

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 974**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/785** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2010 PCT/EP2010/003293**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.12.2010 WO10139442**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2010 E 10724708 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2438086**

54 Título: **Composición tensioactiva reconstituida mejorada que contiene análogos de proteína tensioactiva B (SP-B) y proteína tensioactiva C (SP-C)**

30 Prioridad:

**05.06.2009 EP 09162052**

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

**05.07.2017**

73 Titular/es:

**CHIESI FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)  
Via Palermo, 26/A  
43100 Parma, IT**

72 Inventor/es:

**PIVETTI, FAUSTO;  
BOCCHI, MONICA y  
SOLIANI RASCHINI, ANNAMARIA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 621 974 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**

Composición tensioactiva reconstituida mejorada que contiene análogos de proteína tensioactiva B (SP-B) y proteína tensioactiva C (SP-C)

**Campo técnico**

5 La presente invención se dirige a un tensioactivo pulmonar reconstituido que es adecuado para la profilaxis y/o el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (SDR) y otros trastornos respiratorios.

**Antecedentes de la invención**

10 El pulmón humano se compone de un gran número de sacos de aire pequeños, llamados alvéolos, en los que los gases se intercambian entre la sangre y los espacios de aire de los pulmones. En individuos sanos, este intercambio está mediado por la presencia de un complejo tensioactivo que contiene una proteína que impide que los pulmones se colapsen al final de la espiración.

El complejo tensioactivo pulmonar está compuesto principalmente por lípidos y contiene cantidades menores de diversas proteínas. La ausencia de niveles adecuados de este complejo da lugar a un mal funcionamiento del pulmón. Este síndrome se llama síndrome de dificultad respiratoria (SDR) y afecta frecuentemente a los prematuros.

15 Dicho síndrome se trata eficazmente con preparaciones tensioactivas naturales modificadas disponibles comercialmente extraídas de los pulmones de animales, tales como la preparación del patrón oro conocida como Curosurf®.

Los principales constituyentes de estas preparaciones tensioactivas son fosfolípidos y proteínas hidrófobas tensioactivas B y C (SP-B y SP-C).

20 Debido a los inconvenientes de las preparaciones tensioactivas a partir de tejidos animales, tales como la complicación del procedimiento de producción, y la posible contaminación viral y/o la inducción de reacciones inmunológicas, los tensioactivos sintéticos se encuentran disponibles en la técnica.

25 Dichos tensioactivos sintéticos pueden ser simplemente mezclas de compuestos sintéticos, principalmente fosfolípidos y otros lípidos, y se conocen como tensioactivos "artificiales"; a pesar de que se han utilizado en la práctica clínica durante muchos años, su eficacia no es comparable a la del tensioactivo natural modificado.

Los tensioactivos artificiales que también contienen proteínas/péptidos tensioactivos se encuentran también actualmente en fase de desarrollo. Se denominan tensioactivos "reconstituidos" o "tensioactivos biomiméticos".

30 No obstante, de acuerdo con la literatura disponible, ninguno de los tensioactivos reconstituidos desarrollados hasta el momento ha mostrado una eficacia en términos de distensibilidad pulmonar comparable a la de los tensioactivos extraídos de los animales. Además, producen volúmenes de gas en los pulmones deficientes y un grado de permeabilidad alveolar al final de la espiración, y se requiere una ventilación con una presión positiva al final de la espiración (PPFE) a fin de lograr una actividad *in vivo* comparable a la conseguida con tensioactivos naturales modificados (Johansson J y col. *J Appl Physiol* 2003, 95, 2055-2063; Davis AJ y col. *Am J Respir Crit Care* 1998; 157, 553-559).

35 Una posible explicación es que los tensioactivos reconstituidos en desarrollo no reproducen el perfil proteínico completo de los tensioactivos naturales modificados, ya que solo comprenden un componente proteínico (péptido).

Por otra parte, además de una buena eficacia, las composiciones tensioactivas deben exhibir asimismo una baja viscosidad para permitir la preparación de una suspensión concentrada en un medio acuoso.

40 La posibilidad de preparar una suspensión concentrada en un pequeño volumen es de hecho una característica de especial importancia para su administración a los recién nacidos con un peso muy bajo.

El sistema péptido:fosfolípido es una mezcla bastante compleja cuyas propiedades dependen en gran medida de la composición de la mezcla de fosfolípidos, así como de la combinación de fosfolípidos/péptidos específica.

La presencia de un péptido adicional afectará a las propiedades reológicas de la composición haciendo que el sistema sea aún más complicado.

45 En la técnica anterior, se han desvelado tensioactivos reconstituidos que comprenden análogos de SP-B y SP-C que se asemejan a proteínas tensioactivas humanas, por ejemplo en los documentos WO0076535, WO2008011559 y WO2008044109.

No obstante, ninguna de las composiciones desveladas en los mismos ha demostrado poseer propiedades óptimas en términos de distensibilidad pulmonar así como propiedades reológicas, en particular, la viscosidad.

50 En consecuencia, subsiste la necesidad de preparaciones tensioactivas reconstituidas que tienen una eficacia

comparable a la de los tensioactivos extraídos de pulmones de animales así como las propiedades reológicas óptimas que permiten su fácil entrega y distribución a la parte broncoalveolar de los pulmones tras la administración.

La presente invención aborda este problema proporcionando una composición tensioactiva reconstituida con propiedades mejoradas en términos de distensibilidad y viscosidad pulmonares.

