico, antiinflamatorio, agente inmunosupresor, agente antidiurético, péptido portador, péptido microbicida, inhibidor de ACTH, análogo de cortisol o agente para terapia de sustitución de hormonas, y se puede administrar como una formulación diferente pero de manera concurrente con la composición descrita anteriormente, o se puede incluir como parte de la misma composición. La composición se puede administrar de manera endotraqueal en los pulmones de un mamífero para sustituir temporalmente el tensioactivo pulmonar natural y para crear una película sobre las superficies interfaciales alveolares y para reducir la tensión superficial. De ese modo se facilita la expansión de los espacios alveolares. De manera alternativa, la composición se puede administrar a un sujeto mediante inhalación, intubación o administración pulmonar directa.

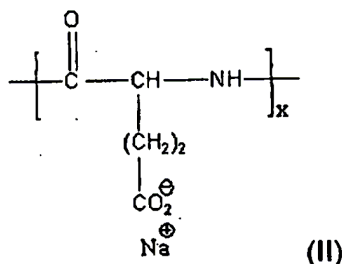
40 La cadena de poli-L-lisina o la sal de la misma es generalmente más larga que la cadena de poli-ácido L-glutámico o poli-ácido L-aspartico o la sal de los mismos en al menos 17 residuos, en al menos 35 residuos, en al menos 50 residuos o en al menos 85 residuos. Por ejemplo, la cadena de poli-L-lisina o la sal de la misma puede ser más larga en alrededor de 17 a 49 residuos, alrededor de 50 a 85 residuos o alrededor de 35 a 67 residuos. Como la poli-L-lisina está cargada positivamente de manera predominante y el poli-ácido L-glutámico está cargado negativamente de manera predominante, el complejo peptídico que se forma entre estos dos polipéptidos tiene una región de carga básicamente neutralizada y una región básicamente cargada positivamente. La región de carga neutralizada del complejo peptídico es capaz de interactuar con el vehículo lipídico, mientras la región cargada positivamente está disponible para interactuar con un medio acuoso y/o polar.

45 La proporción del primer polipéptido respecto del segundo polipéptido es de alrededor de 1:0,3 (p/p); y la proporción del complejo peptídico respecto del vehículo lipídico es de alrededor de 3:100 (p/p) y más en particular es 3,9:100 (p/p).

50 La poli-L-lisina ((Lys)_n) está en general en forma de poli-L-lisina.HBr, que tiene la fórmula (I) en la que n oscila de alrededor de 100 a alrededor de 135, más preferiblemente de alrededor de 103 a alrededor de 135, y aún más preferiblemente de alrededor de 103 a alrededor de 119.



El poli-ácido L-glutámico ((Glu)_n) está en general en forma de la sal sódica de poli-ácido L-glutámico, que tiene la fórmula (II), en la que x es al menos 50, preferiblemente al menos 68 o aún más preferiblemente al menos 86.



- 5 El vehículo lipídico puede incluir uno o más de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil fosfatidilglicerol (PG), hexadecanol, colesterol, tiloxapol o cloruro sódico. La proporción de DPPC, hexadecanol y PG puede ser de alrededor de 10:1,1:1 (p/p).

La composición puede incluir opcionalmente colesterol; por ejemplo, en concentraciones de alrededor de 3 mg/ml a alrededor de 4,8 mg/ml, para constituir de alrededor del 5 a alrededor del 8% (p/p) de la composición.

- 10 Un ejemplo de una realización adecuada de la invención es una composición que comprende:

dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC)	60 mg/ml;
fosfatidilglicerol (PG)	6 mg/ml;
hexadecanol	6,7 mg/ml;
tiloxapol	1 mg/ml;
15 poli-L-lisina.HBr	1,98 mg/ml;
sal sódica de poli-ácido L-glutámico	0,613 mg/ml; y
cloruro sódico	100 mM.

- 20 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "vehículo lipídico" significa una mezcla de fosfolípidos y opcionalmente otros componentes lipídicos, por ejemplo lípidos neutros tales como triacilgliceroles, ácidos grasos libres y/o colesterol.

Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "que comprende de manera predominante" o "básicamente" significan comprender principalmente. Por ejemplo, una región que tiene de manera predominante o básicamente carga positiva significa que la carga total (o neta) de la región es positiva.

- 25 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión dipalmitoilfosfatidil colina se refiere a 1,2-Dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión fosfatidilglicerol se refiere a 1,2-Diacil-sn-glicero-3-fosfo-[1-rac-glicerol].

- 30 Tal como se usa en la presente memoria, una dosis eficaz para tratar una afección es una cantidad que es suficiente para mejorar, o en cierta manera reducir, los síntomas asociados a la enfermedad. La cantidad dependerá del tipo y la gravedad de la afección y de las características (peso, sexo, edad) del sujeto.

Ejemplos

5 La invención se describe más adelante con referencia a una realización particular de la invención, en la que la composición comprende un vehículo lipídico que incluye una mezcla de fosfolípidos compuesta de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC); hexadecanol; fosfatidilglicerol (PG) en la proporción de 10:1,1:1 (p/p), y un complejo peptídico formado por un primer polipéptido en forma de poli-L-lisina.HBr (que tiene alrededor de 100-135 residuos de aminoácidos) y un segundo polipéptido en forma de la sal sódica de poli-ácido L-glutámico (que tiene alrededor de 86 residuos de aminoácidos). El solicitante ha usado el término "Synsurf" para referirse a la composición de tensioactivo pulmonar de la invención.

10 El proceso para preparar la composición de tensioactivo incluye primero preparar el vehículo lipídico mezclando DPPC, hexadecanol, y PG en un disolvente orgánico, tal como cloroformo, antes de eliminar el disolvente orgánico mediante evaporación rotatoria a 35 °C a presión reducida para obtener una película de fosfolípidos. Después los polipéptidos de poli-L-lisina y poli-ácido L-glutámico se dejan complejar entre sí mezclándolos a 37 °C en disolución acuosa que contiene cloruro sódico antes de añadirlos a la película de fosfolípidos. Después el complejo peptídico y la mezcla de la película de fosfolípidos se someten a sonicación en condiciones sustancialmente suaves.

15 En los ejemplos expuestos más adelante, la composición de tensioactivo pulmonar de la invención se prepara y se usa en ensayos en animales *in vivo* y en estudios de permeabilidad *in vitro* mediante el uso de muestras de tejidos animales y humanos. El Ejemplo 1 expone cómo se prepara la composición de tensioactivo pulmonar, junto con el análisis bioquímico de la misma. El Ejemplo 2 expone los resultados obtenidos al usar la composición de tensioactivo pulmonar como tratamiento temprano con tensioactivo pulmonar para el síndrome de dificultad respiratoria en corderos prematuros en comparación con el Survanta[®] disponible comercialmente. El Ejemplo 3 expone los resultados obtenidos al usar la composición de tensioactivo pulmonar en un ensayo aleatorizado para tratar el síndrome de dificultad respiratoria en corderos prematuros en comparación con el Curosurf[®] disponible comercialmente. El Ejemplo 4 expone los resultados de los estudios de permeabilidad con el uso de la composición de tensioactivo pulmonar para difundir diversos agentes a través de muestras de tejidos humanos y animales.

25 Ejemplo 1: Preparación y análisis de Synsurf

Materiales

30 Se obtuvo 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC) y 1,2-diacil-sn-glicero- 3-fosfo-[1-*rac*-glicerol] (PG) de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL), y se adquirió alcohol cetílico, tiloxapol, poli-L-lisina (sal de HBr, Sigma P7890) y poli-ácido L-glutámico (sal sódica, Sigma P4636) de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). La pureza de los fosfolípidos se verificó mediante cromatografía en capa fina (CCF). Se usó agua estéril para inyección en la preparación del tensioactivo pulmonar. El cloroformo usado fue de grado HPLC (Merck, Darmstadt).

Métodos

Preparaciones de tensioactivo pulmonar

35 La composición de la invención, denominada más adelante en la presente memoria "Synsurf", se preparó mezclando DPPC (450 mg), hexadecanol (49,995 mg) y PG (45 mg) (en aproximadamente una proporción 10:1,1:1 (p/p)) en 5 ml de cloroformo. Después el disolvente orgánico se eliminó mediante evaporación rotatoria y la mezcla se secó bajo una corriente continua de nitrógeno a temperatura ambiente. Se mezcló poli-L-lisina (24,8 kDa) (47,52 mg, 119 residuos) con poli-L-glutamato (10,2 kDa) (14,7 mg, 86 residuos) y se incubó a 37 °C en NaCl 100 mM durante 30 mins. El complejo se preparó de tal manera que estuvo cargado positivamente por tener un exceso de residuos de poli-L-lisina. La película seca de fosfolípidos se hidrató después con la mezcla de polímeros (3,9% en peso de la concentración de fosfolípidos), y se mezcló suavemente en presencia de esferas de vidrio. Después se usó un ultrasonicador equipado con una micropunta para sonicar la mezcla sobre hielo bajo una corriente de nitrógeno (potencia de 20 vatios durante 7 x 13 segundos; intervalos de 60 segundos). A continuación, se añadieron 7,5 mg de tiloxapol a la preparación y el tubo se selló bajo nitrógeno antes del uso.

45 También se preparó un tensioactivo pulmonar Exosurf genérico (EG) de una manera similar a la descrita anteriormente, y consistió en tres componentes: DPPC / hexadecanol / tiloxapol (13,5:1,5:1) en NaCl 100 mM. La dosis usada de Synsurf y EG en los experimentos con animales fue 100 mg/kg.

Medidas de la tensión superficial del líquido

50 Las propiedades de tensión superficial de Synsurf y EG se midieron con un analizador de ángulo de contacto dinámico CAHN 322. Se usó una velocidad de plataforma de 100 micras/seg con una velocidad de recogida de datos de 1 por seg. Se usó una placa de vidrio (22 mm x 22 mm x 0,15 mm) como sensor de fuerza. La inmersión fue en un vaso de precipitados de vidrio de 25 ml que contenía 12 ml de la muestra, y se registraron ciclos individuales a 25 °C. Se realizaron cinco grupos de análisis por triplicado.

Espectroscopía de dicroísmo circular

El análisis de la estructura secundaria del complejo poli-L-lys-poli-ácido L-glutámico se llevó a cabo a temperatura ambiente con un espectropolarímetro Jasco-810. El complejo polimérico se diluyó con NaCl 100 mM, lo que proporcionó concentraciones finales de péptidos de 6,6 μ M para p-lisina y 3,2 μ M para p-ácido glutámico, respectivamente.

Resultados

Medidas de la tensión superficial del líquido

DPPC es una molécula sin carga con una temperatura de transición de sólido a cristal líquido de 41,6 °C (Van Golde *et al.*, 1988). Por lo tanto, no se difunde bien en una interfase aire-líquido a la temperatura corporal normal. Para favorecer la dispersión de DPPC en Synsurf durante los experimentos en el modelo en conejo de reducción del tensioactivo pulmonar, se incluyó fosfatidilglicerol (PG) en la formulación. La molécula de PG cargada negativamente estabiliza una emulsión de fosfolípidos en agua y facilita la disgregación de los liposomas que tocan una interfase aire-líquido (Enhoring, 1984).

Los análisis comparativos de la tensión superficial de las preparaciones de Synsurf y EG no mostraron diferencias estadísticamente significativas, y se observaron valores de 37,7 mN/m y 37,6 mN/m para las formulaciones de Synsurf y EG, respectivamente. Aunque las medidas de la tensión superficial dependen de la técnica aplicada, los presentes datos medidos en condiciones dinámicas están de acuerdo con una escasa función de tensión superficial medida en ausencia de SP-B/C (Notter, 1983).

Espectroscopía de dicroísmo circular

La poli-L-lisina puede existir en una diversidad de conformaciones dependiendo del grado de ionización de los grupos amino de las cadenas laterales, la temperatura y la concentración salina. Cuando se examinó el espectro de dicroísmo circular (DC) del complejo de poli-L-lisina y poli-ácido L-glutámico, mostró un máximo a 218 nm, indicativo de que la mezcla existe en la conformación de cadena aleatoria nativa (Figura 1). Esto está de acuerdo con los hallazgos de Chittchang y colaboradores, que descubrieron que la cadena aleatoria es la estructura secundaria nativa de la polilisina (Chittchang *et al.*, 2002). Aunque la hidrofobicidad de la poli-L-lisina se incrementa significativamente en el orden: conformaciones de cadena aleatoria < hélice α < lámina β (Gray *et al.* 1994), los complejos de poli-L-lisina y poli-ácido L-glutámico tienen cierto grado de hidrofobicidad, ya que los conjugados de polilisina se unen electrostáticamente al ADN y producen buenos agentes de transfección de células (Larson *et al.* 2004). Además, la poli-L-lisina adopta una conformación de lámina β desde la cadena aleatoria durante la interacción con fosfolípidos (Fukushima *et al.* 1994). Sin embargo, la cadena aleatoria (estado desordenado) de una mezcla de polímeros tiende a favorecer la exposición de los grupos superficiales cargados básicos de las cadenas laterales de lisina, por lo que el péptido puede interactuar de manera flexible con otras moléculas para llevar a cabo un papel funcional en las membranas celulares. El efecto global puede ser entonces la unión electrostática a monocapas de fosfolípidos (Carrier *et al.*, 1985). Con respecto a SP-B, se propone que la estructura secundaria de hélice α y lámina β penetra en las cadenas acilo de los lípidos del recubrimiento de membranas fosfolipídicas de las paredes alveolares, lo que proporciona estabilidad y previene el colapso atelectásico (Whitsett *et al.*, 2002).

