

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 317**

51 Int. Cl.:

C07K 14/475 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2013 PCT/EP2013/074312**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2014 WO14079898**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2013 E 13807947 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2922868**

54 Título: **Tensioactivos pulmonares reconstituidos**

30 Prioridad:

21.11.2012 EP 12193708

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

28.11.2017

73 Titular/es:

CHIESI FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)

Vía Palermo, 26/A

43100 Parma, IT

72 Inventor/es:

JOHANSSON, JAN y

CURSTEDT, TORE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 644 317 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

Tensioactivos pulmonares reconstituidos

La presente invención se relaciona con tensioactivos pulmonares sintéticos para el tratamiento o profilaxis del síndrome de dificultad respiratoria (RDS) en bebés prematuros y otros trastornos respiratorios.

- 5 En particular, la invención se relaciona con un tensioactivo reconstituido que comprende una combinación de análogos particulares de la proteína tensioactiva nativa SP-C con análogos de la proteína tensioactiva nativa SP-B y una mezcla de fosfolípidos.

Antecedentes de la invención

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

- 15 El complejo tensioactivo pulmonar se compone principalmente de lípidos y contiene cantidades menores de varias proteínas. La ausencia de niveles adecuados de este complejo produce un mal funcionamiento del pulmón. Este síndrome se llama Síndrome de Dificultad Respiratoria (RDS) y afecta comúnmente a los bebés prematuros.

Dicho síndrome se trata efectivamente con preparaciones tensioactivas naturales modificadas extraídas de pulmones de animales.

- 20 Las preparaciones de tensioactivos modificados, disponibles comercialmente son, por ejemplo, poractante alfa (Curosurf™), derivado de pulmón porcino, calfactante (Infasurf™), extraído de lavado de pulmón de becerro y beractante (Survanta™), un extracto de pulmón bovino natural químicamente modificado.

Los constituyentes principales de estas preparaciones tensioactivas son fosfolípidos, tales como 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), (PG) y las proteínas tensioactivas hidrófobas B y C (SP-B y SP-C).

- 25 Debido a los inconvenientes de las preparaciones de tensioactivos a partir de tejidos animales, tales como la complicación de los procesos de producción y esterilización y la posible inducción de reacciones inmunes, se han desarrollado tensioactivos sintéticos que intentan mimetizar la composición de los tensioactivos naturales modificados.

Sin embargo, de acuerdo con la bibliografía disponible, ninguno de los tensioactivos sintéticos desarrollados hasta ahora ha mostrado la misma eficacia que la de los tensioactivos extraídos de animales.

- 30 Una posible explicación es que los tensioactivos reconstituidos disponibles desarrollados hasta ahora no reproducen el perfil proteínico completo de los tensioactivos naturales modificados ya que los primeros comprenden sólo un componente proteínico (péptido).

Por estas razones, los tensioactivos reconstituidos que comprenden ambos análogos de las proteínas tensioactivas nativas SP-B y SP-C se han propuesto en la técnica, por ejemplo en los documentos WO 2008/044109, WO 2008/011559 y WO 2010/139442.

- 35 A pesar de ello, todavía existe escepticismo con respecto a la posibilidad de que los tensioactivos reconstituidos puedan lograr la misma eficacia en términos de conformidad pulmonar de los tensioactivos extraídos de animales, en particular en términos de volúmenes de gas pulmonar y grado de permeabilidad alveolar al final de la espiración.

En este respecto, el solicitante ha encontrado que, además del perfil proteínico, también la composición de fosfolípidos es muy importante para estabilizar los alvéolos al final de la espiración.

- 40 En particular, el solicitante encontró que los tensioactivos reconstituidos que comprenden análogos representativos de las proteínas B y C divulgadas en el documento WO 2008/044109 y la fracción de fosfolípidos extraída del poractante alfa, rico en fosfolípidos insaturados, dan resultados que se pueden sobreponer a los del poractante alfa con respecto a los volúmenes totales de respiración y volúmenes de gas pulmonar.

Por lo tanto, sería altamente ventajoso proporcionar tensioactivos reconstituidos que comprenden mezclas de fosfolípidos capaces de ayudar a mejorar las propiedades en términos de conformidad pulmonar.

- 45 En el documento WO 2004/105726 se ha divulgado el uso de una mezcla de lípidos que comprende fosfolípidos poliinsaturados con el objetivo de reducir la viscosidad de tensioactivos sintéticos.

- 50 Se ha encontrado ahora, y es el objeto de la presente invención, que la fracción derivada de manera natural enriquecida en fosfolípidos insaturados se puede combinar ventajosamente con análogos particulares de la proteína nativa SP-C, y con análogos particulares de la proteína nativa SP-B con el fin de proporcionar una preparación de tensioactivos reconstituida con propiedades, en términos de volúmenes totales de respiración y volúmenes de gas pulmonar, no inferiores a los de tensioactivos naturales modificados tales como poractante alfa.