5 **Sumario de la invención**

La presente invención se dirige a un tensioactivo reconstituido, que comprende:

a) de 1,2 a 1,8 % en peso de un análogo polipeptídico de la proteína tensioactiva SP-C nativa que consiste en la secuencia representada por la fórmula IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLILGALLLGL (SEQ ID NO: 1);

10 b) de 0,1 a 0,5 % en peso de un análogo polipeptídico de la proteína tensioactiva SP-B nativa que consiste en la secuencia representada por la fórmula CWLCRALIKRIQALIPKGGRLLPQLVCRLVLRCS (SEQ ID NO: 2);  
un fosfolípido monoinsaturado y un fosfolípido saturado en una relación en peso que oscila entre 45:55 a 55:45; todas las cantidades se calculan en relación con el peso total del tensioactivo reconstituido.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el tensioactivo reconstituido reivindicado solo o en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

15 La presente invención también proporciona el uso del tensioactivo reconstituido reivindicado como medicamento.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso del tensioactivo reconstituido reivindicado para la profilaxis y/o el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (SDR) y otros trastornos respiratorios.

20 Además, la invención proporciona el uso del tensioactivo reconstituido reivindicado para la fabricación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (SDR) y otros trastornos respiratorios.

La invención también proporciona un procedimiento para la profilaxis y/o el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (SDR) y otros trastornos respiratorios, dicho procedimiento comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del tensioactivo reconstituido mencionado previamente.

25 En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento que comprende la administración del tensioactivo reconstituido diluido de la invención al pulmón mediante una técnica de lavado para eliminar el material perjudicial y/o el exudado inflamatorio para expandir el pulmón y para mejorar la función pulmonar.

30 Finalmente, la invención también se dirige a un kit, que comprende: a) el tensioactivo reconstituido anteriormente mencionado en forma de polvo en una primera forma de dosificación unitaria; b) un vehículo farmacéuticamente aceptable en una segunda forma de dosificación unitaria; y c) un medio que funciona como un envase para contener dichas primera y segunda formas de dosificación.

**DEFINICIONES**

"Actividad del tensioactivo" para una preparación tensioactiva se define como la capacidad para reducir la tensión superficial.

35 La eficacia *in vitro* de preparaciones tensioactivas exógenas se ensaya habitualmente mediante la medición de su capacidad para reducir la tensión superficial utilizando un aparato adecuado, tal como la balanza de Wilhelmy y el surfactómetro de burbuja cautiva.

La eficacia *in vivo* de preparaciones tensioactivas exógenas se ensaya habitualmente mediante la medición de dos parámetros:

- 40 i) el volumen de ventilación pulmonar que es un índice de la distensibilidad pulmonar y  
ii) el volumen de gas en los pulmones que es un índice de la expansión de aire alveolar o la permeabilidad al final de la espiración, y por tanto, de la capacidad para formar una película fosfolípida estable en los alvéolos al final de la espiración.

45 Una cantidad "terapéuticamente eficaz", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una cantidad de tensioactivo reconstituido capaz de prevenir, evitar, reducir o eliminar la enfermedad o trastornos respiratorios asociados con la falta o disfunción de tensioactivo endógeno.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" o "fisiológicamente tolerable" se refiere a composiciones, medios, disolventes, sales, capaces de ser administrados a un ser humano sin la producción de efectos fisiológicos indeseables.

50 La expresión "análogo polipeptídico de la proteína tensioactiva SP-C nativa", significa un polipéptido que tiene una

secuencia de aminoácidos en la que, en comparación con la proteína SP-C nativa, los aminoácidos están ausentes y/o se han reemplazado con otros aminoácidos, siempre que el polipéptido, en una mezcla con fosfolípidos, muestre actividad tensioactiva pulmonar (como es demostrable por ensayos de eficacia *in vitro* e *in vivo*).

5 La expresión "análogo polipeptídico de la proteína tensioactiva SP-B nativa", significa un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos en la que, en comparación con la proteína SP-B nativa, los aminoácidos están ausentes y/o se han reemplazado con otros aminoácidos, siempre que el polipéptido, en una mezcla con fosfolípidos, muestre actividad tensioactiva pulmonar (como es demostrable por ensayos de eficacia *in vitro* e *in vivo*).

10 "Recombinante" cuando se utiliza con referencia, por ejemplo, a una célula, o a un ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogo o por la alteración de un ácido nucleico o proteína nativo.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "aproximadamente" aplicado a un valor del punto, indica una variabilidad de  $\pm 1\%$ .

15 Los fosfolípidos son lípidos en los que un ácido graso se ha reemplazado con un grupo fosfato y una molécula orgánica simple. La clase más común de fosfolípidos que puede hallarse en las preparaciones tensioactivas son: fosfatidilcolinas (FC), fosfatidiletanolamina (FE), fosfatidilglicerol (FG), fosfatidilinositol (FI), y fosfatidilserina (FS).

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

En particular, las especies que se tienen en cuenta en la aplicación son:

20 - 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, también conocida como dipalmitoilfosfatidilcolina (DPFC), que es un derivado saturado, y 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol, también conocido como palmitoiloleilfosfatidilglicerol (POFG), que es un derivado monoinsaturado.

"Polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en la presente memoria para referirse a un polímero de restos de aminoácidos.

25 Las secuencias de aminoácidos se muestran de acuerdo con el código de una letra con el aminoácido que lleva el grupo amino libre en el extremo izquierdo (extremo amino terminal) y el aminoácido que lleva el grupo carboxilo libre en el extremo derecho (extremo carboxi terminal).