Los grupos amino cargados de la poli-L-lisina de la presente preparación también pueden interactuar con la bicapa fosfolipídica, imitando una o más propiedades estructurales y/o funcionales de SP-B. De manera alternativa, debido a que se cree que las cargas positivas son importantes para mantener la estructura y la función de SP-C (Creuwels *et al.*, 1995), se puede sostener que el carácter positivo global de los residuos de poli-L-lisina en Synsurf podría imitar las propiedades estructurales y/o funcionales de SP-C.

Ejemplo 2: Capnometría del espacio muerto, mecánica pulmonar y análisis de los gases sanguíneos tras la terapia de sustitución con tensioactivo pulmonar sintético en un modelo de reducción del tensioactivo pulmonar

Las concentraciones bajas de proteínas del tensioactivo pulmonar en los tensioactivos pulmonares naturales les dan ventaja en cuanto a la mejora de la oxigenación sistémica, la mecánica pulmonar y el desenlace clínico en recién nacidos con síndrome de dificultad respiratoria (SDR), por encima de la alcanzada con los productos sintéticos sin proteínas. Aunque la mejora de la oxigenación sistémica tras la terapia de sustitución del tensioactivo pulmonar (TSS) se debe a la recuperación de los alveolos colapsados o a la estabilización e hiperdistensión de los compartimentos pulmonares recuperados, el espacio muerto disminuido, la mejora de la mecánica pulmonar o un efecto de cortocircuito disminuido, el mecanismo exacto sigue siendo incierto y controvertido. En los animales de laboratorio, el lavado repetido eleva el espacio muerto alveolar y fisiológico, asociado a una disminución de la oxigenación. El TSS natural posterior mejora la oxigenación sin devolver el pulmón a su estado anterior al lavado.

El siguiente ejemplo describe un ensayo aleatorizado en el que se evaluó la composición de la invención (Synsurf) respecto de otros dos tensioactivos pulmonares sintéticos, en un modelo con conejos blancos New Zealand adultos, que se hicieron deficientes de tensioactivo pulmonar mediante lavado repetido con solución salina según los procedimientos de Lachmann *et al.* (1982).

Métodos

Tensioactivos usados

- Synsurf, preparado según el procedimiento expuesto en el Ejemplo 1.
- EG - Exosurf genérico (preparado mediante un método estándar, como se expone en el Ejemplo 1).
- 5 • GE + Ca²⁺ - Exosurf genérico + Ca²⁺

Determinación de la actividad del tensioactivo pulmonar in vivo

El cuidado de los animales y los procedimientos experimentales se llevaron a cabo con la aprobación de la Comisión para Investigación Humana de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Stellenbosch. Se usaron conejos blancos New Zealand adultos como modelo de reducción del tensioactivo pulmonar. Se llevó a cabo una traqueotomía bajo anestesia local y se insertó una cánula sin manguito en la tráquea. Se comenzó la ventilación mecánica mediante el uso de ajustes estandarizados bajo anestesia intravenosa continua con pentobarbital. La parálisis se consiguió con bromuro de pancuronio. Se llevaron a cabo lavados repetidos mediante el uso de 20 ml/kg de solución salina caliente (~37 °C) a través de la cánula endotraqueal para cada lavado. Los criterios finales de los lavados incluyeron una disminución de la presión de oxígeno arterial (PaO₂) por debajo de 11 kPa (fracción de la concentración inspirada de oxígeno; FiO₂ 1,0) y una disminución de la distensibilidad respiratoria dinámica (C_{dyn}) en un 40% o más. Cinco minutos tras el lavado, los animales se aleatorizaron en tres grupos. Las preparaciones de tensioactivo pulmonar se administraron a través de la cánula endotraqueal (concentración de DPPC 100 mg/kg). La FiO₂, los volúmenes corrientes espiratorios, la frecuencia respiratoria y la presión positiva al final de la espiración (PEEP) se mantuvieron constantes a lo largo del estudio. La función pulmonar se midió con un monitor del perfil respiratorio CO₂SMO Plus (Novamatrix Medical Systems Inc.). La presión parcial de la presión de dióxido de carbono espirado (PET_{CO2}) se midió mediante absorción infrarroja de la corriente principal. Mediante el uso de la presión de CO₂ arterial (PaCO₂) y las medidas de los volúmenes se determinó el espacio muerto anatómico, el espacio muerto alveolar (V_{dalv}), el espacio muerto fisiológico (V_{dphys}) y la proporción de espacio muerto/volumen corriente (Vt). Los gases sanguíneos, las medidas de los volúmenes y C_{dyn} se midieron antes y después del lavado, y a los 30, 60, 90, 120, 180, 240 y 300 min después de la terapia de sustitución del tensioactivo pulmonar. El estudio duró 5 horas antes de la eutanasia de los animales mediante una inyección letal intra-arterial de cloruro potásico al 15%.

Radiografía de tórax

Se tomaron radiografías de tórax anteroposteriores antes del lavado, inmediatamente antes de la aleatorización y al final del estudio. Se estudiaron los cambios en los campos pulmonares con enmascaramiento con respecto a si la opacificación radiográfica (atelectasia) tras el lavado se resolvió (mejor), permaneció sin cambios (similar) o se deterioró (peor).

Métodos estadísticos

Las variables medidas para los grupos en los tiempos preseleccionados se compararon mediante el uso de pruebas t para datos independientes. Para las variables continuas medidas a lo largo del tiempo, se usó una regresión lineal de las variables a lo largo del tiempo mediante análisis de mínimos cuadrados para comparar los grupos mediante las diferencias en las respuestas iniciales al tensioactivo pulmonar (ordenadas en el origen) y los cambios a lo largo del tiempo (pendientes). Los datos se expresan como la media ± DE. Un valor de p < 0,05 se consideró significativo.

Resultados

El V_{dalv}, la proporción V_d/V_t y la diferencia (delta) PaCO₂-ETCO₂ se incrementaron de manera significativa, mientras la PaO₂ y C_{dyn} disminuyeron de manera significativa tras el lavado repetido (Tabla 2). En el grupo en conjunto, la instilación de tensioactivo pulmonar no restableció ninguna de las variables medidas hasta las condiciones de pre-lavado (Tabla 3). Se documentó una oxigenación significativamente mejor (valores de PaO₂) en el grupo de Synsurf en comparación con los otros dos grupos (Figura 2). El grupo de animales de Synsurf tuvo diferencias PaCO₂-ETCO₂ significativamente inferiores que el grupo de EG a los 300 min (datos no mostrados). En conjunto, existió una correlación negativa entre la proporción a/A y la proporción V_d/V_t (r = 0,72), y una correlación positiva significativa entre la delta PaCO₂-ETCO₂ y la proporción V_d/V_t (r = 0,8). A pesar de manifestar una mejor oxigenación, los animales del grupo de Synsurf manifestaron peores correlaciones entre la PaO₂ y la delta PaCO₂-ETCO₂ y la PaO₂ y la proporción V_d/V_t en comparación con los otros grupos. Todos los conejos de los tres grupos de estudio sobrevivieron hasta el final del periodo de estudio. CXR mejoró en 3/4 animales del grupo de Synsurf en comparación con 1/4 en el grupo de EG + Ca²⁺ y 2/4 en el grupo de EG (Tabla 4). La sustitución con tensioactivo pulmonar sintético no restableció el pulmón a sus condiciones de pre-lavado.

Tabla 2: Pre-lavado frente a post-lavado (tiempo 0) (media ± DE)

Variables	TODOS n=12	EG n=4	EG + Ca ²⁺ n=4	Synsurf n=4
Pre-PaO ₂ /FiO ₂	67,5 (2,2)	68,1 (2,3)	67,9 (3,2)	66,6 (1,2)
Post-PaO ₂ /FiO ₂	7,2 (2)	7,1 (2,1)	6,7 (2,4)	7,7 (1,9)
Pre PaCO ₂ -ETCO ₂ (kPa)	1,31 (1,12)	1,62 (0,89)	1 (1,09)	1,25 (1,55)
Post PaCO ₂ -ETCO ₂ (kPa)	3,1 (1,5)	3 (1,28)	3,55 (1,66)	2,77 (1,8)
Pre Vd/Vt	0,61 (0,08)	0,61 (0,01)	0,58 (0,08)	0,65 (0,07)
Post Vd/Vt	0,78 (0,05)	0,78 (0,0)	0,79 (0,05)	0,77 (0,08)
Pre Vd alv (ml)	11,3 (3,67)	10,7 (3,5)	10,7 (2,5)	12,5 (5,19)
Post Vd alv (ml)	14,5 (2,9)	12,7 (2,2)	16,7 (1,25)	14,2 (3,8)
Pre Cdyn ml/cmH ₂ O/kg	2,91 (0,5)	2,8 (0,3)	3,02 (0,74)	2,85 (0,46)
Post Cdyn ml/cmH ₂ O/kg	1,42 (0,22)	1,36 (0,21)	1,45 (0,25)	1,45 (0,26)

Tabla 3: Variables pre-lavado frente a las variables a los 300 min (criterio final del estudio) para TODOS (media ± DE)

Variable	MEDIA	DE	ANOVA
Pre PaO ₂ /FiO ₂	67,5	2,2	P < 0,0005
300 min PaO ₂ /FiO ₂	20,8	13,4	
Pre PaCO ₂ -ETCO ₂ (kPa)	1,31	1,12	P = ns (0,08)
300 min PaCO ₂ -ETCO ₂ (kPa)	2	0,77	
Pre Vd/Vt	0,61	0,08	P < 0,003
300 min Vd/Vt	0,73	0,06	
Pre Vd alv (ml)	11,3	3,6	P = ns
300 min Vd alv (ml)	12,4	2,8	
Pre Cdyn (ml/cmH ₂ O/kg)	2,9	0,50	P < 0,002
300 min Cdyn (ml/cmH ₂ O/kg)	1,4	0,24	

5 Tabla 4: Cambios en la radiografía de tórax

Cambio:	EG	EG + Ca ²⁺	Synsurf
Pre-lavado frente a final del estudio	N=4	N=4	N=4
Mejor	2	1	3
Similar	1	3	
Peor	1		1

Discusión

10 Todos los animales experimentaron un deterioro de la proporción Vd/Vt (espacio muerto fisiológico). La oxigenación sistémica fue notablemente superior a lo largo del tiempo en los animales tratados con Synsurf. Un grado menor de cortocircuito derecho/izquierdo intrapulmonar, tal como se refleja por las diferencias intra-grupo en los valores de PaCO₂-ETCO₂, puede explicar este hallazgo. Además, aunque se sabe que Ca²⁺ puede estabilizar las membranas y películas de fosfolípidos polares en la interfase aire-líquido, los experimentos muestran que el estado de oxigenación de los animales que recibieron EG + Ca²⁺ fue inferior al de los animales que se trataron con Synsurf. La oxigenación sistémica, por lo tanto, mejoró significativamente en los animales tratados con Synsurf. Esta mejora fue significativamente superior a la del "Exosurf" genérico. Esta mejora se podría deber a un grado inferior de

15

cortocircuito intrapulmonar, tal como se refleja mediante la diferencia PaCO₂-CO₂ espirado en este grupo (Tabla 2).

Ejemplo 3: Tratamiento de rescate temprano con tensioactivo pulmonar para el síndrome de dificultad respiratoria en corderos prematuros: Comparación de Synsurf con Survanta[®] de origen bovino

5 El Ejemplo 3 es un ensayo aleatorizado en el que se evaluó Synsurf respecto del tensioactivo pulmonar de origen bovino disponible comercialmente Survanta[®] (ABBOTT Lab), con respecto a la oxigenación sistémica y a la mecánica pulmonar durante la instilación en corderos prematuros 30 min después del nacimiento.

Métodos

Tensioactivos pulmonares usados

- Synsurf, preparado según el procedimiento expuesto en el Ejemplo 1.
- 10 • Survanta[®]

Determinación de la actividad del tensioactivo pulmonar in vivo

15 El cuidado de los animales y los procedimientos experimentales se llevaron a cabo con la aprobación de la Comisión para Investigación Humana de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Stellenbosch. Se preanestesiaron doce ovejas Dorper preñadas, se intubaron y recibieron anestesia con halotano y ventilación con presión positiva intermitente. Se llevó a cabo una cesárea en las ovejas preñadas datadas a una edad gestacional de 126-129 días (gestación normal de 145-150 días). Se expuso la cabeza fetal, se llevó a cabo una traqueotomía y se colocó una cánula endotraqueal de 4 ó 4,5 mm sin manguito. Se tomaron de diez a 20 ml de fluido pulmonar fetal para determinar la madurez pulmonar. Se cortó la médula umbilical; después los animales se extrajeron, se secaron, 20 y se pesaron, se sedaron y se paralizaron. Se inició la ventilación con el mismo estilo de ventilación para alcanzar un volumen corriente de 9-11 ml/kg. Los ajustes del respirador se mantuvieron constantes a lo largo del estudio a una FiO₂ de 1,0, frecuencia de 40 rpm, Ti 0,70 seg y Peep de 4 cm H₂O. Los corderos se asignaron a uno de dos grupos (n=6 corderos/grupo) en 30 minutos desde el nacimiento. Se ensayaron dos tensioactivos pulmonares (concentración 100 mg/kg): el Grupo A recibió Synsurf y el Grupo B, Survanta[®]. El tensioactivo pulmonar se administró como un tratamiento de rescate temprano en 35 minutos desde el nacimiento. Las medidas de las 25 variables fisiológicas, los gases sanguíneos y la mecánica pulmonar *in vivo* se midieron a los 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 y 300 min tras la sustitución del tensioactivo (SS). Después de 5 horas, se sacrificaron todos los animales vivos. Se extrajeron los pulmones de todos los animales para la histología y la morfometría.