Resumen de la invención

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

5 En particular, la invención se dirige a un tensioactivo reconstituido que comprende:

una mezcla de fosfolípidos;

un polipéptido análogo de la proteína tensioactiva nativa SP-B; y

un polipéptido análogo de la proteína tensioactiva nativa SP-C representada por la fórmula general:



10 en en la que:

Ω es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en M o M oxidado sobre el átomo de azufre, I, L y nL;

p es 0 o 1

comprendiendo dicha mezcla de fosfolípidos:

i) una cantidad de 50% en peso de DPPC;

15 ii) una cantidad de 10% en peso de POPG; y

iii) una cantidad de 40% en peso de una fracción de fosfolípidos insaturados derivada de manera natural constituida esencialmente por:

20 desde 30 a 50% de POPC, desde 10 a 20% de PLPC, desde 4 a 10% de P(:1)OPC, desde 5 a 8% de SLPC, desde 5 a 8% de DOPC, desde 1 a 3% de SAPC, desde 5 a 15% de SOPC, desde 1 a 2% de PAPC, desde 1 a 3% de PDPC, desde 0 a 3,5% de SOPE, desde 0 a 8% de SAPE, desde 0 a 4% de SLPE, desde 0 a 2,5% de PLPE, desde 0 a 3,5% de POPE; desde 0 a 2,0% de LAPE, desde 0 a 2% de LLPE, desde 0 a 10% de PSM;

siendo calculadas todas las cantidades i), ii) y iii) sobre el peso total de la mezcla de fosfolípidos;

en el que el análogo de polipéptido de la proteína tensioactiva nativa SP-B está representado por la fórmula general (II)



en la que:

θ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L, I y C, preferiblemente C; y

Δ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, I y L, preferiblemente W;

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

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

f es un número entero que tiene un valor de 0 o 1;

o el análogo polipéptido de la proteína tensioactiva nativa SP-B está representado por la fórmula general (III)



35 en el que

X es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en C, A y G, preferiblemente C;

Δ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, L, nL e I, preferiblemente W o L;

Φ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en C, A y G, preferiblemente C;

Σ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en S, G y A; y

40 q es 0 o 1.

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

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

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

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 (RDS) y otros trastornos respiratorios.

10 La invención se dirige también 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 portador farmacéuticamente aceptable en una segunda forma de dosificación unitaria; y c) medios de recipiente para contener dichas primera y segunda formas de dosificación.

Figuras

15 La figura 1 muestra los resultados en términos de volúmenes totales de respiración (ml/kg) en función del tiempo/presión de un tensioactivo reconstituido hecho de ox Mini-B(Leu) al 2%+ SP-C33(Leu) al 2%+ DPPC al 50%+POPG al 10%+hígado-PC al 40% *versus* Curosurf™ y controles.

La figura 2 muestra los resultados en términos de volúmenes de gas pulmonar (ml/kg) de un tensioactivo reconstituido hecho de ox Mini-B(Leu) al 2%+ SP-C33(Leu) al 2%+ DPPC al 50%+POPG al 10%+hígado-PC al 40% *versus* Curosurf™ y controles.

20 La figura 3 muestra los resultados en términos de volúmenes totales de respiración (ml/kg) en función del tiempo/presión de un tensioactivo reconstituido hecho de ox Mini-B(Leu) al 2%+ SP-C33(Leu) al 2%+ DPPC al 50%+POPG al 10%+yema de huevo no purificada-PC al 40% *versus* Curosurf™ y controles.

25 La figura 4 muestra los resultados en términos de volúmenes de gas pulmonar (ml/kg) de un tensioactivo reconstituido hecho de ox Mini-B(Leu) al 2%+ SP-C33(Leu) al 2%+ DPPC al 50%+POPG al 10%+yema de huevo no purificada-PC al 40% *versus* Curosurf™ y controles.

La figura 5 muestra los resultados en términos de volúmenes totales de respiración (ml/kg) en función del tiempo/presión de un tensioactivo reconstituido hecho de ox Mini-B(Leu) al 2%+ SP-C33(Leu) al 2%+ DPPC al 50%+POPG al 10%+yema de huevo pura-PC al 40% *versus* Curosurf™ y controles.

30 La figura 6 muestra los resultados en términos de volúmenes de gas pulmonar (ml/kg) de un tensioactivo reconstituido hecho de ox Mini-B(Leu) al 2%+ SP-C33(Leu) al 2%+ DPPC al 50%+POPG al 10%+yema de huevo pura-PC al 40% *versus* Curosurf™ y controles.

La figura 7 muestra los resultados en términos de volúmenes totales de respiración (ml/kg) en función del tiempo/presión de un tensioactivo reconstituido hecho de ox Mini-B27al 2%+ SP-C33(Leu) al 2%+ DPPC al 50%+POPG al 10%+yema de huevo pura-PC al 40% *versus* Curosurf™ y controles.

35 La figura 8 muestra los resultados en términos de volúmenes de gas pulmonar (ml/kg) de un tensioactivo reconstituido hecho de ox Mini-B27al 2%+ SP-C33(Leu) al 2%+ DPPC al 50%+POPG al 10%+yema de huevo pura-PC al 40% *versus* Curosurf™ y controles.