30 Todos los restos de aminoácidos identificados en la presente memoria se encuentran en una configuración en L natural y las secuencias identificadas en la presente memoria se indican de acuerdo con las abreviaturas convencionales para los restos de aminoácidos. Para disipar dudas, el derivado del aminoácido L-nor-leucina se denomina en la presente memoria como nLeu, y L-ornitina se abrevia como Orn.

### **Figuras**

35 La Figura 1 muestra los resultados en términos de volúmenes de ventilación pulmonar (ml/kg) como una función del tiempo/presión del tensioactivo reconstituido de la invención (N3) frente a Curosurf<sup>®</sup> y los animales no tratados (n = número de animales).

La Figura 2 muestra los resultados en términos de volúmenes de gas en los pulmones (ml/kg) del tensioactivo reconstituido de la invención (N3) frente a Curosurf<sup>®</sup> y los animales no tratados (n = número de animales).

### **Descripción detallada de la invención**

40 Un diseño experimental de múltiples factores se construyó para investigar cómo la viscosidad se ve afectada por las cantidades relativas de los fosfolípidos y los análogos de SP-B y SP-C en las composiciones tensioactivas desveladas genéricamente en el documento WO 2008044109, así como la forma en que dichos componentes se ven influenciados respecto de otros tensioactivos reconstituidos.

45 Se ha descubierto que la cantidad de análogo de SP-B tiene un efecto significativo en la viscosidad de la composición tensioactiva, y por tanto, el contenido del análogo de SP-B debe mantenerse lo más bajo posible compatible con una eficacia terapéutica con el fin de reducir la viscosidad del tensioactivo reconstituido a niveles aceptablemente bajos.

50 El documento WO 2008044109 se dirige al uso de relaciones DPPC:POPG preferentemente iguales o superiores a 7:3, en presencia de un análogo de SP-B. El documento WO 2008044109 se pronuncia sobre la viscosidad de dichas composiciones tensioactivas. Hasta ahora se ha descubierto que cuando la cantidad de análogo de SP-B en el tensioactivo se minimiza, relaciones elevadas entre fosfolípidos disaturados, tales como DPPC y fosfolípidos insaturados, tales como POPG, conducen a una viscosidad inaceptablemente alta de la composición correspondiente. No obstante, se ha de superar este problema mediante la preparación de tensioactivos de SP-B bajo en el que la relación de fosfolípido insaturado a fosfolípido saturado se reduce por debajo de las relaciones

desveladas en la técnica anterior, preferentemente a aproximadamente 1:1, y se demuestra que estas composiciones tensioactivas tienen una viscosidad sorprendentemente baja, lo que las hace útiles para todas las aplicaciones clínicas.

En una realización, la presente invención se dirige a un tensioactivo reconstituido, que comprende:

- 5 a) de 1,2 a 1,8 % en peso de un análogo polipeptídico de la proteína tensioactiva SP-C nativa que consiste en la secuencia representada por la fórmula IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLILLILGALLLGL (SEQ ID NO: 1);  
 b) de 0,1 a 0,5 % en peso de un análogo polipeptídico de la proteína tensioactiva SP-B nativa que consiste en la secuencia representada por la fórmula CWLCRALIKRIQALIPKGGRLLPQLVCRLVLRCS (SEQ ID NO: 2.);

- 10 un fosfolípido monoinsaturado y un fosfolípido saturado en una relación en peso que oscila entre 45:55 a 55:45; calculándose todas las cantidades en relación con el peso total del tensioactivo reconstituido.

En el tensioactivo reconstituido de la invención, el componente análogo de la proteína SP-C constituye preferentemente entre 1,4 y 1,6 %, y más preferentemente aproximadamente 1,5 % en peso del peso total del tensioactivo reconstituido.

- 15 En los tensioactivos reconstituidos de la invención, el componente análogo de la proteína SP-B constituye preferentemente entre 0,2 y 0,4 %, más preferentemente aproximadamente 0,2 % en peso del peso total del tensioactivo reconstituido.

- 20 El tensioactivo reconstituido de la invención puede comprender ventajosamente fosfolípidos saturados, tales como dipalmitoilfosfatidilcolina (DPFC) y dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPFG) y fosfolípidos monoinsaturados, tales como palmitoiloleilfosfatidilcolina (POFC) y palmitoiloleilfosfatidilglicerol (POFG).

El fosfolípido saturado preferente para su uso de acuerdo con la invención es DPFC, mientras que el fosfolípido monoinsaturado preferente es POFG.

- 25 Ventajosamente, el peso combinado de los fosfolípidos constituye al menos el 90 %, ventajosamente al menos el 95 %, preferentemente al menos el 97,7 %, más preferentemente el 98,3 % del peso total del tensioactivo reconstituido.

En una realización, la presente invención se dirige a un tensioactivo reconstituido, que comprende:

- 30 a) aproximadamente 1,5 % en peso de un análogo polipeptídico de la proteína tensioactiva SP-C nativa que consiste en la secuencia representada por la fórmula IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLILLILGALLLGL (SEQ ID NO: 1);  
 b) aproximadamente 0,2 % en peso de un análogo polipeptídico de la proteína tensioactiva SP-B nativa que consiste en la secuencia representada por la fórmula CWLCRALIKRIQALIPKGGRLLPQLVCRLVLRCS (SEQ ID NO: 2);  
 c) 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPFC) y 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (POFG) en una relación en peso de aproximadamente 50:50;

- 35 calculándose todas las cantidades en relación con el peso total del tensioactivo reconstituido.