Histología

30 Los pulmones se inflaron con aire a una presión estática de 25 cm H₂O, y se fijaron con formalina tamponada del 10%. Las muestras tomadas se tiñeron con tinción de hematoxilina y eosina (H&E) y se examinaron mediante microscopía óptica con un aumento de 100X.

Resultados

35 Los parámetros de pre-tratamiento para ambos grupos se proporcionan en la Tabla 5. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Todos los corderos fueron gravemente deficientes de tensioactivo pulmonar, ya que el recuento medio de cuerpos lamelares, un reflejo de los fosfolípidos pulmonares totales, fue insignificante en el nacimiento.

Tabla 5: Parámetros de pre-tratamiento con Synsurf frente a Survanta[®] (Media DE)

Variables	Synsurf: n = 6	Survanta [®] : n = 6
Peso corporal (kg)	2,73 (0,55)	2,38 (0,74)
Edad gestacional (días)	128,5 (0,54)	128 (1)
Macho/Hembra	2 / 4	1 / 5
Recuento de cuerpos lamelares/ml	4666 (3386)	6500 (3271)
Fluido traqueal (ml/kg)	6,5 (2,6)	7,9 (2,5)
Ventilación por minuto (ml/min/kg)	347 (44,6)	351 (30,3)
Volumen corriente (TV/kg)	9,7 (0,8)	9,7 (0,6)
Presión media en las vías respiratorias pulmonares (cm H ₂ O)	14,8 (2,6)	13,8 (0,98)
Cdyn (ml/cm H ₂ O/kg)	0,29 (0,08)	0,33 (0,65)

VCO ₂ /kg (producción de CO ₂ por kg de peso corporal)	1,38 (0,5)	1,08 (0,88)
C ₂₀ /C (Distensibilidad dinámica a lo largo del último 20% de respiración como % de la C _{dyn} de la respiración total)	1,3 (0,37)	1,15 (0,23)
Tensión arterial media (mmHg)	55,6 (14,3)	54,8 (3,7)
Pulso (por min)	170 (34,3)	165 (19,6)
Presión venosa central (cm H ₂ O)	6 (3)	5,2 (0,9)
Temp. rectal (°C)	36,9 (0,5)	36,7 (0,56)
PaO ₂ /FiO ₂	36,8 (20,3)	26,6 (10,7)
PaCO ₂ (kPa)	7,8 (1,9)	10 (1,9)
pH	7,30 (0,06)	7,22 (0,09)
CO ₂ total (mmol/L)	31,1 (3,5)	32,9 (1,4)
Déficit de base	1,8 (1,1)	1,2 (3,1)
Índice de oxigenación (cm H ₂ O/kPa)	7,3 (4,4)	7,8 (2,9)
Intervalo nacimiento-surf (min)	29,8 (2)	28,8 (3,6)

- 5 En 15 minutos desde la instilación del tensioactivo pulmonar, los animales del grupo de Synsurf y del grupo de Survanta[®] experimentaron un incremento de la proporción PaO₂/FiO₂ (p = ns). A continuación, sin embargo, ambos grupos experimentaron un deterioro significativo de la oxigenación sistémica (proporción PaO₂/FiO₂) a lo largo del periodo de estudio (Figuras 4 y 5). En 45 - 90 min después de la instilación del tensioactivo pulmonar, la oxigenación sistémica se deterioró de manera gradual por debajo de la de los valores iniciales sin diferencias reales entre los grupos en ningún momento (Figuras 4 y 5), excepto por valores de PaO₂ más elevados en el Grupo A (Synsurf) a los 300 min (p<0,05).
- 10 Los gases en sangre arterial (PaCO₂, pH), los índices de ventilación y las variables hemodinámicas fueron similares en ambos grupos para el periodo de estudio de 5 horas. Cuatro de los 6 animales del grupo de Synsurf sobrevivieron al final del estudio. En este grupo, 3 animales desarrollaron un neumotórax, a los 45 min, 90-120 min y 180 min, respectivamente. Todos los animales del grupo de Survanta[®] sobrevivieron hasta el final del estudio, y ninguno desarrolló un neumotórax (Supervivencia: Synsurf frente a Survanta; p = ns).
- 15 La Figura 6 muestra un incremento de la distensibilidad respiratoria a lo largo del tiempo en los animales en ambos grupos. De manera interesante, en ambos grupos, tuvo lugar una disparidad entre la oxigenación (Figura 4, disminución) y la distensibilidad respiratoria dinámica (Figura 6, incremento). Esta correlación negativa se muestra en la Figura 7. Se muestra una comparación de estos resultados con los hallazgos informados en la bibliografía en la Figura 8. El análisis estadístico adicional de los cambios en la distensibilidad respiratoria dinámica, expuestos con más detalle a continuación, demostró que existen indicios de una diferencia entre Survanta[®] y Synsurf (Figura 9). A lo largo del intervalo de tiempo de aproximadamente 90 a 300 min, el límite inferior para Survanta[®] se halla ligeramente por encima del límite superior para Synsurf.
- 20 Al final del estudio, la fosfatidilcolina en el líquido de lavado broncoalveolar (LBA) de los animales tratados con Survanta[®] y Synsurf consistió principalmente en C16:0 (ácido palmítico). El líquido de BAL de los animales tratados con Synsurf difirió de los animales tratados con Survanta[®] en la composición de ácidos grasos, ya que contuvo significativamente más ácido palmítico (C16:0) y ácido oleico (C18:1), mientras contuvo significativamente menos ácido esteárico (C18:0), mirístico (C14:0) y palmitoleico (C16:1) (Tabla 6). En la medida en que el ácido palmítico (C16:0) es esencial para reducir la tensión superficial, no hubo correlación entre C_{dyn} y C16:0, ni entre C_{dyn} y la fosfatidilcolina en el líquido de LBA (µg de fosfolípido/µg de proteína) (datos no mostrados).
- 25

Tabla 6: Composición de ácidos grasos de la fosfatidilcolina del líquido broncoalveolar al final del estudio. Porcentaje de distribución de ácidos grasos respecto de los ácidos grasos totales (Media % DE)

Ácido graso	Survanta®	Synsurf	Valor de p
C 14:0	4,9 (0,5)	1,0 (0,48)	< 0,05
C 16:0	82,8 (1,5)	96,1 (1,4)	< 0,05
C 16:1	2,9 (0,32)	0,89 (0,34)	< 0,05
C 18:0	1,9 (0,62)	0,47 (0,22)	< 0,05
C 18:1	0,57 (0,1)	1,31 (0,61)	< 0,05

5 Los cortes para histología pulmonar representativos de los corderos tratados con Survanta® o Synsurf no difirieron de manera significativa (datos no mostrados). No existieron diferencias morfométricas entre los grupos de Synsurf y Survanta® para el tamaño alveolar ($p = 0,3$) o el volumen alveolar ($p = 0,29$) (Tabla 7).

Tabla 7: Parámetros morfométricos

	Grosor del tabique (μm) Media \pm DE	Intercepción lineal (μm) Media \pm DE	Volumen Alveolar (μm) Media \pm DE
Synsurf	5,04 (0,27)	43,03 (2,52)	8,42 (1,51)
Survanta	5,36 (0,60)	44,59 (4,91)	9,57 (3,23)

10 Tras la instilación del tensioactivo pulmonar, el recuento de leucocitos totales (WCC) periféricos de los corderos tratados con Synsurf disminuyó de manera significativa en comparación con el nivel pre-tratamiento ($p = 0,01$). Los niveles de WCC post-tratamiento fueron significativamente inferiores en el grupo tratado con Synsurf en comparación con los corderos tratados con Survanta® ($p = 0,01$). Sin embargo, no hubo diferencias evidentes en los infiltrados de células inflamatorias en el pulmón (histología) entre los grupos tratados con los diferentes tensioactivos pulmonares.

15 Discusión

20 Tras el tratamiento de rescate temprano de la deficiencia de tensioactivo pulmonar en corderos prematuros, Synsurf y Survanta® fueron indistinguibles con respecto al intercambio de gases, la distensibilidad respiratoria dinámica y la histología pulmonar. Se razona que el deterioro de las medidas de los gases sanguíneos podría ser parcialmente el resultado de la inhibición del tensioactivo pulmonar por la filtración de proteínas plasmáticas en las vías respiratorias (previamente demostrada por otros autores), agravada por la difusión irregular del tensioactivo pulmonar al instilarlo como terapia de rescate, o la acción inhibitoria de oxirradicales sobre los tensioactivos pulmonares (ventilados durante 5 horas con un 100% de oxígeno), todo lo cual empeora el cortocircuito intrapulmonar. A este respecto, se pueden disminuir las filtraciones de proteínas a través del epitelio alveolar mediante TSS antes de la primera respiración / inicio de la ventilación.

25 La composición de ácidos grasos del líquido de BAL al final del experimento contuvo más del mínimo necesario de ácido palmítico en la fosfatidilcolina para la función pulmonar adecuada (Shelley *et al.* 1979). Los polímeros de la formulación de Synsurf pueden haber ayudado a la adsorción *in vivo* y a la dispersión de los ácidos grasos C16:0 a la capa de tensioactivo pulmonar.

Análisis estadísticos de los datos de PaO₂ de Survanta® y Synsurf

30 La representación de los valores de Survanta® y Synsurf respecto del tiempo para animales individuales muestra, en la mayoría de los casos, una tendencia asintótica descendente con el tiempo. La transformación de los valores observados de PaO₂ a $\log_e(\text{PaO}_2)$ produce las tendencias observadas que se pueden modelizar mediante curvas cuadráticas, excepto porque las observaciones a Tiempo = 0 son sistemáticamente demasiado bajas para ajustarse al patrón cuadrático. En lo siguiente se omitieron las observaciones a Tiempo = 0. Se ajustó una curva cuadrática a los datos observados de $\log_e(\text{PaO}_2)$ frente al Tiempo (Minutos) de cada animal, lo que proporcionó 6 curvas de Survanta® y 6 curvas de Synsurf. Se calcularon los valores medios observados para Survanta® y Synsurf, y se representan como puntos en la Figura 5. Se calcularon las medias de las curvas ajustadas, y se muestran como curvas lisas. En los tiempos 15, 30, etc., se calcularon los errores estándar de los valores medios ajustados: dependen de la variación entre animales de los valores ajustados. Las bandas de confianza mostradas en la Figura 5 son la Media \pm 1,57 (e.e. de la media). El multiplicador 1,57 se elige de forma que la ausencia de solapamiento de las bandas indica una diferencia significativa entre Survanta® y Synsurf a un nivel de aproximadamente 0,05.

No hay indicios de una diferencia significativa entre Survanta[®] y Synsurf. La curva ajustada media para Synsurf se halla dentro de las bandas de confianza para Survanta, y viceversa.

Análisis estadísticos de los datos de distensibilidad respiratoria dinámica de Survanta[®] y Synsurf

5 La representación de los valores de Survanta[®] y Synsurf respecto del tiempo para animales individuales muestra que hay una tendencia con el tiempo. No es lineal, pero se puede representar de manera adecuada mediante una curva cuadrática.

10 Se ajustó una curva cuadrática a los datos de cada animal, lo que proporcionó 6 curvas de Survanta[®] y 6 curvas de Synsurf. Se calcularon los valores medios observados para Survanta[®] y Synsurf, y se representan como puntos en la Figura 9. Se calcularon las medias de las curvas ajustadas, y se muestran como curvas lisas en la Figura 9. En los tiempos 0, 15, 30, etc., se calcularon los errores estándar de los valores medios ajustados: dependen de la variación entre animales de los valores ajustados. Las bandas de confianza mostradas en la Figura 9 son la Media \pm 1,57 (e.e. de la media). El multiplicador 1,57 se elige de forma que la ausencia de solapamiento de las bandas indica una diferencia significativa entre Survanta[®] y Synsurf a un nivel de aproximadamente 0,05.

15 A lo largo del intervalo de tiempo de aproximadamente 90 a 300 min, el límite inferior para Survanta[®] se halla por encima del límite superior para Synsurf.

Ejemplo 4: Tratamiento con tensioactivo pulmonar para el síndrome de dificultad respiratoria: Un estudio en corderos prematuros

20 Se llevó a cabo un ensayo aleatorizado en el que se analizó la oxigenación sistémica y la mecánica pulmonar durante la instilación de solución salina (control), Synsurf o el tensioactivo pulmonar de origen porcino Curosurf[®] (Chiesi, Safeline Pharmaceuticals) antes de la primera respiración en corderos prematuros.