40 La figura 9 muestra los resultados en términos de volúmenes totales de respiración (ml/kg) en el experimento llevado a cabo a un volumen total de respiración constante de tensioactivos reconstituidos de ox Mini-B(Leu) o ox Mini-B27al 2%+ SP-C33(Leu) al 2%+ DPPC al 50%+POPG al 10%+yema de huevo pura-PC al 40% *versus* Curosurf™ y controles.

45 La figura 10 muestra los resultados en términos de volúmenes de gas pulmonar (ml/kg) en el experimento llevado a cabo a un volumen total de respiración constante de tensioactivos reconstituidos de ox Mini-B(Leu) o ox Mini-B27al 2%+ SP-C33(Leu) al 2%+ DPPC al 50%+POPG al 10%+yema de huevo pura-PC al 40% *versus* Curosurf™ y controles.

Definiciones

En la presente invención, el término "tensioactivo reconstituido" significa un portador lipídico al que se han añadido análogos polipeptídicos de las proteínas tensioactivas, hechas por cualquier medio incluyendo tecnología recombinante o métodos sintéticos.

50 El término "análogos polipeptídicos de la proteína tensioactiva nativa SP-C", incluye polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos en la que, en comparación con las proteínas nativas, faltan uno o más aminoácidos o han

sido sustituidos por otros aminoácidos tan largos como los polipéptidos, en una mezcla con un portador lipídico, tal como por ejemplo una mezcla de fosfolípidos, muestran actividad de tensioactivo pulmonar.

5 El término "análogos polipéptidos de la proteína tensioactiva nativa SP-B", incluye péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos en la que, en comparación con las proteínas nativas, faltan uno o más aminoácidos o han sido sustituidos por otros aminoácidos tan largos como los polipéptidos, en una mezcla con un portador lipídico tal como por ejemplo una mezcla de fosfolípidos, muestran actividad de tensioactivo pulmonar.

10 El término "mini-B" significa un polipéptido de 34 residuos con base en los residuos N-terminales 8-25 y los residuos C-terminales 63-78 de la proteína nativa SP-B cuya estructura se divulgó genéricamente primero en una presentación tomada de la página de internet del Instituto NanoSystems de California. Su secuencia completa se ha divulgado posteriormente en el Banco de Datos de Proteínas RCSB.

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

El término "variantes" significa polipéptidos análogos del péptido Mini-B que tienen una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos han sido sustituidos por otros aminoácidos, siempre y cuando los péptidos, en una mezcla con un portador lipídico, retengan la actividad de Mini-B.

15 Todos los residuos de aminoácidos identificados aquí están en la configuración L natural y las secuencias identificadas aquí se reportan de acuerdo con las abreviaturas estándar para los residuos de aminoácidos como se muestra en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1 de aminoácidos

AMINOÁCIDO	SÍMBOLO	
	Una letra	Tres letras
Glicina	G	Gly
L-prolina	P	Pr
L-iso-leucina	I	Ile
L-leucina	L	Leu
L-tirosina	Y	Tyr
L-cisteína	C	Cys
L-triptófano	W	Trp
L-alanina	A	Ala
L-lisina	K	Lys
L-arginina	R	Arg
L-glutamina	Q	Gln
L-metionina	M	Met
L-serina	S	Ser
L-valina	V	Val
L-asparragina	N	Asn
L-ácido aspártico	D	Asp

AMINOÁCIDO	SÍMBOLO	
	Una letra	Tres letras
L-ácido glutámico	E	Glu
L-histidina	H	His
L-treonina	T	Thr
L-fenilalanina	F	Phe
L-nor-leucina	nL	nLeu

5 Tal como se utiliza en el texto, el término "fosfolípidos" se refiere a una clase de lípidos constituida por glicerol, un grupo fosfato, una unidad estructural zwitteriónica o neutra como la parte caracterizante; una excepción a esta regla es la esfingomielina, que se deriva de la esfingosina en lugar del glicerol. La fracción de glicerol o el residuo de esfingosina puede esterificarse con ácidos grasos de cadena larga (C₁₄-C₂₂) 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).

Las clases de fosfolípidos y las especies citadas en la presente invención se enumeran en la siguiente Tabla 2 junto con las abreviaturas usadas.

10 Tabla 2 de fosfolípidos

- fosfolípidos: PLs;
- fosfatidilcolina: PC;
- fosfatidiletanolamina: PE;
- fosfatidilglicerol: PG;
- 15 • fosfatidilinositol: PI;
- fosfatidilserina: PS;
- esfingomielina: SM;
- 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, generalmente conocido como dipalmitoil-fosfatidilcolina: DPPC;
- 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina generalmente conocido como palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina: POPC;
- 20 • 1-palmitoil-2-linoleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, generalmente conocido como palmitoil-linoleoil-fosfatidilcolina: PLPC;
- 1-palmitoleoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, generalmente conocido como palmitoleoil-oleoil-fosfatidilcolina: P(:1)OPC
- 1-estearoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina generalmente conocido como estearoil-oleoil-fosfatidilcolina: SOPC;
- 25 • 1-estearoil-2-linoleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, generalmente conocido como estearoil-linoleoil-fosfatidilcolina: SLPC;
- 1-estearoil-2-araquidonoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, generalmente conocido como estearoil-araquidonoil-fosfocolina: SAPC;
- 1-palmitoil-2-araquidonoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, generalmente conocido como palmitoil-araquidonoil-fosfocolina: PAPC;
- 30 • 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, generalmente conocido como dioleoil-fosfatidilcolina: DOPC;