En una realización específica, la presente invención está dirigida a una composición tensioactiva reconstituida, que comprende:

- 40 a) aproximadamente 1,5 % en peso de un análogo polipeptídico de la proteína tensioactiva SP-C nativa que consiste en la secuencia representada por la fórmula IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLILLILGALLLGL (SEQ ID NO: 1);  
 b) aproximadamente 0,2 % en peso de un análogo polipeptídico de la proteína tensioactiva SP-B nativa que consiste en la secuencia representada por la fórmula CWLCRALIKRIQALIPKGGRLLPQLVCRLVLRCS (SEQ ID NO: 2);  
 45 c) aproximadamente 49,15 % en peso de 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPFC); y  
 d) aproximadamente 49,15 % en peso de 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (POFG);

calculándose todas las cantidades en relación con el peso total del tensioactivo reconstituido.

En una realización preferente, el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 puede encontrarse en forma de una molécula unida a disulfuro, en el que los enlaces disulfuro intramoleculares se encuentran entre los dos residuos de cisteína en las posiciones 1 y 33 y/o entre los dos residuos de cisteína en las posiciones 4 y 27.

- 50 El polipéptido de la SEQ ID NO: 1 se ha referido en el documento WO 2008044109 (incorporado en la presente memoria en su totalidad por referencia) como SP-C33 (Leu), mientras que el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 se ha referido en el documento WO 2008044109 como Mini-B (Leu), y su forma ligada a disulfuro como ox-Mini-B (Leu).

En una realización aún más preferente, el tensioactivo reconstituido de la invención consiste esencialmente en los componentes a), b), c) y opcionalmente d) en las cantidades reivindicadas.

Ventajosamente ambos polipéptidos pueden estar presentes en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Dichas sales incluyen, por ejemplo, sales de ácido clorhídrico, ácido acético, y ácido trifluoroacético.

- 5 Preferentemente ambos polipéptidos están presentes en la composición en forma de acetatos.

También POFG puede encontrarse ventajosamente en forma de sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, como sal de sodio (POFG Na).

Los polipéptidos de la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 se pueden preparar de acuerdo con procedimientos sintéticos o técnicas recombinantes adecuadamente conocidas por el experto en la materia.

- 10 Un sumario excelente de las muchas técnicas disponibles puede hallarse en J.M. Steward y J.D. Young, "*Solid Phase Peptide Synthesis*", W.H. Freeman Co., San Francisco, 1969, y J. Meienhofer, "*Hormonal Proteins and Peptides*", vol. 2, pág. 46, Academic Press (Nueva York), 1983 para la síntesis peptídica en fase sólida, y E. Schroder y K. Kubke, "*The Peptides*", vol. 1, Academic Press (Nueva York), 1965 para la síntesis en solución clásica.

- 15 Los polipéptidos pueden prepararse preferentemente mediante la técnica sintética en fase sólida descrita inicialmente por Merrifield, en *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154 (1963). Otras técnicas de síntesis de polipéptidos se pueden hallar, por ejemplo, en M. Bodanszky y col., *Peptide Synthesis*, John Wiley & Sons, 2ª Ed., (1976), así como en otros trabajos de referencia conocidos por los expertos en la materia.

Los grupos protectores adecuados para su uso en dichas síntesis pueden hallarse en los textos anteriores, así como en J.F.W. McOmie, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, Nueva York, NY (1973).

- 20 Por ejemplo, ambos polipéptidos pueden prepararse como se describe en el documento WO2008044109.

Las dosis eficaces del tensioactivo reconstituido de la invención para el tratamiento de una enfermedad, tal como SDR, como se describe en la presente memoria, varían en función de muchos factores diferentes, incluyendo el tipo de enfermedad, medios de administración, peso y estado fisiológico del paciente, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico.

- 25 En general, la dosis está comprendida entre 0,01 mg a 10 g por kg de peso corporal, preferentemente de 0,1 a 1 g por kg de peso corporal y la frecuencia de administración puede variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, una dosis de aproximadamente 50 mg/kg, 100 mg/kg, o 200 mg/kg se administra en una dosis. Para su uso en recién nacidos, son generalmente suficientes una o dos administraciones.

- 30 Aunque las necesidades pueden variar en función de la gravedad de la enfermedad respiratoria y/u otras variables, la determinación de los intervalos óptimos de las dosificaciones eficaces está dentro de la habilidad del experto en la materia.

La presente invención también se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprenden el tensioactivo reconstituido de la invención.

- 35 Dichas formulaciones se administran ventajosamente en forma de una solución, dispersión, suspensión o polvo seco. Preferentemente, dichas composiciones comprenden el tensioactivo reconstituido disuelto o suspendido en un disolvente fisiológicamente tolerable adecuado o el vehículo de resuspensión, tal como agua o una solución acuosa salina fisiológica (0,9 % p/v de NaCl).

Las formulaciones de la presente invención pueden comprender soluciones acuosas, preferentemente estériles, que también pueden comprender agentes de tamponamiento de pH, diluyentes y otros aditivos adecuados.

- 40 Las formulaciones pueden presentarse en envases de dosis unitaria o múltiples dosis, por ejemplo ampollas y viales sellados, o pueden almacenarse en un estado congelado o deshidratado por congelación (liofilizado) que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su uso.