Métodos

Tensioactivos pulmonares usados

- Synsurf preparado según el procedimiento expuesto en el Ejemplo 1.
- Curosurf[®]

25 *Determinación de la actividad del tensioactivo pulmonar in vivo*

30 Se preanestesiaron dieciocho ovejas Dohne-Merino preñadas, se intubaron y recibieron anestesia con halotano y ventilación con presión positiva intermitente. Se llevó a cabo una cesárea en las ovejas preñadas datadas a una edad gestacional de 129-130 días (gestación normal de 150 días). Se expuso la cabeza fetal, se llevó a cabo una traqueotomía y se colocó una cánula endotraqueal de 4,5 mm sin manguito. Se tomaron de diez a 20 ml de fluido pulmonar fetal para determinar la madurez pulmonar. Se cortó la médula umbilical; después los animales se extrajeron, se secaron, y se pesaron, se sedaron y se paralizaron. El tensioactivo pulmonar se administró antes de la primera respiración. Para minimizar el daño pulmonar, se usó un volumen corriente espiratorio de 6-8 ml/kg durante los primeros 30 min. El volumen corriente espiratorio (Vte) se incrementó después a 8-10 ml/kg. A continuación, los ajustes del respirador se mantuvieron constantes a lo largo del estudio a una concentración fraccionaria de oxígeno inspirado (FiO₂) de 1,0, frecuencia de 40 rpm, Ti 0,70 seg y PEEP de 4 cm H₂O. Los corderos se asignaron a uno de tres grupos (n = 6 corderos/grupo). Se ensayaron los dos tensioactivos pulmonares (concentración 100 mg/kg): el Grupo A recibió Synsurf y el Grupo B Curosurf[®], y el grupo de control volúmenes equivalentes de solución salina. Las medidas de las variables fisiológicas (tensión arterial, frecuencia cardiaca, temperatura rectal y, cuando fue posible, presión de la arteria pulmonar), gases sanguíneos y mecánica pulmonar *in vivo* se tomaron a los 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 y 300 min después de la SS. Después de 5 horas, se sacrificaron todos los animales vivos. Se abrió la pared torácica y se determinó la capacidad inspiratoria máxima (CIM) cuasi-estática del pulmón intacto a 35 cmH₂O de presión estable máxima (PEEP cero) después del desangrado. Se tomaron fotografías del aspecto macroscópico de las caras anterior y posterior de los pulmones extirpados, y los patrones de lesiones pulmonares se clasificaron según las fotografías: (a) aspecto normal, (b) distribución "típica" del patrón de lesiones leves, (c) distribución "típica" del patrón de lesiones leves-moderadas, y (d) patrón de lesiones graves. Se ligó el bronquio principal izquierdo, y se extrajo el lóbulo inferior izquierdo para las medidas del contenido de agua del pulmón, es decir, proporción húmedo/seco [h/s] y proporción húmedo/seco/húmedo [fracción de peso húmedo]. En los corderos sin neumotórax, el pulmón restante (lóbulos pulmonares inferior, medio y superior derecho) se rellenó por gravedad con formaldehído al 4% y se inflaron bajo una presión constante de 25 cmH₂O. Este pulmón se usó para la histología y morfometría.

Resultados

Se estudiaron un total de 18 corderos. La Tabla 8 proporciona un resumen total de los parámetros pre-tratamiento para los tres grupos. Todos los corderos fueron gravemente deficientes de tensioactivo pulmonar, ya que su proporción lecitina:esfingomielina (L/E) fue menor de 2 y el recuento de cuerpos lamelares fue menor de 15.000 por

μL (media 5278). La deficiencia de tensioactivo pulmonar se reflejó además en la baja distensibilidad dinámica media global del sistema respiratorio (C_{dyn}) ($0,31 \pm 0,09 \text{ ml/cmH}_2\text{O/kg}$) y un escaso estado de oxigenación, tal como se reflejó por una baja proporción a/A ($0,03 \pm 0,01$) y un IO elevado ($53,68 \pm 32,10$).

Tabla 8: Variables Fisiológicas a tiempo 0 - Parámetros (Media \pm DE)

VARIABLE	TODOS (n = 18)	SOLUCIÓN SALINA (n = 6)	SYNSURF® (n = 6)	CUROSURF® (n = 6)
Proporción L/E	1,040 (0,12)	1,144 (0,1)	0,973 (0,1)	0,973 (0,05)
$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$	$25,19 \pm 9,42$	$29,4 \pm 7,56$	$27,63 \pm 9,3$	$19,25 \pm 9,18$
PaCO_2 (kPa)	$6,28 \pm 1,27$	$6,77 \pm 1,04$	$5,84 \pm 1,22$	$6,31 \pm 1,53$
CO_2 total (mmol/l)	$26,75 \pm 2,97$	$26,76 \pm 2,86$	$26,57 \pm 4,39$	$26,92 \pm 1,53$
C_{dyn} (ml/cmH ₂ O/kg)	$0,31 \pm 0,09$	$0,38 \pm 0,12$	$0,27 \pm 0,06$	$0,31 \pm 0,05$
Proporción a/A	$0,03 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$
ESTADO DE OXIGENACIÓN (cm H ₂ O/mmHg)	$53,68 \pm (32,10)$	$43,11 (15,16)$	$44,06 (14,75)$	$73,89 (48,18)$
Vte/kg	$7,09 \pm 1,13$	$6,78 \pm 1,67$	$7,17 \pm 0,85$	$7,28 \pm 0,97$
pH	$7,35 \pm 0,08$	$7,31 \pm 0,06$	$7,39 \pm 0,07$	$7,34 \pm 0,10$

5

No se hallaron diferencias estadísticas para los diferentes parámetros enumerados en la tabla.

Respuesta inicial al tratamiento

Tras la instilación del vehículo, los tres grupos experimentaron una mejora del estado de oxigenación en 30 minutos (Figura 10, Figura 11). Aunque no hubo diferencias significativas entre las proporciones $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ de los corderos tratados con Curosurf® y los tratados con Synsurf a los 30 minutos, en comparación con el grupo tratado con solución salina, solamente el grupo tratado con Synsurf tuvo una proporción $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ significativamente mayor ($p = 0,03$). A los 45 minutos, los animales tratados con Synsurf habían alcanzado una proporción $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ significativamente mayor en comparación con los corderos tratados con solución salina ($p = 0,046$). Los animales que recibieron tensioactivo pulmonar tuvieron un estado de oxigenación significativamente mejorado entre los 30 minutos y 240 minutos, superior al de los animales tratados con solución salina (Figura 10, Figura 11). Aunque los animales tratados con Curosurf® experimentaron un estado de oxigenación significativamente mejorado entre el inicio del experimento y los 300 minutos ($p = 0,046$), su proporción $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ media disminuyó significativamente a lo largo del tiempo entre los 30 minutos y los 300 minutos ($p = 0,046$). A los 300 minutos, los corderos tratados con Synsurf tuvieron una mayor proporción $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ y proporción a/A en comparación con los 30 minutos. A los 300 minutos, los corderos tratados con Synsurf tuvieron proporciones $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (frente a Curosurf®, $p = 0,046$; frente a solución salina, $p = 0,043$) y a/A (frente a Curosurf®, $p = 0,046$; frente a solución salina $p = 0,043$) significativamente mejores en comparación con las de los corderos tratados con Curosurf® o solución salina. A los 300 minutos, los corderos tratados con Synsurf tuvieron un estado de oxigenación similar al de los corderos tratados con Curosurf®, pero un estado de oxigenación inferior comparado con los corderos tratados con solución salina ($p = 0,345$) (Tabla 9, Figura 10, Figura 11).

20

25

Tabla 9: Variables Fisiológicas a tiempo 300 min (final del estudio) - Parámetros (Media \pm DE)

VARIABLE	TODOS (n = 18)	SOLUCIÓN SALINA (n = 6)	SYNSURF (n = 6)	CUROSURF® (n = 6)
$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$	$205,31 \pm 141,06$	$190,90 \pm 149,58$	$288,88 \pm 137,13$	$133,75 \pm 110,64$
PaCO_2 (kPa)	$7,60 \pm 2,79$	$7,25 \pm 3,14$	$7,03 \pm 3,32$	$8,47 \pm 2,16$
CO_2 total (mmol/l)	$25,76 \pm 2,85$	$24,00 \pm 2,50$	$26,20 \pm 2,25$	$26,78 \pm 3,34$
C_{dyn} (ml H ₂ O/kg)	$0,46 \pm 0,07$	$0,47 \pm 0,07$	$0,45 \pm 0,09$	$0,48 \pm 0,05$
Proporción a/A	$0,29 \pm 0,2$	$0,27 \pm 0,21$	$0,40 \pm 0,21$	$0,21 \pm 0,16$
ESTADO DE OXIGENACIÓN (cm H ₂ O/mmHg)	$20,54 (27,72)$	$28,96 (36,06)$	$14,89 (30,03)$	$17,77 (16,65)$

Vte/kg	9,09 ± 1,14	9,46 ± 0,65	8,45 ± 1,13	9,43 ± 1,33
pH	7,25 ± 0,15	7,25 ± 0,20	7,31 ± 0,15	7,20 ± 0,11

5 Excepto a tiempo 180 y 300 min, respectivamente, en los que los corderos tratados con Synsurf tuvieron volúmenes corrientes espiratorios inferiores significativos (frente a Curosurf[®], p = 0,028; frente a solución salina, p = 0,043), no hubo diferencias entre los grupos (Figura 12). Los valores de PaCO₂ arterial (Figura 13) entre el inicio del estudio y los 300 minutos no mostraron diferencias significativas, y la tensión arterial media estuvo dentro de los límites normales para todos los animales durante el periodo de estudio (media 55,8 ± 7,3).

10 La distensibilidad respiratoria dinámica total (Cdyn) (Figura 14) se incrementó de manera constante en todos los grupos a lo largo del tiempo, pero el incremento solamente fue significativo en los grupos tratados con tensioactivo pulmonar entre el tiempo 0 (inicio del experimento) y los 300 minutos (p = 0,0012 y p = 0,00026, para Synsurf y Curosurf[®], respectivamente). No hubo diferencias significativas entre grupos para Cdyn entre el inicio del experimento y los 300 minutos.

15 La sangre de cordón umbilical tuvo la típica linfocitosis de la sangre fetal para todos los grupos de estudio (Tabla 10). Después de 5 horas de ventilación, el número de leucocitos cambió de manera significativa solamente en el grupo de tratamiento con Curosurf[®]. En este grupo, el recuento medio de leucocitos (WCC) periféricos se elevó de 1,2 a 3,0 (p = 0,02). En todos los grupos, el desplazamiento predominante desde una linfocitosis en sangre de cordón umbilical a una predominancia de neutrófilos ocurrió después de 5 horas de ventilación. No hubo, sin embargo, diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 10: Recuento de leucocitos y recuento diferencial en el nacimiento y después de 5 h de ventilación de corderos prematuros

	Synsurf	Curosurf [®]	Solución salina
Recuento en el Inicio			
WBC × 10 ⁹ /l	1,9 (1,3)	1,2 (0,8)	3,1 (2,6)
Neutrófilos %	20,3 (15,2)	23,6 (27,9)	19,7 (23,4)
Linfocitos	65,9 (12,6)	65,9 (21,1)	72,6 (23,1)
Final del Estudio			
WBC × 10 ⁹ /l	1,8 (1,7)	3,0 (1,9)	2,4 (1,3)
Neutrófilos %	42,8 (38,7)	53,4 (24,1)	45,4 (31,4)
Linfocitos	53,6 (35,5)	38,5 (22,6)	49,8 (32,3)

20 Todos los animales de los grupos tratados con tensioactivo pulmonar sobrevivieron. Dos animales desarrollaron un neumotórax durante el estudio, uno del grupo de solución salina y otro del grupo tratado con Synsurf, respectivamente. Un animal del grupo tratado con solución salina murió antes de la marca de 300 minutos.

25 Las medidas del volumen pulmonar cuasi-estático, la capacidad inspiratoria máxima (CIM), tal como se determina en el estado de tórax abierto, fueron 36,22 ± 10,21 ml/kg para los corderos tratados con solución salina, 33,95 ± 8,03 ml/kg para los tratados con Curosurf[®], y 32,96 ± 1,98 ml/kg para los tratados con Synsurf, que no fueron diferentes entre sí (p = ns). Se clasificó el aspecto macroscópico de los pulmones de 16 corderos (los pulmones de 2 corderos del grupo tratado con solución salina no estuvieron disponibles) (datos no mostrados). Se clasificó el aspecto de los pulmones de la mayoría de corderos (n = 8) bajo el patrón de lesiones leves-moderadas y el patrón de lesiones graves (n = 5). Solamente en 2 corderos los pulmones fueron de "aspecto normal", un cordero del grupo tratado con solución salina, y un cordero del grupo tratado con Curosurf[®], respectivamente. Un cordero del grupo de Synsurf tuvo un patrón de lesión leve. No hubo diferencias visibles claras entre grupos con respecto a la distribución de los patrones de lesiones.

35 La Tabla 11 muestra los cálculos para el contenido de agua en los pulmones tras la muerte, tal como se refleja mediante las proporciones h/s y h/s/h. No se observaron diferencias significativas en la fracción de peso húmedo pulmonar, expresada en la proporción h/s/h entre los tres grupos. De forma similar, el peso seco pulmonar, expresado como la proporción h/s, no mostró diferencias significativas entre ninguno de los grupos.

Tabla 11: Proporción húmedo/seco (H/S) de los pulmones y proporción húmedo/seco/húmedo (H/S/H) de los pulmones. Media \pm DE

	Proporción H/S Media \pm DE	Proporción H/S/H Media \pm DE
Synsurf	6,2 (0,65)	0,40 (0,11)
Curosurf [®]	5,67 (1,12)	0,38 (0,08)
Solución salina	6,49 (1,57)	0,38 (0,16)

Discusión

5 Se llevó a cabo un ensayo controlado para comparar la oxigenación sistémica y la mecánica pulmonar en corderos prematuros deficientes de tensioactivo pulmonar tras la instilación de solución salina (control), Synsurf o el tensioactivo pulmonar de origen porcino Curosurf[®], antes de la primera respiración. El tratamiento con los tensioactivos pulmonares produjo diferencias claras del estado de oxigenación, pero no de la distensibilidad respiratoria dinámica. A lo largo del periodo de estudio, la sustitución del tensioactivo pulmonar con Synsurf dio como resultado una respuesta de oxigenación mejorada más sostenida en comparación con la de los animales tratados con Curosurf[®] o con solución salina.

10 Aunque la distensibilidad respiratoria dinámica solamente se incrementó de manera significativa en los grupos tratados con tensioactivo pulmonar, sus perfiles temporales no difirieron de manera significativa de la de los animales tratados con solución salina. Como en el Ejemplo 2, de nuevo se observó un incremento de la distensibilidad con relación a una disminución concurrente de la oxigenación a lo largo del tiempo, pero esta vez solamente en los grupos tratados con Curosurf[®] y con solución salina. No se registró una "disparidad" o divergencia entre la oxigenación y la distensibilidad en el grupo de Synsurf tal como se observó en el Ejemplo 2, en el que se administró el tensioactivo pulmonar como tratamiento de rescate.