- 1-palmitoil-2-docosaheptaenoil-*sn*-glicero-3-fosfolina generalmente conocido como palmitoil-docosaheptaenoil-fosfatidilcolina: PDPC;
- 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, generalmente conocido como dipalmitoil-fosfatidiletanolamina: DPPE;
- 5 • 1-palmitoil-2-linoleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, generalmente conocido como palmitoil-linoleoil fosfatidiletanolamina: PLPE;
- 1-estearoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, generalmente conocido como estearoil-oleoil fosfatidiletanolamina: SOPE;
- 10 • 1-estearoil-2-linoleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, generalmente conocido como estearoil-linoleoil fosfatidiletanolamina: SLPE;
- 1-estearoil-2-araquidonoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, generalmente conocido como estearoil-araquidonoil-fosfatidiletanolamina: SAPE;
- 1-linoleoil-2-araquidonoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, generalmente conocido como linoleoil-araquidonoil-fosfatidiletanolamina: LAPE;
- 15 • 1,2-dilinoleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, generalmente conocido como dilinoleoil-fosfatidiletanolamina: DLPE;
- 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, generalmente conocido como dioleoil-fosfatidiletanolamina: DOPE;
- 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol, generalmente conocido como palmitoil-oleoil-fosfatidilglicerol: POPG;
- 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol generalmente conocido como dioleoil-fosfatidilglicerol: DOPG;
- 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina, generalmente conocido como dipalmitoil- fosfatidilserina: DPPS;
- 20 • 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol, generalmente conocido como dipalmitoil-fosfatidilglicerol: DPPG;
- N-palmitoil-D-esfingosilfosforilcolina: PSM

La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la fracción naturalmente derivada de fosfolípidos insaturados puede comprender otros componentes, cada uno de ellos en una cantidad muy baja (inferior al 0,1% p/p) y que no afecta sustancialmente a la actividad y las propiedades de dicha fracción.

- 25 La "actividad de tensioactivo" para una preparación de tensioactivo se define como la capacidad para disminuir la tensión superficial.

La eficacia in vitro de las preparaciones tensioactivas exógenas se prueba comúnmente midiendo su capacidad de disminuir la tensión superficial usando un aparato adecuado tal como una Balanza de Wilhelmy y un Surfactómetro de Burbuja Cautiva.

- 30 La eficacia in vivo de las preparaciones tensioactivas exógenas se prueba comúnmente midiendo los siguientes parámetros:

i) el volumen total de respiración que es un índice de conformidad pulmonar;

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

iii) la densidad de volumen alveolar es el porcentaje del volumen total de los alvéolos en el pulmón. El porcentaje se calcula tomando el volumen total de los alvéolos, dividido por el volumen pulmonar total (alvéolos + tejido, excluyendo por ejemplo bronquiolos, vasos) de acuerdo con el método divulgado en el párrafo 2.2.2 de Berggren P et al Respiration Physiology, 1999, 115, 45-33. El valor es similar al volumen de gas pulmonar que se mide para todo el pulmón, mientras que la densidad volumétrica alveolar se mide a partir de secciones histológicas.

- 40 "Cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se utiliza aquí se refiere a una cantidad de tensioactivo reconstituido capaz de prevenir, evitar, reducir o eliminar la enfermedad respiratoria o los trastornos asociados con la falta o disfunción del tensioactivo endógeno.

La expresión "recombinante" cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, ha sido modificado por la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga o alteración de un ácido nucleico nativo o proteína.

Tal como se utiliza aquí, el término "aproximadamente" aplicado a un valor puntual, indica una variabilidad de $\pm 5\%$.

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención está dirigida a un tensioactivo reconstituido que comprende un polipéptido análogo de la proteína tensioactiva nativa SP-C de fórmula (I), un análogo polipéptido de la proteína tensioactiva nativa SP-B de fórmula (II) o (III) y una mezcla fosfolípida que comprende una fracción derivada de manera natural enriquecida en fosfolípidos insaturados.

10 Se ha encontrado efectivamente que dicha preparación de tensioactivos reconstituida tiene propiedades en términos de volúmenes totales de respiración y volúmenes de gas pulmonar no inferiores a los de tensioactivos naturales modificados tales como poractante alfa.

15 En particular, se encontró que, además de los componentes proteínicos, la composición de fosfolípidos también es muy importante para estabilizar los alvéolos al final de la espiración en animales ventilados sin presión positiva al final de la espiración (PEEP).

Además, se encontró que, utilizando la mezcla de fosfolípidos reivindicada, es posible proporcionar composiciones con baja viscosidad incluso si se usan análogos de SP-B de fórmula (III), que son más cortos que los análogos de fórmula (II), pero dan lugar a preparaciones viscosas cuando se mezclan con una mezcla de fosfolípidos simples de DPPC y POPG.