Preferentemente, el tensioactivo reconstituido de la invención se suministra como una suspensión estéril en una solución acuosa salina fisiológica tamponada en viales de vidrio de un solo uso.

- 45 Las formulaciones farmacéuticas pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales adecuadamente conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de mezclar los polipéptidos y los fosfolípidos en presencia de un disolvente orgánico. El disolvente se elimina por diálisis o evaporación bajo nitrógeno y/o exposición al vacío o mediante otras técnicas apropiadas bien conocidas por el experto en la materia, tales como liofilización.

- 50 Ventajosamente, la cantidad de disolventes residuales puede ser inferior a 0,1 %, preferentemente inferior a 0,05 %, más preferentemente inferior a 0,003 %, incluso más preferentemente inferior a 0,001 % en peso.

El polvo obtenido es uniforme y llega a asociarse íntimamente con vehículos líquidos o con vehículos sólidos finamente divididos o ambos.

5 La mezcla de polipéptidos y fosfolípidos puede esterilizarse antes de eliminar el disolvente, por ejemplo, mediante filtración estéril. En otras realizaciones, la composición tensioactiva reconstituida se esteriliza completamente de acuerdo con procedimientos adecuadamente conocidos en la materia.

La administración del tensioactivo reconstituido de la invención se lleva a cabo de una manera conocida por el experto en la materia, por ejemplo, mediante instilación intratraqueal (infusión o bolo o a través de un catéter), por administración por pulverización o nebulización.

10 Como se desvela en la presente memoria, la invención contempla el uso de formulaciones tensioactivas tanto concentradas como diluidas, en función del uso particular, como se describe adicionalmente en la presente memoria. Las composiciones tensioactivas concentradas se utilizan normalmente para las administraciones de tipo "bolo", mientras que las composiciones tensioactivas diluidas se utilizan normalmente para las administraciones de tipo "lavado".

15 Ventajosamente, la viscosidad de dichas formulaciones es inferior a 20 cP, preferentemente inferior a 15 cP, en la determinación con un viscosímetro común disponible en el mercado de acuerdo con los procedimientos adecuadamente conocidos en la materia.

Ventajosamente, para la administración de tipo "bolo", la concentración tensioactiva reconstituida en términos de peso por ml de solución o suspensión (después de la adición de un vehículo líquido) oscila en el intervalo comprendido entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/ml, preferentemente entre 5 y 80 mg/ml.

20 En una realización preferente de la invención, cuando el tensioactivo reconstituido se administra por instilación intratraqueal como una suspensión en solución salina fisiológica (0,9 % p/v de cloruro de sodio en agua), la concentración es de aproximadamente 80 mg/ml.

25 Por lo tanto, una realización preferente de la invención se refiere a una formulación farmacéutica en forma de suspensión acuosa en solución salina fisiológica que comprende aproximadamente 80 mg/ml de un tensioactivo reconstituido constituido por

- a) aproximadamente 1,5 % en peso de un análogo polipeptídico de la proteína tensioactiva SP-C nativa que consiste en la secuencia representada por la fórmula IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLILLILGALLLGL (SEQ ID NO: 1);
- 30 b) aproximadamente 0,2 % en peso de un análogo polipeptídico de la proteína tensioactiva SP-B nativa que consiste en la secuencia representada por la fórmula CWLCRALIKRIQALIPKGGRRLLPQLVCRLLVLRCS (SEQ ID NO: 2);
- c) aproximadamente 49,15 % en peso de 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DPFC); y
- d) aproximadamente 49,15 % en peso de 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (POFG);

calculándose todas las cantidades en relación con el peso total del tensioactivo reconstituido.

35 Normalmente, la viscosidad de dicha formulación es de aproximadamente  $9 \pm 3$  cP a 25 °C y  $8 \pm 3$  cP a 37 °C como se determina utilizando un viscosímetro de rotación común disponible en el mercado.

Cuando se utiliza para la administración de lavado, una concentración tensioactiva típica es de aproximadamente 0,1 a 20 mg/ml, y más preferentemente de aproximadamente 0,5 a 10 mg/ml (en términos de mg de tensioactivo por ml de solución o suspensión).

40 Puesto que depende de la concentración, la viscosidad de las formulaciones diluidas será aún menor.

Cuando se utiliza como un tratamiento farmacéutico, las formulaciones que comprenden el tensioactivo reconstituido de la presente invención se pueden administrar ya sea solas u opcionalmente en conjunto con otros compuestos o composiciones que se utilizan en el tratamiento de enfermedades o trastornos respiratorios. Por ejemplo, si un sujeto está siendo tratado por un trastorno respiratorio provocado por una infección bacteriana, entonces el tensioactivo reconstituido de la presente invención se puede administrar en combinación con otro compuesto utilizado para tratar la infección bacteriana, tal como un antibiótico.

45 En caso contrario, en determinados casos, por ejemplo, para la prevención de complicaciones, tales como la displasia broncopulmonar, el tensioactivo reconstituido de la presente invención se puede administrar en combinación con corticosteroides, tales como budesónida y dipropionato de beclometasona.

50 En ciertas realizaciones, el tensioactivo reconstituido de la invención, y el vehículo de resuspensión pueden envasarse por separado al mismo tiempo en un medio que funciona como un envase adecuado. Dicho envasado distinto de los componentes en un medio que funciona como un envase adecuado también se describe como un kit.