15 En la presente memoria se ha demostrado la eficacia *in vivo* de una preparación de tensioactivo pulmonar sintético en estudios con modelos animales. Aunque siguen sin aclararse los mecanismos precisos mediante los cuales Synsurf afecta a la duración y al grado de la respuesta de oxigenación en los animales, se sugiere que el carácter similar a anfifílico (Kurutz y Lee. 2002; Lipp. *et al.* 1996; Baatz *et al.* 1990) del complejo polimérico simple podría ser la clave para imitar la función tan necesaria de SP-B.

Ejemplo 5: Tensioactivo pulmonar como potenciador de la permeabilidad de fármacos a través de los tejidos

25 Se investigó el papel de la composición de tensioactivo de esta invención en la permeabilidad de agentes químicos/fármacos y péptidos a través de pulmón, arteria, mucosa bucal porcina y mucosa vaginal humana.

Métodos

Tensioactivos pulmonares usados

- Synsurf (Tensioactivo pulmonar sintético nuevo)
- 30 • Exosurf genérico (preparado mediante un método estándar)
- Curosurf[®] (Tensioactivo pulmonar de origen porcino)
- Survanta[®] (Tensioactivo pulmonar de origen bovino)

Materiales

35 El estudio fue aprobado por la Comisión para Investigación Humana de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Stellenbosch. Se obtuvo pulmón y mucosa bucal porcina del centro veterinario. La mucosa vaginal se obtuvo de pacientes postmenopáusicas tras histerectomías vaginales. Las muestras se colocaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) o medio esencial mínimo de Eagle (MEM) sin L-glutamina y NaHCO₃, y se transportó al laboratorio. Las muestras se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -85 °C durante 6 meses.

40 Los fármacos / péptidos / compuestos químicos que diferían ampliamente en tamaño molecular y lipofilia usados en los estudios de permeabilidad fueron:

- ³H-17 β -estradiol (P_M = 272 Da). Este fármaco se usa para la terapia de sustitución de hormonas durante el climaterio femenino.

- ^3H -arecolina reducida ($P_M = 141$ Da). Este alcaloide tiene la capacidad de provocar cáncer oral, así como fibrosis submucosa.
- ^3H -hidrocortisona ($P_M = 362,4$ Da). Este es un corticosteroide que se da de manera natural usado principalmente por su acción antiinflamatoria e inmunosupresora, o para la terapia de sustitución de hormonas.
- ^3H -dexametasona ($P_M = 392,5$ Da). Este es uno de los análogos sintéticos potentes de cortisol usados para la prevención y el tratamiento del edema cerebral, y es el fármaco de elección para la inhibición de la producción de ACTH.
- ^3H -vasopresina ($P_M = 1084$ Da). Esta es una hormona peptídica antidiurética importante por su acción sobre el riñón.
- MDY-19 marcado con FITC ($P_M = 2409,5$ Da), un portador peptídico, y MEA-5 marcado con FITC ($P_M = 2911,4$ Da), un péptido microbicida.

Los potenciadores para mejorar la permeabilidad fueron tensioactivos pulmonares basados en dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Synsurf y Exosurf se prepararon como se describió en el Ejemplo 1, mientras Curosurf[®] y Survanta[®] se adquirieron.

Aparato de cinética de difusión

Se determinó la cinética de difusión a través de pulmón y mucosa bucal porcina, así como a través de mucosa vaginal humana, mediante el uso de un sistema de difusión de flujo continuo.

Se recortaron muestras de tejido de diferentes mucosas y se montaron siete discos (± 4 mm) en las celdas de difusión de flujo (área expuesta $0,039$ cm²). Antes del comienzo del experimento, se equilibraron los discos de tejido durante 10 min con PBS, pH 7,4 a 20 °C en los compartimentos donante y aceptor de las celdas de difusión. Tras el equilibrado, se extrajo el PBS del compartimento donante y se sustituyó con 1 ml de compuesto / péptido tritiado ($0,1 - 1,4$ μCi). Se extrajeron alícuotas (100 μl) en minutos de cada uno de los siete compartimentos donantes para la determinación de la concentración en la celda donante a tiempo cero (C_0). Se bombeó PBS (pH 7,4) a través de las cámaras aceptoras a un caudal de 1,5 ml/h. Se recogieron fracciones a intervalos de 2 h durante 48 h. Se añadió un cóctel de centelleo (10 ml) a cada muestra recogida y se contó en un contador de centelleo líquido hasta que se alcanzó un valor 2-s del 1%. El apagamiento para cada muestra se corrigió automáticamente en el contador. Los valores de flujo (J) a través de las membranas se calcularon por medio de la relación: $J = Q / A \cdot t$ ($\text{dpm} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$), en la que Q = cantidad de sustancia que atraviesa la membrana (dpm). A = área de la membrana expuesta (cm²) y t = tiempo de exposición (min). Los péptidos se determinaron mediante espectrometría de fluorescencia.

Cinética en el estado estacionario: Cuando no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) (ANOVA y prueba de rangos múltiples de Duncan) entre los valores de flujo a lo largo de al menos 2 intervalos de tiempo consecutivos, se supuso que se había alcanzado un estado estacionario (cinética en equilibrio) para una muestra particular.

Análisis estadístico: Se usó un ensayo t para datos independientes con corrección de Welch para investigar las posibles diferencias entre las medias de flujo a intervalos de 2 h. Se usó un nivel de significación de $p < 0,05$. La comparación de las curvas completas se realizó mediante el uso de la prueba F.

Resultados

Synsurf aumentó la tasa de flujo de arecolina a través del tejido pulmonar porcino en comparación con Exosurf (Figura 15). El valor de p para Synsurf / Arecolina fue $p = 3,75311 \text{ E}^{-11}$, mientras el de Exosurf / Arecolina fue $p = 0,9554$. El valor de n para Synsurf fue 31; para Exosurf fue 17; y para Arecolina fue 33.

Tanto Synsurf como Exosurf aumentaron la tasa de flujo de arecolina a través de la mucosa vaginal humana (Figura 16). Las diferencias entre los valores de Synsurf y Exosurf no fueron significativas. El valor de p para Synsurf / Arecolina fue $p = 1,0388 \text{ E}^{-5}$; para Exosurf / Arecolina fue $p = 1,807 \text{ E}^{-14}$; y para Synsurf / Exosurf fue $p = 0,74029$. El valor de n para Synsurf fue 18; para Exosurf fue 17; y para Arecolina fue 7.

Tanto Synsurf como Exosurf aumentaron la tasa de flujo de estradiol a través del tejido pulmonar porcino (Figura 17). Sin embargo, el aumento con Synsurf fue mucho mayor. El valor de p para Synsurf / estradiol fue $p = 4,51 \text{ E}^{-26}$; para Exosurf / estradiol fue $p = 8,9 \text{ E}^{-10}$; y para Synsurf / Exosurf fue $p = 1,3 \text{ E}^{-9}$. El valor de n para Synsurf fue 24; para Exosurf fue 13; y para estradiol fue 15.

Synsurf aumenta la tasa de flujo de arecolina a través de la mucosa bucal porcina en comparación con Exosurf (Figura 18). El valor de p para Synsurf / Arecolina fue $p = 5,58 \text{ E}^{-10}$; para Synsurf / Exosurf fue $p = 3,5 \text{ E}^{-12}$; y para Exosurf / Arecolina fue $p = 0,1355$. El valor de n para Synsurf fue 11; para Exosurf fue 17; y para Arecolina fue 12.

Tanto Synsurf como Curosurf[®] aumentaron la tasa de flujo de arecolina a través del tejido pulmonar porcino (sin

diferencia estadística), mientras Survanta[®] no proporcionó ningún aumento (no significativo estadísticamente) (Figura 19). El valor de p para Synsurf / Arecolina fue $p = 3,75 E^{-11}$; para Curosurf[®] / Arecolina fue $p = 1,7 E^{-10}$; para Survanta[®] / Arecolina fue $p = 0,1183$; y para Synsurf / Curosurf[®] fue $p = 0,4745$. El valor de n para Synsurf fue 31; para Curosurf[®] fue 17; para Survanta[®] fue 16; y para Arecolina fue 33.

- 5 Synsurf aumentó la tasa de flujo de estradiol a través del tejido de arteria pulmonar porcina (Figura 20). El valor de p para Synsurf / estradiol fue $p = 8,15 E^{-6}$, y el valor de n para Synsurf fue 14, y para estradiol fue 10.

- 10 El Synsurf diluido (concentración $\frac{1}{2}$) y sin diluir aumentó las tasas de flujo de vasopresina a través del tejido pulmonar porcino (Figura 21). El valor de p para Synsurf [1] / vasopresina fue $p = 2,4 E^{-25}$; y para Synsurf [0,5] / vasopresina fue $p = 2,44 E^{-35}$. El valor de n para Synsurf [0,5] fue 15; para Synsurf [1] fue 18; y para vasopresina fue 26.

El Synsurf diluido (concentración $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$) aumentó las tasas de flujo de dexametasona a través del tejido pulmonar porcino, mientras el Synsurf sin diluir retrasó el flujo a través del tejido pulmonar (Figura 22). El valor de p para Synsurf [0,25] / dexametasona fue $p = 2,02 E^{-11}$; para Synsurf [0,5] / dexametasona fue $p = 0,00014$. El valor de n para Synsurf [0,25] fue 20; para Synsurf [0,5] fue 18; para dexametasona fue 22; y para Synsurf [1] fue 21.

- 15 Synsurf aumentó la tasa de flujo de hidrocortisona de manera estadísticamente significativa a través del tejido pulmonar porcino (Figura 23). El valor de p para Synsurf / Hidrocortisona fue $p = 4,37 E^{-5}$, y el valor de n para Synsurf fue 24; y para Hidrocortisona fue 26.

- 20 La comparación de las curvas completas no mostró un aumento estadístico del péptido portador MDY-19 con Synsurf (Figura 24). El valor de p para Synsurf + MDY-19 fue $p = 0,1652$; y el valor de n para MDY-19 fue 38; para MEA-5 fue 16; y para MDY-19 + Synsurf fue 20.

Discusión

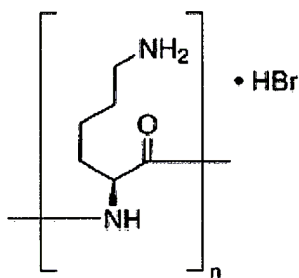
- 25 En estos estudios, los solicitantes descubrieron que el tensioactivo pulmonar basado en DPPC sintético Synsurf aumentó la permeabilidad de compuestos químicos / péptidos / fármacos de diferentes pesos moleculares (141 - 2911,4 Da) a través del tejido pulmonar, bucal, arterial y vaginal. Aunque su relevancia clínica como potenciador de la permeabilidad todavía se tiene que investigar adicionalmente, el potencial de Synsurf mostrado en los resultados anteriores podría producir varias formulaciones de administración nuevas para una amplia diversidad de agentes farmacéuticos.

Referencias

- Agu, R.U., Ugwoke, M.I., Armand, M. y Kinget, R. The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. *Respiratory Research*. 2, 198-209, 2001.
- 5 Bambang-Oetomo S., Boss A.F., De Lei L., Okken A., Van Sonderen L., Halliday H.L. y Walti H. Immune response after treatment of newborn infants with respiratory syndrome. *Biol. Neonate*, 64, 341-345, 1993.
- De Vonderweid U., Spagnolo A., Cariani G., Donzelli G., Forleo V., Calipa M.T., Patriarca V. Area variations in birth weight- and cause of death-specific neonatal mortality rates in Italy. *J. Perinatol.* 17, 60-64, 1997.
- Department of Health 1994.
- 10 Fujiwara T., Chida S. A., Watabe J., Maeta H., Morita T. y Abe T. Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease. *Lancet* 1, 55-59, 1980.
- Gross N.J. Pulmonary surfactant: unanswered questions. *Thorax*, 50, 325- 327, 1995.
- Gumbleton, M. y Taylor, G. The role of caveolae in pulmonary macromolecule absorption: Mechanistic and kinetic considerations. *Respiratory Drug Deliver* 8, 1 - 12, 2002.
- 15 Haitsma, J.J., Lachmann, U. y Lachmann, B. Exogenous surfactant as a drug delivery agent. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 47, 197-207, 2001.
- Halliday H.L. Overview of clinical trials comparing natural and synthetic surfactants. *Biol Neonate*, 67, 32-47, 1995.
- Halliday H.L. Surfactant replacement therapy. *Pediatr. Pulmonol.* 11, 96- 97, 1995
- Kliegman R.M. Neonatal technology, perinatal survival, social consequences, and the perinatal paradox. *Am. J. Public. Health*, 85, 909-913, 1995.
- 20 Lachmann B., Robertson B., Vogel J. *In vivo* lung lavage as an experimental model of respiratory distress syndrome. *Acta Anaesth Scand.* 24, 231-236, 1980.
- Luke B., Williams C., Minogue J. y Keith L. The changing pattern of infant mortality in the US: The role of prenatal factors and their obstetrical implications. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 40, 199-212, 1993.
- Mallmsten M. *Surfactants and polymers in drug delivery*. Marcel Dekker Inc. Nueva York. 2002.
- 25 Mc Guire, J.F. Surfactant in the middle ear and Eustachian tube: A review. *International J of Pediatrics Otorhinolaryngology*. 66, 1-15, 2002.
- Pettit, D.K. y Gombotz W.R. The development of site-specific drug delivery systems for protein and peptide biopharmaceuticals. *TIBTECH*. 16, 343-349, 1998.
- 30 Sayani, P. y Chien, Y.W. Systemic delivery of peptides and proteins across absorptive mucosae. *Critical Reviews in therapeutic drug carrier systems*. 3, 85-184, 1996.
- Schwartz R.M., Luby A.M., Scanlon J.W., Kellogg R.J. Effect of surfactant on morbidity, mortality, and resource use in newborn infants weighing 500 to 1500 g N. *Eng. J. Med.* 330, 1476-1480, 1994.
- Soll R.F. y McQueen M.C. Respiratory distress syndrome. En: Sinclair J.C., Bracken M.B, Eds. *Effective care of the newborn infant*. Oxford University Press, págs. 325-358, 1992.
- 35 Soll R.F. Appropriate surfactant usage in 1996. *Eur. J. Pediatr.* 155, S8-S13, 1996.
- Stolz J.W., McCormic M. Restricting access to neonatal intensive care: Effect on mortality and economic savings. *Pediatrics*, 101, 344-348, 1998.
- Strayer D.S., y Robertson B. Surfactant as an immunogen implications for therapy of respiratory distress syndrome. *Acta Pediatr.* 81, 446-447, 1992.
- 40 Van der Bijl, P. y van Eyk, A.D. Human vaginal mucosa as a model of buccal mucosa for *in vitro* permeability studies: An overview. *Current Drug Delivery*. 1, 129-135, 2004.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
un vehículo lipídico; y un complejo peptídico de
poli-L-lisina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y
- 5 poli-ácido L-glutámico o poli-ácido L-aspartico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que el complejo peptídico tiene una región de carga neutralizada y una región cargada positivamente.
2. Una composición según la reivindicación 1, en la que la sal de poli-L-lisina es poli-L lisina.HBr.
3. Una composición según la reivindicación 2, en la que la poli-L-lisina.HBr es de fórmula (I) y n oscila de 100 a 135, preferiblemente de 103 a 135, y más preferiblemente de 103 a 119