20 Ventajosamente, el análogo de polipéptido de la proteína SP-C está representado por la fórmula general (I)



en la que:

Ω es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en M o M oxidado sobre el átomo de azufre, I, L y nL, preferiblemente L

25 p es 0 o 1

Ejemplos de polipéptidos de fórmula (I) se reportan a continuación:



30 $\text{IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLILLILGALLnLGL (Id)}$



El polipéptido (Ia) se ha referido también en la técnica anterior como SP-C33.

35 En una realización preferida de la invención, el polipéptido de fórmula general (I) es el polipéptido (Ic), referido en la técnica como SP-C33(Leu).

En una realización de la invención, el análogo de la proteína nativa SP-B es un polipéptido representado por la siguiente fórmula general (II):



en la que:

40 θ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L, I y C, preferiblemente C; y

Δ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, I y L, preferiblemente W;

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

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

f es 0 o 1.

Los polipéptidos de acuerdo con la fórmula general (II) en la que f es 0 se reportan a continuación:

CWLCRALIKRIQAMIPKGGRLPQLVCRLVLRCS (IIa)

CLLCRALIKRIQAMIPKGGRLPQLVCRLVLRCS (IIb)

5 CWLCRALIKRIQALIPKGGRLPQLVCRLVLRCS (IIc)

CLLCRALIKRIQALIPKGGRLPQLVCRLVLRCS (IId)

Preferiblemente, los polipéptidos (IIa), (IIb), (IIc) e (IId) pueden estar en forma de molécula unida a disulfuro en la que el enlace disulfuro intramolecular está entre los dos residuos C en las posiciones 1 y 33 y/o entre los dos residuos C en las posiciones 4 y 27.

10 El polipéptido unido a disulfuro (IIa) ha sido referido en la técnica como Mini-B y su forma unida a disulfuro como Mini-B oxidado (ox Mini-B); ver Waring AJ et al., J Peptide Res 2005, 66, 364-374.

El polipéptido (IIc), que es particularmente preferido, ha sido referido en WO 2008/044109 como Mini-B(Leu) y su forma unida a disulfuro como ox Mini-B(Leu).

Los polipéptidos de acuerdo con la fórmula general (II) en la que f es 1 se reportan a continuación:

15 FPCPLPYCWLCRALIKRIQAMIPKGGRLPQLVCRLVLRCS (IIe)

FPIPLPYCWLCRALIKRIQAMIPKGGRLPQLVCRLVLRCS (IIf)

FPCPLPYCWLCRALIKRIQALIPKGGRLPQLVCRLVLRCS (IIg)

FPIPLPYCWLCRALIKRIQALIPKGGRLPQLVCRLVLRCS (IIh)

20 Preferiblemente, dichos polipéptidos pueden estar en la forma de molécula cíclica en la que la unión está entre los residuos C en las posiciones 8 y 40 y/o entre los residuos C en las posiciones 11 y 34.

En otra realización de la invención, el análogo de la proteína nativa SP-B es un polipéptido representado por la siguiente fórmula general (III):

$$X\Delta\Omega RALIKRFNRYLTPQLV\Omega RLVLR\Phi\Sigma_q \text{ (III)}$$

en el que

25 X es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en C, A y G, L, e I, preferiblemente C;

Δ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, L, nL (norLeucina) e I, preferiblemente W o L;

Φ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en C, A y G, L, e I, preferiblemente C;

Σ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en S, G y A;

30 Ω es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en C, L e I, preferiblemente C

y

q es 0 o 1.

De manera ventajosa, dichos polipéptidos pueden estar en forma de molécula cíclica en donde la unión está entre los residuos C en las posiciones 1 y 27 y/o entre los residuos C en las posiciones 4 y 21.

35 Los polipéptidos abarcados por la fórmula general (III) son, por ejemplo, reportados a continuación:

CLLCRALIKRFNRYLTPQLVCRLVLRCS (IIIa)

CWLCRALIKRFNRYLTPQLVCRLVLRCS (IIIb)

ALLCRALIKRFNRYLTPQLVCRLVLRCS (IIIc)

GLLCRALIKRFNRYLTPQLVCRLVLRCS (IIId)

40 El polipéptido preferido es el de fórmula (IIIb) en su forma unida a disulfuro denominada de aquí en adelante ox Mini-B27.

Los polipéptidos de fórmulas generales (I), (II) y (III) pueden prepararse de acuerdo con métodos sintéticos o técnicas recombinantes bien conocidas por la persona experimentada en la técnica.

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

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

Por ejemplo, los polipéptidos de fórmula general (I) se pueden preparar de acuerdo con el método divulgado en el documento WO 00/47623.

15 Los polipéptidos de fórmula general (II) en los que f es 0 pueden prepararse de acuerdo con los métodos descritos en Waring AJ et al., J Peptide Res 2005, 66, 364-374 o en el documento WO 2008/044109, mientras que los polipéptidos de fórmula general (II) en los que f es 1 se pueden preparar de acuerdo con la enseñanza del documento WO 2008/011559.

20 Los polipéptidos de fórmula general (III) se pueden preparar de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO 2009/018908.

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

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

25 El fosfolípido POPG puede estar ventajosamente presente en forma de sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo como sal sódica (POPG Na).