Por lo tanto, esta invención también está dirigida a un kit, que comprende: a) el tensioactivo reconstituido de la

invención en forma de polvo en una primera forma de dosificación unitaria; b) un vehículo farmacéuticamente aceptable en una segunda forma de dosificación unitaria; y c) un medio que funciona como un envase para contener dichas primera y segunda formas de dosificación.

5 Preferentemente, el vehículo farmacéuticamente aceptable es una solución acuosa salina fisiológica, más preferentemente estéril.

Como se desvela en la presente memoria, una variedad de procedimientos para administrar el tensioactivo reconstituido y formulaciones del mismo de la presente invención están disponibles y se conocen adecuadamente por un experto en la materia.

10 Dependiendo del tipo de enfermedad, por ejemplo, un infante o un adulto con síndrome de dificultad respiratoria, pueden ser apropiados diferentes procedimientos de tratamiento.

Normalmente, el surfactante se administra a los pacientes por instilación endotraqueal (por ejemplo, los infantes prematuros) con ventilación con presión positiva continua o intermitente (VPPCI).

15 Alternativamente, el tensioactivo puede administrarse por medio del uso de un catéter fino colocado en la tráquea y la respiración del paciente es apoyada con dispositivos nasales especialmente diseñados, tales como máscaras, cánulas o tubos de acuerdo con la metodología conocida como presión aérea positiva continua nasal (PAPCn).

El último enfoque solo será posible con un tensioactivo que tiene una baja viscosidad ya que una alta viscosidad hará que el paso del tensioactivo a través del catéter fino sea más difícil.

20 En casos en los que el paciente padezca una patología de dificultad respiratoria asociada con la inflamación pulmonar, infección pulmonar o contusión pulmonar, pueden ser recomendadas modalidades de tratamiento particulares. En uno de dichos procedimientos terapéuticos, el lavado de los pulmones del paciente con una composición tensioactiva de la presente invención se realiza como un tratamiento único o múltiple.

El tensioactivo reconstituido de la invención es adecuado para prevenir, retrasar, aliviar, detener o inhibir el desarrollo de los síntomas o patologías asociadas con una enfermedad respiratoria.

25 En particular, resulta útil para la profilaxis y/o el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (SDR) en bebés nacidos prematuramente u otras enfermedades relacionadas con una disfunción del tensioactivo o una deficiencia de tensioactivo incluyendo lesión pulmonar aguda (LPA), SDR en adultos (SDRA), síndrome de aspiración de meconio (SAM) y displasia broncopulmonar (DBP).

30 También puede ser útil para la profilaxis y/o el tratamiento de otros trastornos respiratorios, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, infección respiratoria (por ejemplo, neumonía, *pneumocystis carinii*, fibrosis quística y virus sincitial respiratorio) así como para el tratamiento de otitis media serosa (oído pegajoso).

El siguiente ejemplo ilustra la invención con más detalle.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1 - Influencia de los componentes en la viscosidad

35 Un diseño experimental de múltiples factores se construye para evaluar la influencia de los componentes de la formulación en términos de viscosidad. Se ensayan diferentes porcentajes de los polipéptidos SP-C33 (Ieu) y ox-Mini-B (Ieu), así como diferentes relaciones de DPFC y POFG Na.

Todas las mezclas obtenidas se vuelven a suspender en una solución acuosa salina fisiológica (0,9 % p/v) en una concentración de 80 mg/ml.

40 La viscosidad se determina a 25 °C y a 37 °C utilizando un viscosímetro VISCO STAR Plus (Fungilab) que aplica una velocidad de rotación de 100 rpm.

En aras de la comparación, Curosurf® exhibe una viscosidad comprendida entre 6 y 10 mPas (1 mPas = 1 centipoise).

Los resultados se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1

Composición	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N8	N9
% SPC33 (Ieu)	0,5 %	0,5 %	1,5 %	1,5 %	1,5 %	1,5 %	1,5 %	0,5 %
% ox-MiniB (Ieu)	0,2 %	1 %	0,2 %	1 %	0,5 %	0,2 %	1 %	1 %

(continuación)

Composición	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N8	N9
DPFC/POFG Na	3	1	1	3	2	3	1	3
Viscosidad 25 °C (cP)	54,3	288	9,7	56,8	83,4	554,9	671,2	73,8
Viscosidad 37 °C (cP)	29,8	700	7,2	37,1	33,7	119,8	338,1	37,0

5 Los resultados indican que, a bajas concentraciones de ox-Mini-B (leu) y en presencia de una baja relación entre DPFC y POFG (columna N3 de la Tabla 1), la viscosidad de la mezcla también es muy baja. Estos resultados sugieren que, al minimizar la cantidad de análogo de SP-B en el tensioactivo y al reducir simultáneamente la concentración de fosfolípido saturado con respecto al fosfolípido insaturado, se puede obtener una composición con una viscosidad que es lo suficientemente baja como para ser utilizada en todas las aplicaciones tensioactivas, incluyendo el uso en la forma concentrada.

### Ejemplo 2 - Caracterización del tensioactivo reconstituido N3

10 Una mezcla de DPFC:POFG Na en la relación 1:1, SPC-33 (leu) y ox-Mini-B (leu) en las cantidades porcentuales indicadas para la composición N3 en la Tabla 1 del Ejemplo 1 se disuelve en cloroformo/etanol 98:2 (v/v).

El disolvente se evapora y el polvo resultante se hidrata posteriormente en 0,9 % p/v de solución acuosa de NaCl con agitación, para dar una concentración tensioactiva de 80 mg/ml.