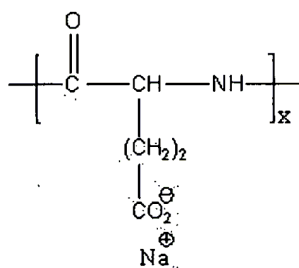


10

Fórmula (I).

4. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la sal de poli-ácido L-glutámico es la sal sódica de poli-ácido L-glutámico.
5. Una composición según la reivindicación 4, en la que la sal sódica de poli-ácido L-glutámico es de fórmula (II) y x es al menos 50, preferiblemente al menos 68, y más preferiblemente al menos 86

15



Fórmula (II).

6. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la cadena de poli-L-lisina es más larga que la cadena de poli-ácido L-glutámico o poli-ácido L-aspartico en al menos 17 residuos, preferiblemente en al menos 50 residuos y más preferiblemente en al menos 85 residuos.

20

7. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende:

- dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC);
- fosfatidilglicerol (PG);
- hexadecanol;
- 25 tiloxapol;
- poli-L-lisina.HBr;
- sal sódica de poli-ácido L-glutámico;
- cloruro sódico; y
- un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25

8. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para el uso en la prevención o el tratamiento de una afección relacionada con una disfunción o deficiencia del tensioactivo pulmonar seleccionada de la enfermedad de la membrana hialina (EMH), síndrome de dificultad respiratoria (SDR), intoxicación por hidrocarburos, casi-ahogamiento, enfermedades pulmonares relacionadas con el VIH/SIDA, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA) o lesión pulmonar aguda (LPA), asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), tuberculosis (TB) o síndrome respiratorio agudo grave (SRAG).
9. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un compuesto o composición farmacéutica para el uso en la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad o afección médica.
10. El uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar una afección relacionada con una disfunción o deficiencia del tensioactivo pulmonar seleccionada de la enfermedad de la membrana hialina (EMH), síndrome de dificultad respiratoria (SDR), intoxicación por hidrocarburos, casi-ahogamiento, enfermedades pulmonares relacionadas con el VIH/SIDA, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA) o lesión pulmonar aguda (LPA), asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), tuberculosis (TB) o síndrome respiratorio agudo grave (SRAG).
11. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que es para el uso en un método para incrementar la permeabilidad de un compuesto o composición farmacéutica a través de una membrana de un sujeto.
12. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que es para el uso como vehículo para un compuesto o composición farmacéutica.
13. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en la que el compuesto o composición farmacéutica es un agente antineoplásico, antiinflamatorio, agente inmunosupresor, agente antidiurético, péptido portador, péptido microbicida, inhibidor de ACTH, análogo de cortisol o agente para terapia de sustitución de hormonas.
14. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que es adecuada para la administración a un sujeto mediante inhalación, intubación o administración pulmonar directa.
15. Un método para la preparación de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, y el método comprende las etapas de:
- mezclar dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), hexadecanol, y fosfatidilglicerol (PG) en un disolvente orgánico;
 - eliminar el disolvente orgánico y obtener una película de fosfolípidos;
 - mezclar, en una disolución acuosa, poli-L-lisina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y poli-ácido L-glutámico o poli-ácido L-aspártico, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y obtener un complejo peptídico;
 - añadir el complejo peptídico a la película de fosfolípidos;
 - agitar la mezcla; y
 - añadir tiloxapol.