Preferiblemente, los polipéptidos de fórmula general (I) y los polipéptidos de fórmula general (II) o (III) están presentes en los tensioactivos reconstituidos de la invención en una cantidad fija y proporción cuantitativa como una combinación fija.

30 La proporción de los polipéptidos de fórmulas generales (I) y (II) o (III) con respecto al tensioactivo reconstituido puede variar. Ventajosamente, cada polipéptido puede estar presente en una cantidad comprendida entre 0,5 y 10% en base al peso del tensioactivo (p/p), preferiblemente entre 1 y 5%, más preferiblemente entre 1 y 3%.

35 La mezcla de fosfolípidos consiste en i) una cantidad de 50% en peso de DPPC; ii) una cantidad de 10% en peso de POPG; y iii) una cantidad de 40% en peso de una fracción derivada de manera natural de fosfolípidos insaturados, calculándose todas las cantidades i), ii) y iii) sobre el peso total de la mezcla de fosfolípidos.

40 A su vez, la fracción derivada de manera natural de fosfolípidos insaturados consiste esencialmente en desde 30 a 50% de POPC, desde 10 a 20% de PLPC, desde 4 a 10% de P(:1)OPC, desde 5 a 8% de SLPC, desde 5 a 8% de DOPC, desde 1 a 3% de SAPC, desde 5 a 15% de SOPC, desde 1 a 2% de PAPC, desde 1 a 3% de PDPC, desde 0 a 3,5% de SOPE, desde 0 a 8% de SAPE, desde 0 a 4% de SLPE, desde 0 a 2,5% de PLPE, desde 0 a 3,5% de POPE; desde 0 a 2,0% de LAPE, desde 0 a 2% de LLPE, desde 0 a 10% de PSM.

La suma de las cantidades relativas de los diferentes componentes que constituyen dicha fracción debe ser del 100%. Su cantidad absoluta sobre el peso total de la mezcla de fosfolípidos podría calcularse multiplicando cada valor por 0,4.

45 Una composición típica puede constituir la fracción de fosfolípidos insaturados derivados de manera natural, de aproximadamente 45% de POPC, aproximadamente 20% de PLPC, aproximadamente 6% de P(:1)OPC, aproximadamente 6% de SLPC, aproximadamente 6% de DOPC, aproximadamente 3% de SAPC, aproximadamente 10% de SOPC, aproximadamente 2% de PAPC, aproximadamente 2% de PDPC, con base en el peso del extracto de L- α -fosfatidilcolina.

50 Otra composición típica de dicha fracción puede estar constituida por aproximadamente 35% de POPC, aproximadamente 20% de PLPC, aproximadamente 5% de P(:1)OPC, aproximadamente 5% de SLPC, aproximadamente 5% de DOPC, aproximadamente 1% de SAPC, aproximadamente 7% de SOPC, aproximadamente 1% de PAPC, aproximadamente 1% de PDPC, aproximadamente 2% de SOPE, aproximadamente 7% de SAPE, aproximadamente 3% de SLPE, aproximadamente 2% de PLPE, aproximadamente 2% de POPE; aproximadamente

2% de LAPE, aproximadamente 1% de LLPE, aproximadamente 1% de PSM con base en el peso del extracto de L- α -fosfatidilcolina.

5 En una realización de la invención, como fuente de fracción derivada de manera natural de fosfolípidos insaturados, se pueden usar L- α -fosfatidilcolinas derivadas de yema de huevo que tienen diferentes purezas (Sigma Aldrich Co, St. Louis, MO, Estados Unidos).

10 Por ejemplo, puede utilizarse ventajosamente L- α -fosfatidilcolina derivada de yema de huevo que tiene una pureza de más del 99% p/p. Tiene esencialmente la siguiente composición: desde 40 a 50% de POPC, desde 15 a 20% de PLPC, desde 5 a 7% de P(1)OPC, desde 6 a 7% de SLPC, desde 6 a 7% de DOPC, desde 2 a 3% de SAPC, desde 10 a 15% de SOPC, desde 1 a 2% de PAPC, desde 1 a 2% de PDPC, con base en el peso del extracto de L- α -fosfatidilcolina.

15 Por otra parte, se puede utilizar L- α -fosfatidilcolina derivada de yema de huevo con una pureza de aproximadamente 40% p/p, que tiene la siguiente composición: desde 30 a 40% de POPC, desde 13 a 18% de PLPC, desde 3 a 4% P(1)OPC, desde 5 a 6% de SLPC, desde 5 a 6% de DOPC, desde 1 a 2% de SAPC, desde 6 a 8% de SOPC, desde 1 a 2% de PAPC, desde 1 a 2% de PDPC, desde 3 a 3,5% de SOPE, desde 7 a 8% de SAPE, desde 3,5 a 4,5% de SLPE, desde 2 a 2,5% de PLPE, desde 3 a 3,5% de POPE; desde 1,5 a 2,0% de LAPE, desde 1 a 2% de LLPE, desde 0,5 a 1% de PSM, con base en el peso del extracto de L- α -fosfatidilcolina.