La composición unitaria se expone en la Tabla 2.

15

**Tabla 2**

Ingrediente	%	Conc.
SP-C33 (leu)	1,5	1,2 mg/ml
Ox-Mini-B (leu)	0,2	0,16 mg/ml
DPFC	49,15	39,32 mg/ml
POFG Na	49,15	39,32 mg/ml

La viscosidad de dicha formulación se confirma que es muy baja, por ejemplo, aproximadamente 9 cP a 25 °C y aproximadamente 7 cP a 37 °C. Además, no cambia después de 6 meses de almacenamiento a 5 °C.

20 La formulación resulta ser también químicamente estable después de 6 meses de almacenamiento y la cantidad total de lisoformas de fosfolípidos detectadas por HPLC es inferior a 1 % en peso.

### Ejemplo 3 - Actividad *in vivo* del tensioactivo reconstituido N3

El tensioactivo reconstituido del Ejemplo 2 se analizó en conejos recién nacidos prematuros, obtenidos mediante histerectomía a la edad gestacional de 27 días. Los experimentos se llevan a cabo sin la aplicación de una presión positiva al final de la espiración (PPFE).

25 Los animales que recibieron Curosurf<sup>®</sup> sirven como controles positivos y la camada sin tratar como controles negativos.

Todas las preparaciones tensioactivas se administran en una concentración de 80 mg/ml y en una dosis convencional de 2,5 ml/kg.

30 Los conejos recién nacidos inmaduros se ventilan en paralelo con una secuencia estandarizada de las presiones de insuflación pico. Para abrir los pulmones, la presión se establece por primera vez en 35 cm de H<sub>2</sub>O durante 1 min. Tras esta maniobra de reclutamiento, la presión disminuye a 25 cm de H<sub>2</sub>O durante 15 min y más adelante a 20 y 15 cm de H<sub>2</sub>O.

Por último, la presión se eleva de nuevo a 25 cm de H<sub>2</sub>O durante 5 min, después de lo cual los pulmones se ventilan durante 5 min adicionales con nitrógeno y luego se extirpan para las mediciones de volumen de gas.

Los volúmenes de ventilación pulmonar y los volúmenes de gas en los pulmones, expresados como ml/kg, se miden y los resultados, dados como valores medios, se exponen en las Figuras 1 y 2, respectivamente.

- 5 A partir de la Figura 1, se puede apreciar que los animales tratados con el tensioactivo reconstituido de la invención muestran una mejora de los volúmenes de ventilación pulmonar ligeramente mejor que la conseguida tras la administración de Curosurf<sup>®</sup>. Este resultado sugiere que el tensioactivo artificial reconstituido de la invención puede ofrecer una mejor eficacia clínica que el patrón oro actual en el campo.

En lo que respecta a los volúmenes de gas en los pulmones, la Figura 2 demuestra que el tensioactivo reconstituido de la invención es capaz de dar lugar a un valor comparable con el del tensioactivo reconstituido ensayado en el Ejemplo 3 del documento WO 2008044109 que contiene una relación mayor entre DPFC y POFG (68:31).

- 10 Además, el valor del volumen de gas en los pulmones del tensioactivo reconstituido de la invención resulta ser resistente y reproducible.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición de tensioactivo reconstituido que comprende:

- a) de 1,2 a 1,8 % en peso de un análogo polipeptídico de la proteína tensioactiva SP-C nativa que consiste en la secuencia representada por la fórmula IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLIGALLLGL (SEQ ID NO: 1);
- b) de 0,1 a 0,5 % en peso de un análogo polipeptídico de la proteína tensioactiva SP-B nativa que consiste en la secuencia representada por la fórmula CWLCRALIKRIQALIPKGGRRLLPQLVCRLVLRCS (SEQ ID NO: 2);
- c) un fosfolípido monoinsaturado y un fosfolípido saturado en una relación en peso que oscila entre 45:55 a 55:45; en el que dicho fosfolípido monoinsaturado se selecciona entre el grupo que consiste en palmitoiloleilfosfatidilcolina (POFC) y palmitoiloleilfosfatidilglicerol (POFG), y en el que dicho fosfolípido saturado se selecciona entre el grupo que consiste en dipalmitoilfosfatidilcolina (DPFC) y dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPFG);

todas las cantidades siendo calculadas en relación con el peso total del tensioactivo reconstituido.

2. El tensioactivo reconstituido según la reivindicación 1, que comprende:

- a) aproximadamente 1,5 % en peso de un análogo polipeptídico de la proteína tensioactiva SP-C nativa que consiste en la secuencia representada por la fórmula IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLIGALLLGL (SEQ ID NO: 1);
- b) aproximadamente 0,2 % en peso de un análogo polipeptídico de la proteína tensioactiva SP-B nativa que consiste en la secuencia representada por la fórmula CWLCRALIKRIQALIPKGGRRLLPQLVCRLVLRCS (SEQ ID NO: 2);
- c) 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPFC) y 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (POFG) en una relación en peso de aproximadamente 50:50;

todas las cantidades siendo calculadas en relación con el peso total del tensioactivo reconstituido.