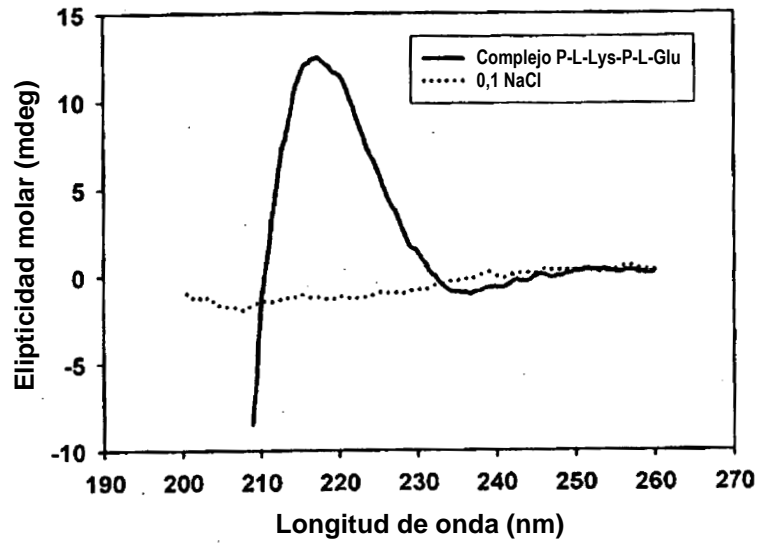


Figura 1

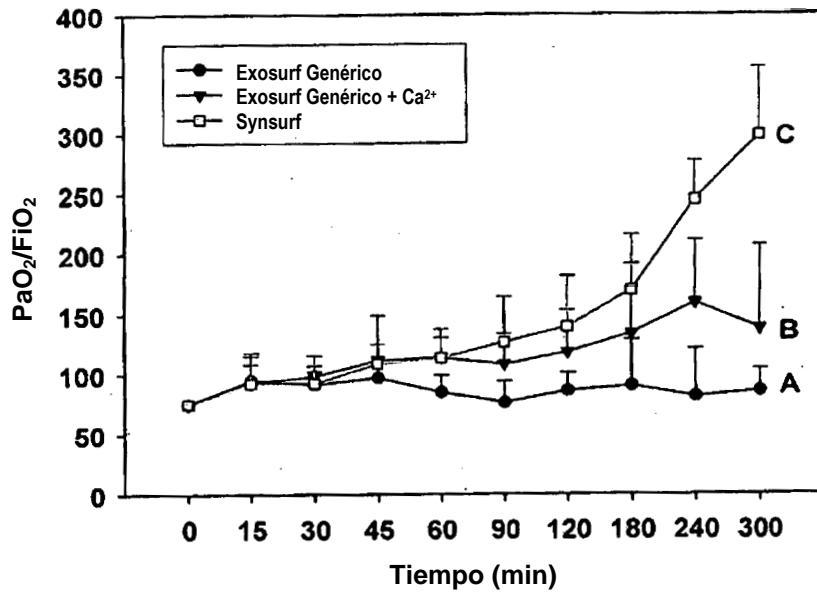


Figura 2

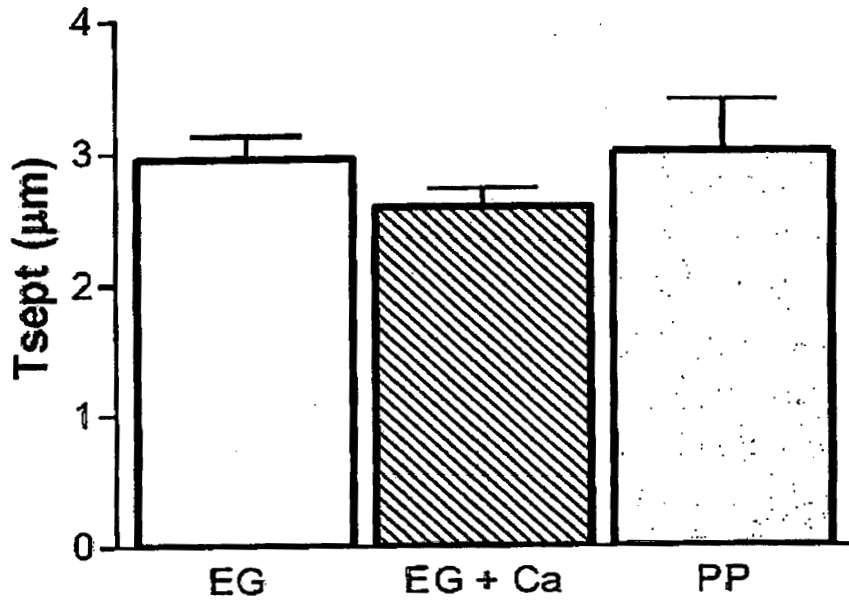


Figura 3

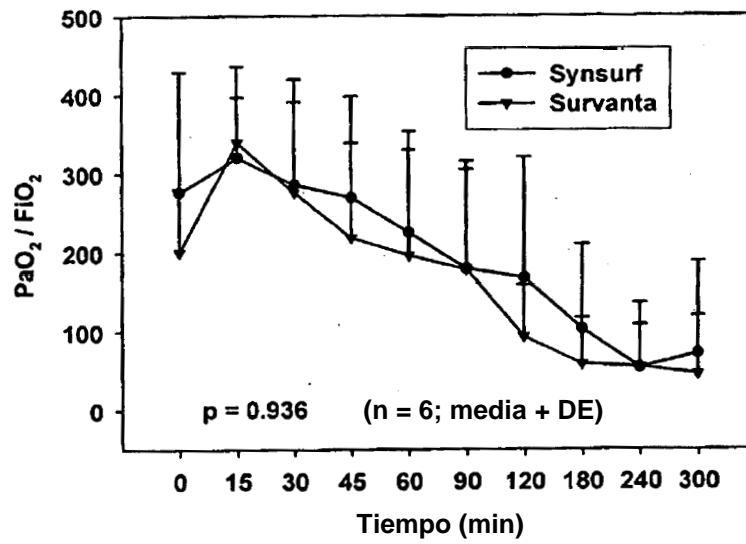


Figura 4

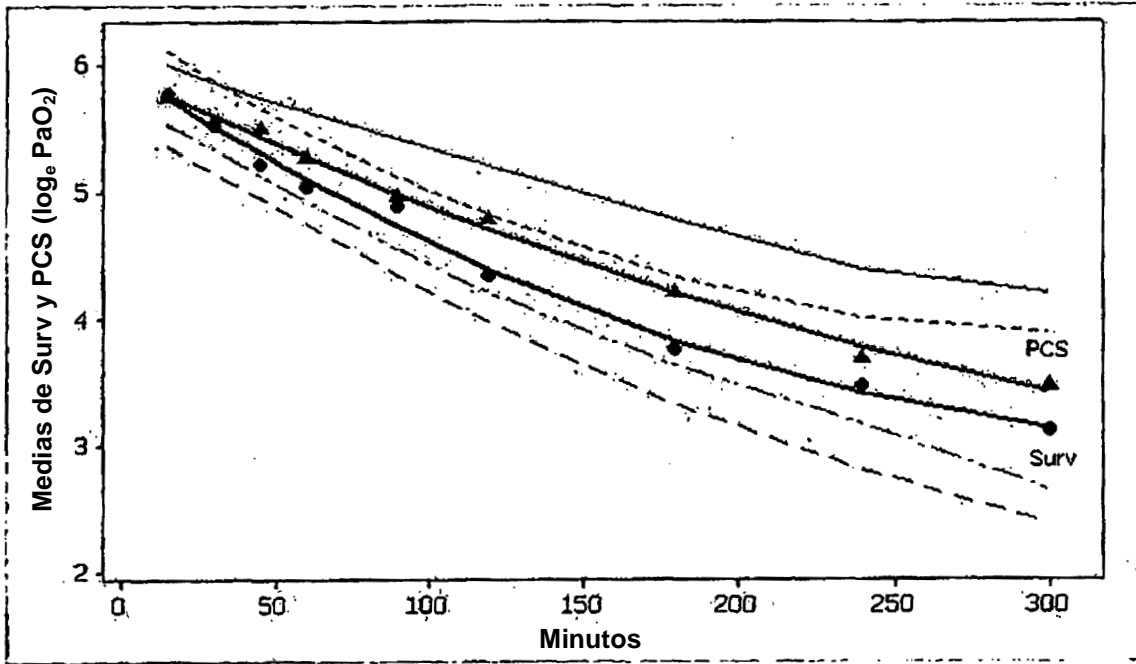


Figura 5

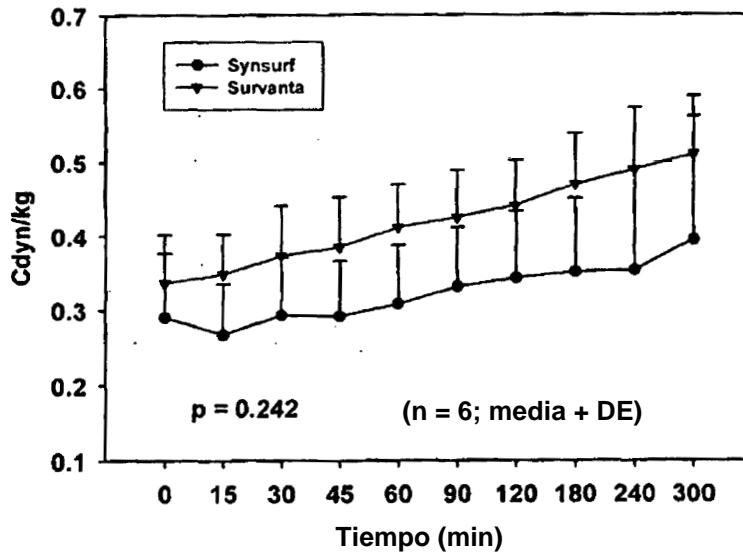


Figura 6

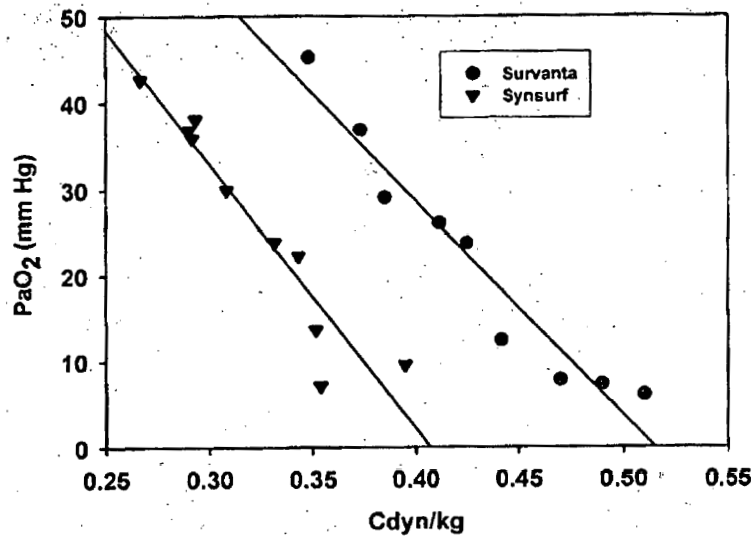


Figura 7

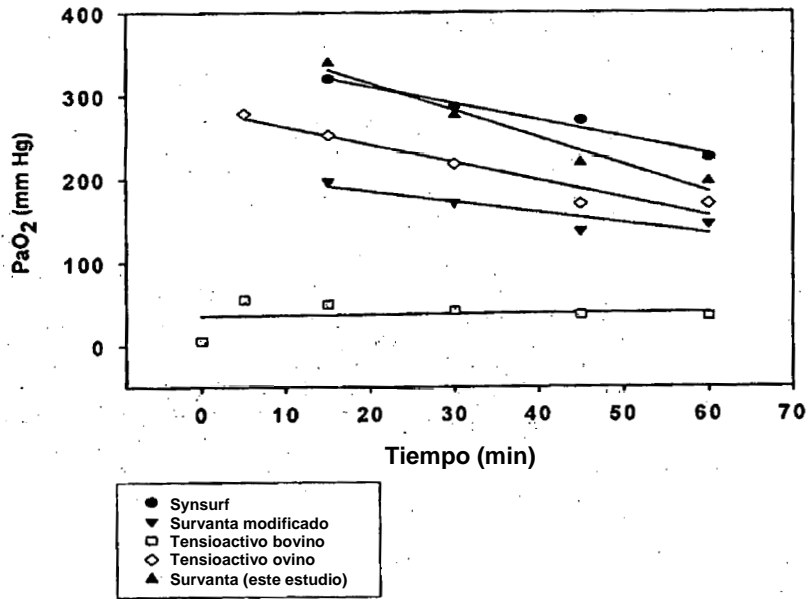


Figura 8

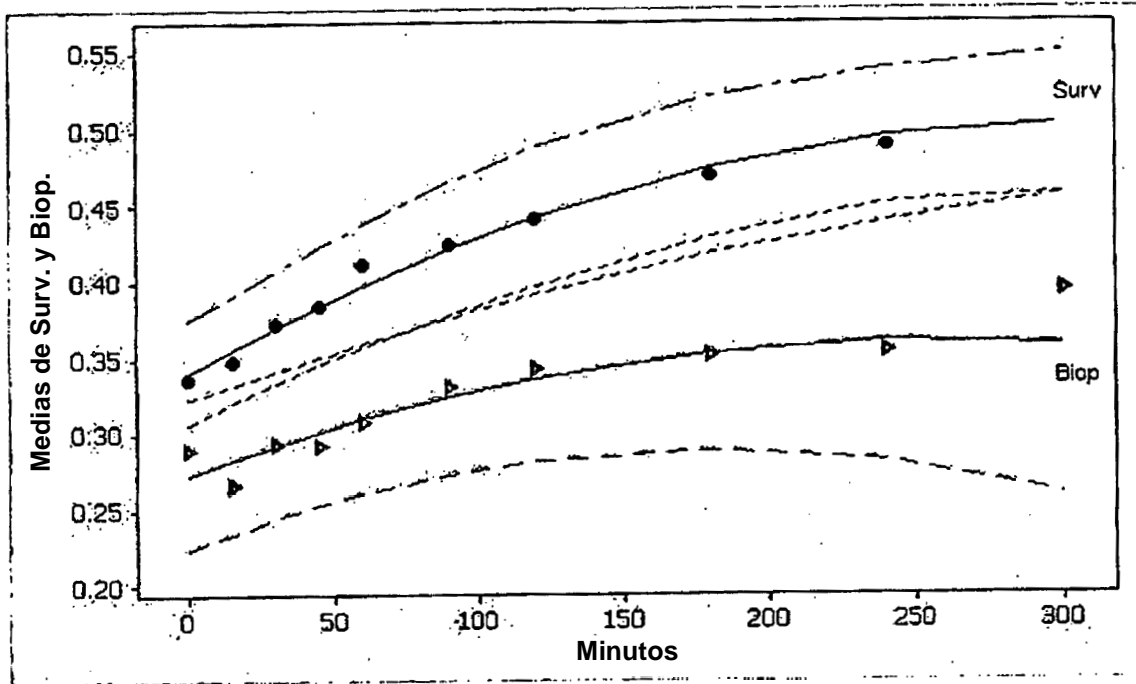


Figura 9

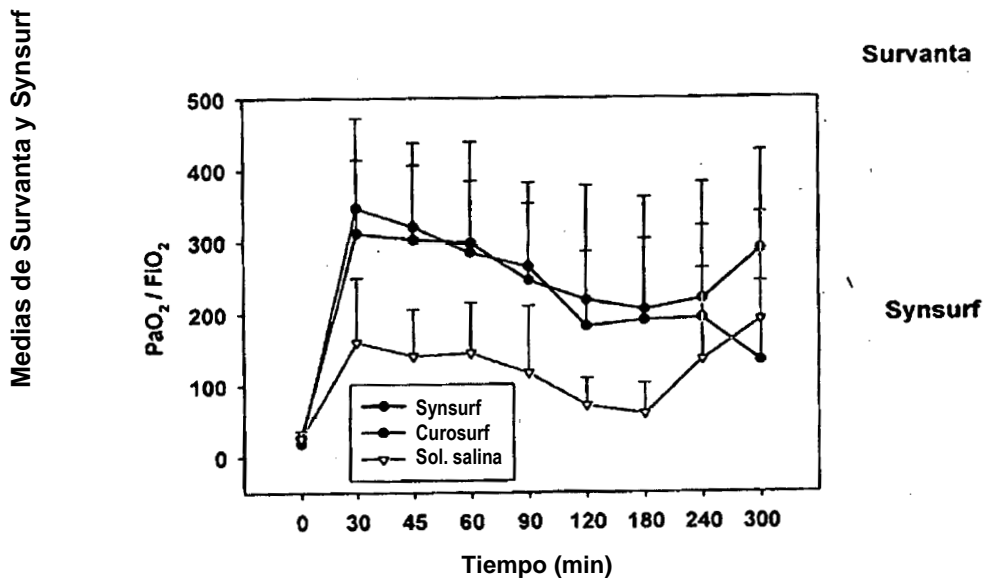


Figura 10

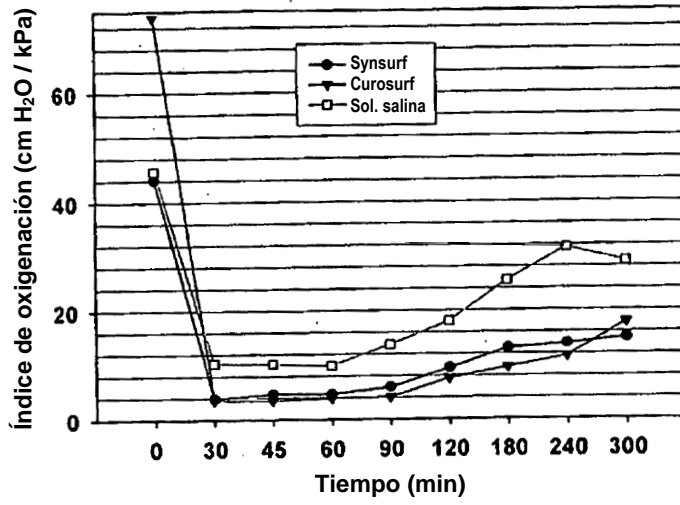


Figura 11

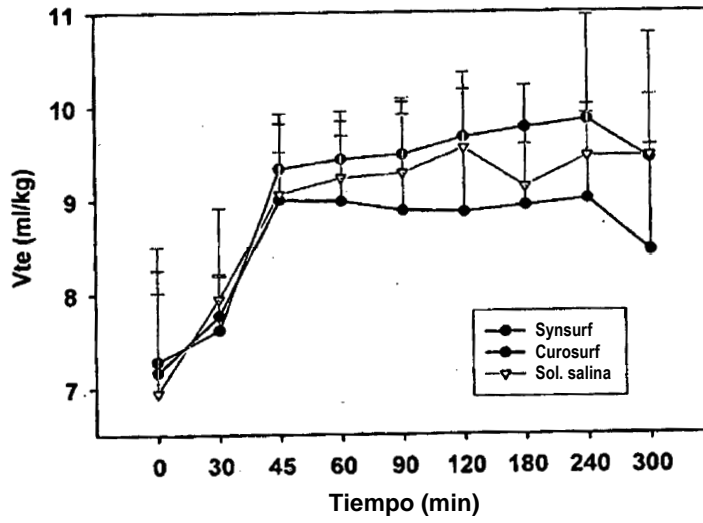


Figura 12