20 Como fuente de la fracción de fosfolípidos insaturados, también se podría utilizar la L- α -fosfatidilcolina derivada de hígado bovino con una pureza superior al 99% p/p. Alternativamente, dicha fracción se puede aislar de otras fuentes, tales como hígado de conejo mediante cromatografía de acuerdo con métodos conocidos por la persona experimentada.

Teóricamente, la fracción de fosfolípidos insaturados también puede ser preparada por la persona experimentada en la técnica mezclando cada componente en una cantidad adecuada.

25 Las cantidades relativas de fosfolípido se pueden determinar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante LC-MS de acuerdo con el método reportado en Miroslav L et al J Chromatog A 2011, 1218, 5146-5156.

En realizaciones particulares de la invención, el tensioactivo reconstituido puede comprender otros componentes, por ejemplo lípidos neutros tales como triacilgliceroles, ácidos grasos libres, colesterol y/o fosfolípidos adicionales tales como lisofosfatidilcolinas, lisofosfatidiletanolaminas, DPPS y DPPG y DOPE.

30 Ventajosamente, el tensioactivo reconstituido de acuerdo con la invención comprende 90 a 99% en peso de la mezcla de fosfolípidos, preferiblemente 92 a 98%, más preferiblemente 94 a 96%, y 1 a 10% en peso de la suma de un péptido de fórmula (I) y un péptido de fórmula (II) o (III), preferiblemente de 2 a 8%, más preferiblemente de 4 a 6%.

En una de las realizaciones de la invención, el tensioactivo reconstituido comprende 96% en peso de la mezcla de fosfolípidos, 2% en peso de un polipéptido de fórmula general (I) y 2% en peso de un polipéptido de fórmula general (II).

35 En otra realización, el tensioactivo reconstituido comprende 96% en peso de la mezcla de fosfolípidos, 2% en peso de un polipéptido de fórmula general (I) y 2% en peso de un polipéptido de fórmula general (III).

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

40 En general, la dosis está comprendida desde 0,01 mg a 10 g por kg de peso corporal, preferiblemente desde 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, se administra una dosis de aproximadamente 50 mg/kg, 100 mg/kg o 200 mg/kg en una dosis. Para su uso en recién nacidos, generalmente son suficientes una o dos administraciones.

45 Aunque las necesidades pueden variar dependiendo de la gravedad de la enfermedad respiratoria y/u otras variables, la determinación de los intervalos óptimos para dosificaciones eficaces está dentro del conocimiento de la persona experimentada en la técnica.

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

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

Las formulaciones de la presente invención están preferiblemente en forma de suspensión en una solución acuosa, más preferiblemente estéril, que puede comprender opcionalmente agentes reguladores de pH, diluyentes y otros aditivos adecuados.

- 5 Ventajosamente, la viscosidad de dichas formulaciones es inferior a 20 centiPoise (cP), preferiblemente inferior a 15 cP, después de la determinación con un viscosímetro común disponible en el mercado de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo ampollas selladas y viales, o pueden almacenarse en una condición congelada o liofilizada que requiere solamente la adición de un portador líquido estéril inmediatamente antes del uso.

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

- 15 Las formulaciones farmacéuticas pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales bien 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 luego por diálisis o evaporación bajo nitrógeno y/o exposición al vacío o por otras técnicas apropiadas bien conocidas por la persona experimentada en la técnica, tales como liofilización y secado por pulverización.

El polvo obtenido se pone entonces de manera uniforme e íntima en asociación con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos.

- 20 La mezcla de polipéptidos y fosfolípidos puede esterilizarse antes de eliminar el disolvente por ejemplo por filtración estéril. En ciertas otras realizaciones, la composición tensioactiva reconstituida se esteriliza terminalmente de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

La administración del tensioactivo reconstituido de la invención se lleva a cabo de una manera conocida por la persona experimentada en la técnica, por ejemplo, por medio de una instalación intratraqueal (infusión o bolo o a través de un catéter), por administración por pulverización o nebulización.

- 25 Como se divulga aquí, la invención contempla el uso tanto de formulaciones de tensioactivos concentradas como diluidas, dependiendo del uso particular, como se describe adicionalmente aquí. Las composiciones tensioactivas concentradas se usan típicamente para administraciones de tipo "bolo", mientras que las composiciones de tensioactivos diluidas se usan típicamente para administraciones de tipo "lavado".

- 30 Ventajosamente, para la administración de tipo "bolo", la concentración de tensioactivo reconstituido en términos de peso por ml de solución o suspensión (después de la adición de un portador líquido) está en el intervalo de 5 a 100 mg/ml, preferiblemente entre 20 y 80 mg/ml.

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

- 35 Cuando se usa para la administración de lavado, una concentración típica de tensioactivo de desde aproximadamente 0,1 a 20 mg/ml, y de manera más preferible aproximadamente 0,5 a 10 mg/ml (en términos de mg de tensioactivo por ml de solución o suspensión).

Dado que depende de la concentración, la viscosidad de las formulaciones diluidas sería aún menor.