3. El tensioactivo reconstituido según la reivindicación 2, que comprende:

- a) aproximadamente 1,5 % en peso de un análogo polipeptídico de la proteína tensioactiva SP-C nativa que consiste en la secuencia representada por la fórmula IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLIGALLLGL (SEQ ID NO: 1);
- b) aproximadamente 0,2 % en peso de un análogo polipeptídico de la proteína tensioactiva SP-B nativa que consiste en la secuencia representada por la fórmula CWLCRALIKRIQALIPKGGRRLLPQLVCRLVLRCS (SEQ ID NO: 2);
- c) aproximadamente 49,15 % en peso de 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPFC); y
- d) aproximadamente 49,15 % en peso de 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (POFG);

todas las cantidades siendo calculadas en relación con el peso total del tensioactivo reconstituido.

4. El tensioactivo reconstituido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 puede encontrarse en forma de una molécula unida a disulfuro, el enlace disulfuro intramolecular se encuentra entre los dos residuos de cisteína en las posiciones 1 y 33 y/o entre los dos residuos de cisteína en las posiciones 4 y 27.

5. El tensioactivo reconstituido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el POPG se encuentra en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

6. El tensioactivo reconstituido según la reivindicación 5, en el que la sal es la sal de sodio.

7. El tensioactivo reconstituido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que cada uno de dichos polipéptidos se encuentra en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

8. El tensioactivo reconstituido según la reivindicación 7, en el que la sal es la sal de acetato.

9. Una formulación farmacéutica que comprende un tensioactivo reconstituido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, estando dicha formulación en forma de una solución, una dispersión, una suspensión o un polvo seco, opcionalmente en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

10. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que dicha formulación se encuentra en forma de una suspensión acuosa.

11. La formulación farmacéutica según la reivindicación 10, en la que el tensioactivo reconstituido se encuentra en una concentración comprendida entre 0,1 y 160 mg/ml de la suspensión acuosa.

12. Un kit, que comprende:

- a) un tensioactivo reconstituido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en forma de polvo en una primera forma de dosificación unitaria;
- b) un vehículo farmacéuticamente aceptable en una segunda forma de dosificación unitaria; y
- c) un medio de envase para contener dichas primera y segunda formas de dosificación.

- 5 13. El tensioactivo reconstituido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso como medicamento.
- 14. El tensioactivo reconstituido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en el tratamiento o la profilaxis del síndrome de dificultad respiratoria (SDR) en bebés nacidos prematuramente o para el tratamiento o la profilaxis de otras enfermedades relacionadas con una disfunción del tensioactivo o con una deficiencia de tensioactivo.
- 10 15. El tensioactivo reconstituido para su uso según la reivindicación 14, en el que la enfermedad incluye SDR en adultos (SDRA), síndrome de aspiración de meconio (SAM) y displasia broncopulmonar (DBP).

Figura 1

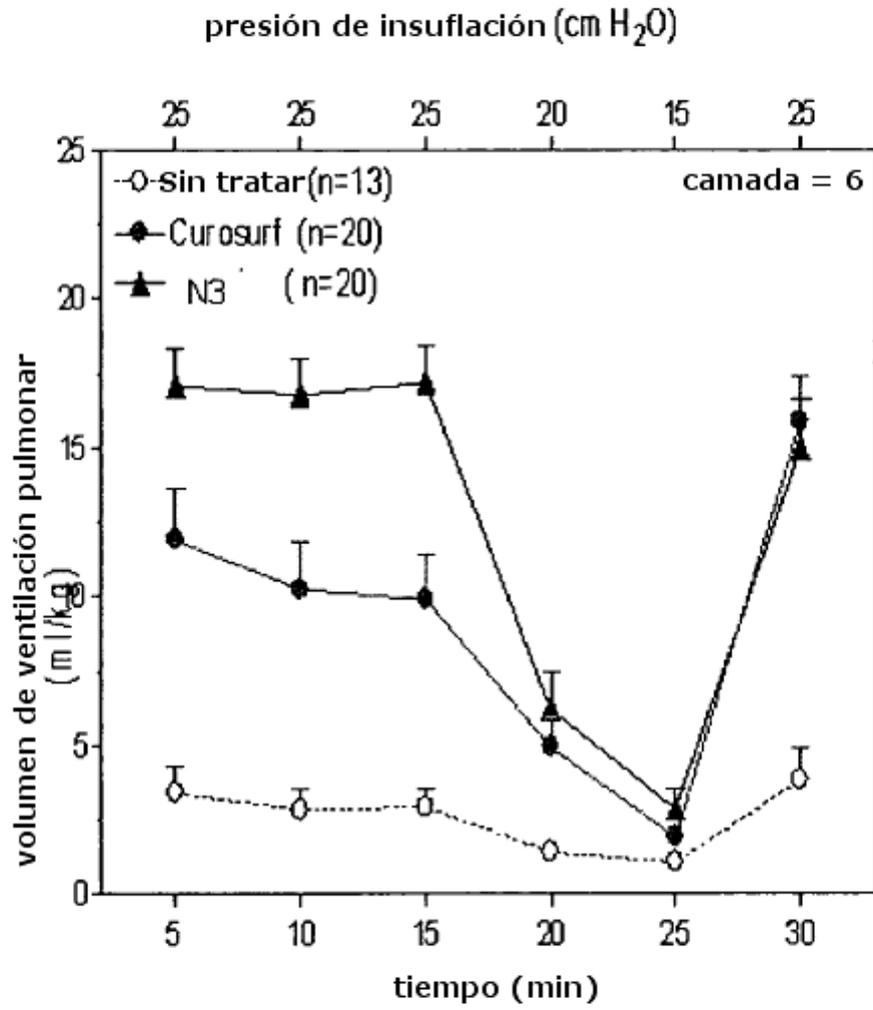


Figura 2