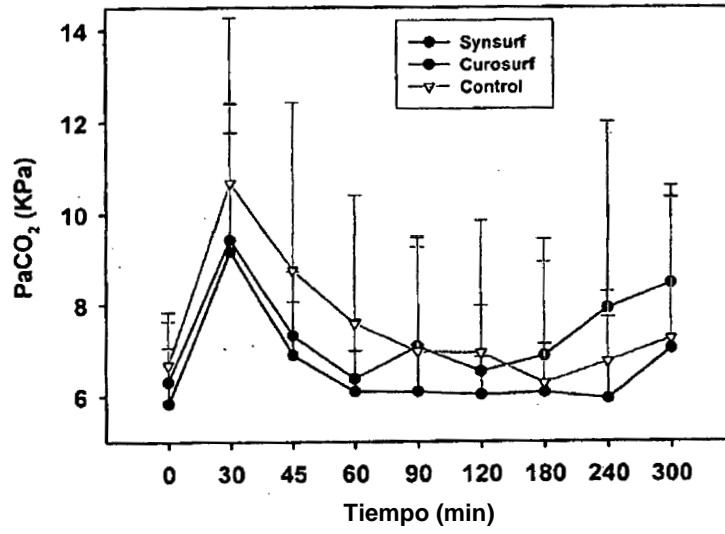


Figura 13

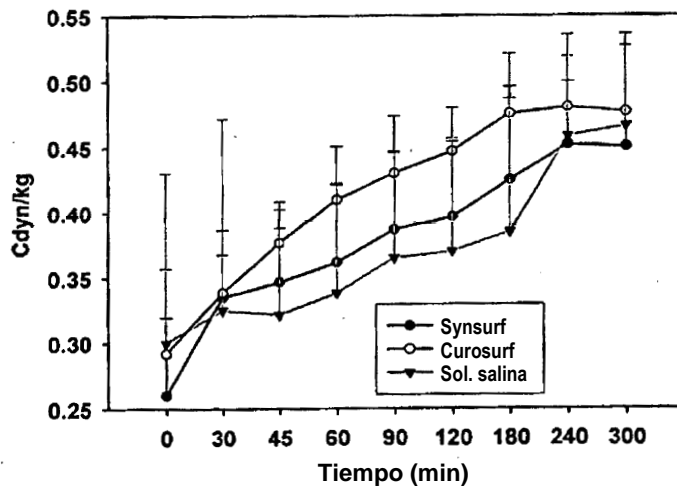


Figura 14

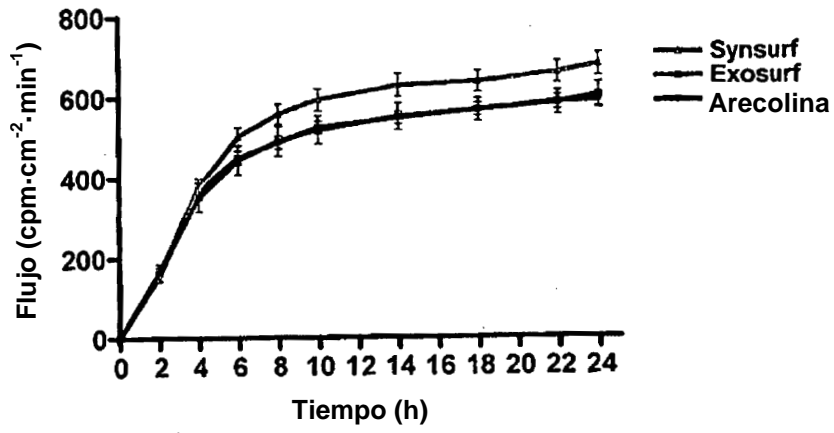


Figura 15

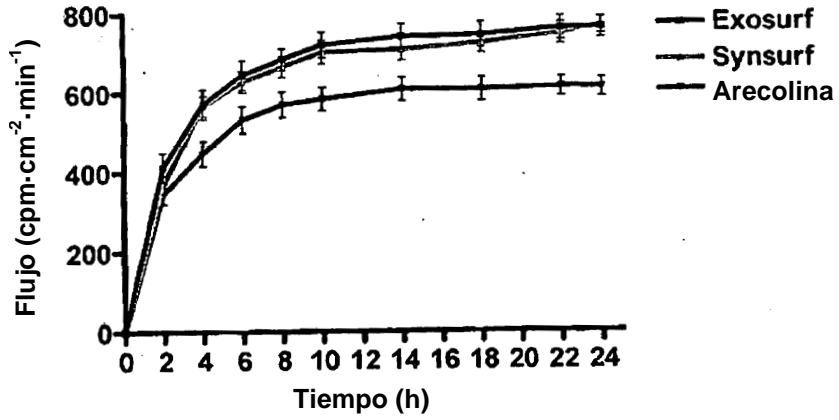


Figura 16

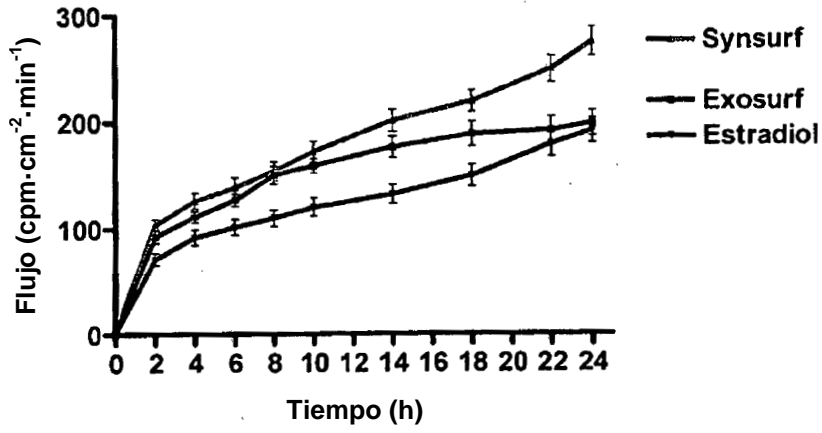


Figura 17

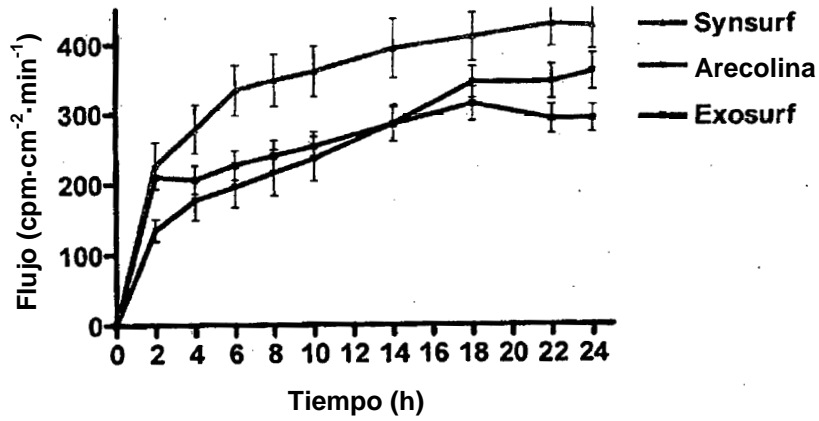


Figura 18

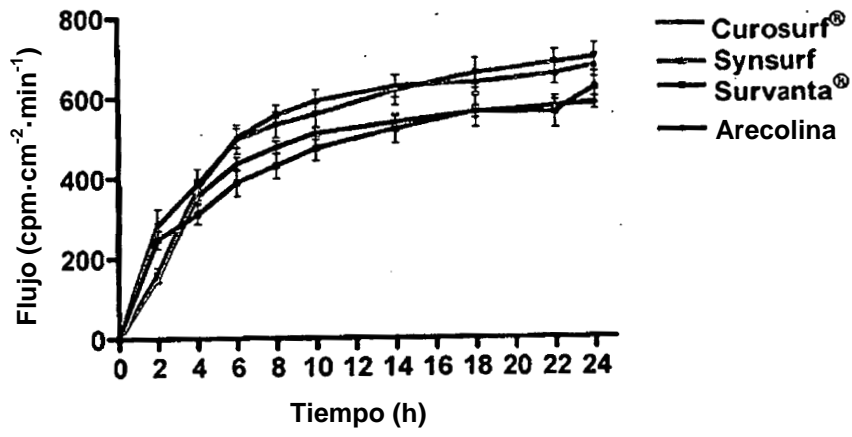


Figura 19

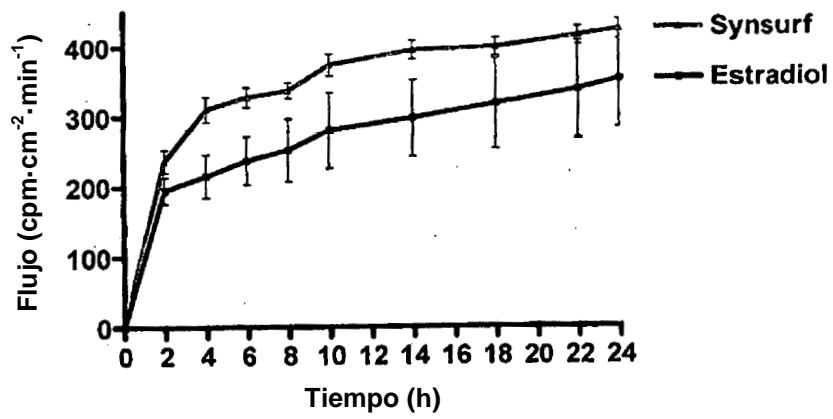


Figura 20

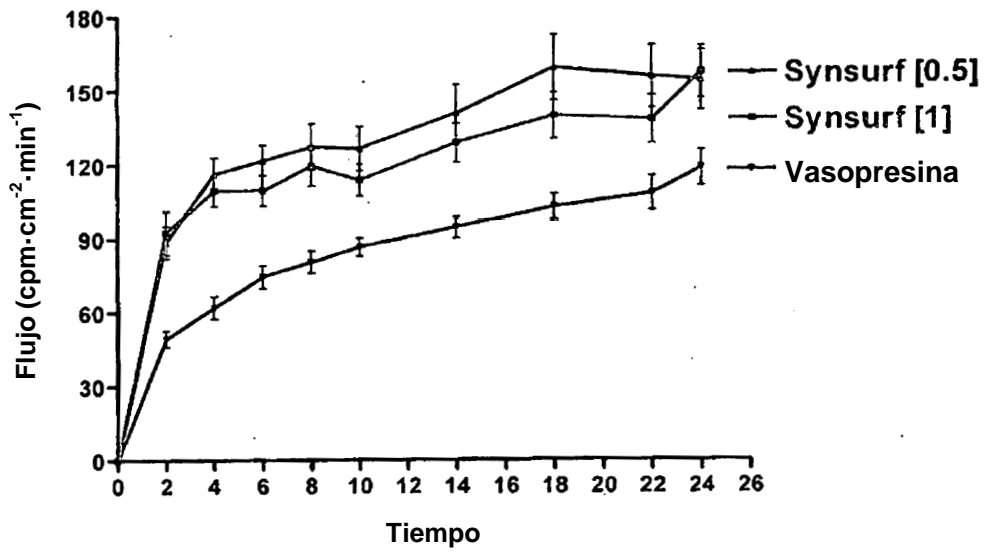


Figura 21

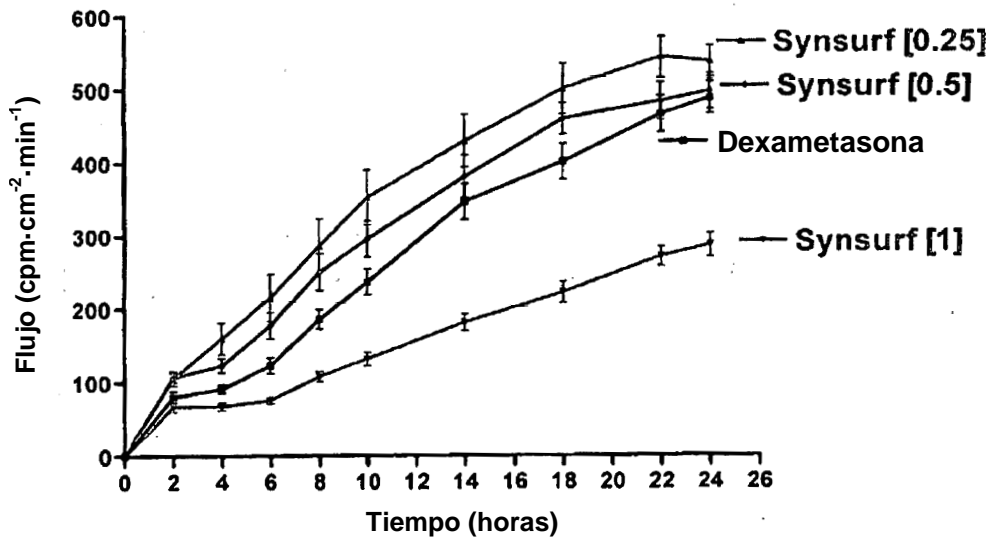


Figura 22

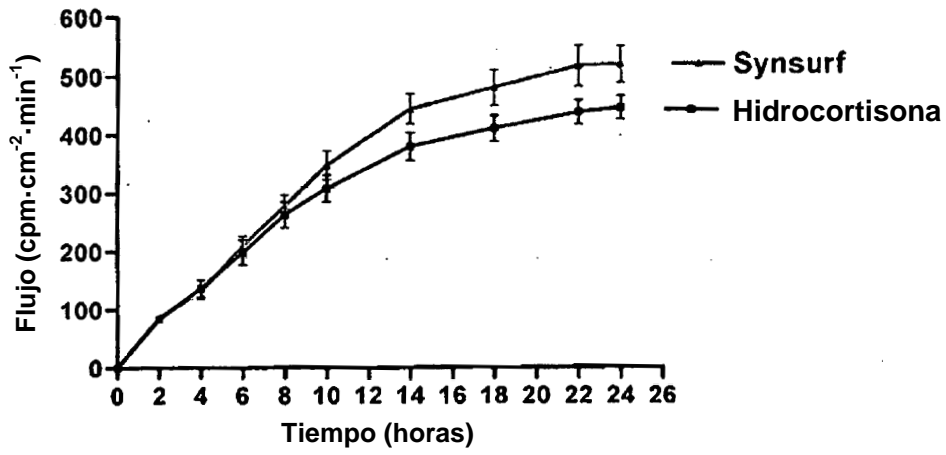


Figura 23

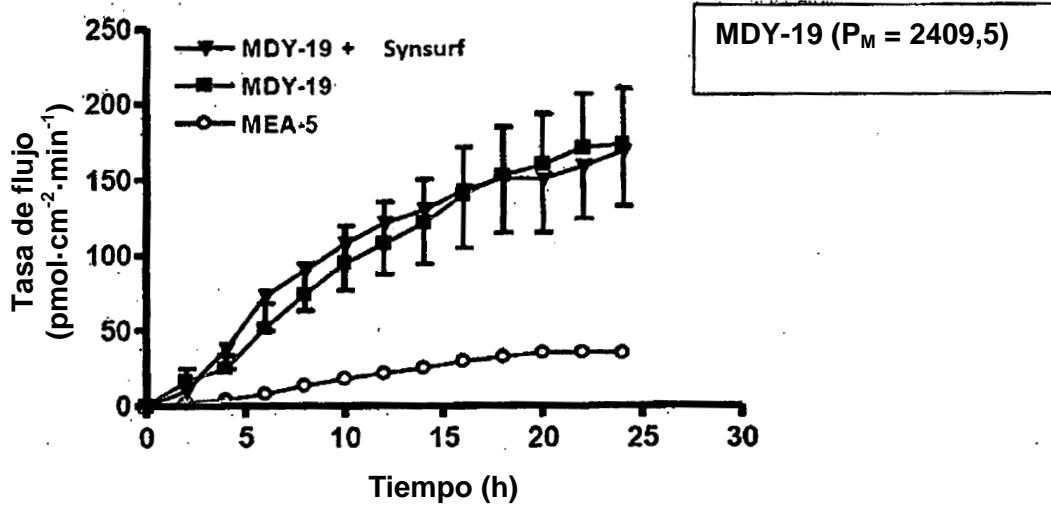


Figura 24