- 40 Cuando se utilizan como tratamiento farmacéutico, las formulaciones que comprenden el tensioactivo reconstituido de la presente invención pueden administrarse solos u opcionalmente en conjunción con otros compuestos o composiciones que se usan en el tratamiento de enfermedades o trastornos respiratorios. Por ejemplo, si un sujeto está siendo tratado por un trastorno respiratorio causado por una infección bacteriana, entonces el tensioactivo reconstituido de la presente invención puede administrarse conjuntamente con otro compuesto usado para tratar la infección bacteriana, tal como un antibiótico.

- 45 De lo contrario, en ciertos casos, por ejemplo para prevenir complicaciones tales como displasia broncopulmonar, el tensioactivo reconstituido de la presente invención puede administrarse junto con corticosteroides tales como budesonida y dipropionato de beclometasona.

- 50 En ciertas realizaciones, el tensioactivo reconstituido de la invención, y el portador de resuspensión pueden embalsarse por separado al mismo tiempo en un medio de recipiente adecuado. Dicho embalaje separado de los componentes en un medio de recipiente adecuado también se describe como un kit.

Por lo tanto, esta invención se dirige también 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) medios de recipiente para contener dichas primera y segunda formas de dosificación.

Preferiblemente, el portador farmacéuticamente aceptable es una solución acuosa salina fisiológica, más preferiblemente estéril.

5 Tal como se divulga aquí, una variedad de métodos para administrar el tensioactivo reconstituido y formulaciones del mismo de la presente invención están disponibles y son bien conocidos por una persona experimentada en la técnica.

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

10 Típicamente, el tensioactivo se administra mediante instilación endotraqueal a pacientes (por ejemplo, bebés pretérmino) mantenidos bajo ventilación con presión positiva continua o intermitente (IPPV).

Alternativamente, el tensioactivo puede ser administrado mediante el uso de un catéter delgado colocado en la tráquea y la respiración del paciente soportada con dispositivos nasales especialmente diseñados tales como máscaras, dientes o tubos de acuerdo con la metodología conocida como presión nasal continua positiva de la vía aérea (nCPAP).

15 Esta última metodología sólo sería posible con un tensioactivo que tuviera baja viscosidad, ya que una alta viscosidad haría más difícil el paso del tensioactivo a través del catéter delgado.

En casos en los que el paciente sufre de un síndrome respiratorio asociado con inflamación pulmonar, infección pulmonar o contusión pulmonar, pueden recomendarse modalidades de tratamiento particulares. En un método terapéutico de este tipo, el lavado de los pulmones del paciente con una composición tensioactiva de la presente invención se lleva a cabo como tratamiento único o múltiples.

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

En particular, es útil para la profilaxis y/o el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (SDR) en bebés nacidos prematuros u otras enfermedades relacionadas con una deficiencia o disfunción de tensioactivo, incluyendo lesión pulmonar aguda (ALI), RDS en adultos (ARDS), síndrome de aspiración de meconio (MAS) y displasia broncopulmonar (BPD).

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

El siguiente ejemplo ilustra la invención con más detalle.

30 Ejemplos

Ejemplo 1 – Preparación de los tensioactivos reconstituidos

35 Se compraron los fosfolípidos 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (POPG), L- α -fosfatidilcolinas derivadas de yema de huevo con purezas superiores del 99% de una yema de huevo (en adelante, PC de yema de huevo pura) y de aproximadamente 40% (en adelante PC de yema de huevo no purificada). La fracción de fosfatidilcolina derivada de hígado de conejo (en adelante PC de hígado) se aisló por cromatografía sobre Lipidex-5000 como se informó en Curstedt T. Analysis of molecular species of ether analogues of phosphatidylcholines from biological samples. Biochim Biophys Acta 1977; 489:79-88.

Los polipéptidos SP-C33(Leu) y ox-Mini-B(Leu) se prepararon como se divulga en el documento WO 2008/044109, mientras que el polipéptido ox Mini-B27 se preparó como se divulga en el documento WO 2009/018908.

40 Preparación de los tensioactivos reconstituidos

Los fosfolípidos, disueltos en cloroformo/metanol 98:2 (v/v), se mezclaron en las proporciones DPPC:POPG:PC de yema de huevo (PC de hígado) 50:10:40 en peso.

45 Se prepararon correspondientes preparaciones tensioactivas reconstituidas (tensioactivo A y B) añadiendo cada polipéptido en una cantidad de 2% en peso. Los tensioactivos obtenidos se evaporaron bajo nitrógeno y se volvieron a suspender en una solución acuosa de NaCl al 0,9% p/p a una concentración de 80 mg/ml.

Ejemplo 2 Experimento in vivo con un tensioactivo reconstituido compuesto de ox Mini-B(Leu) al 2% + SP-C33(Leu) al 2%+ DPPC al 50% + POPG al 10% + PL de hígado al 40%

5 Conejos recién nacidos inmaduros (edad gestacional de 27 días) fueron tratados al nacer con 200 mg/kg de la preparación de tensioactivo reconstituido (80 mg/ml). Los animales que recibieron la misma dosis de poractante alfa (Curosurf™) sirvieron como controles positivos y compañeros de camada no tratados como controles negativos. Los conejos recién nacidos fueron ventilados en paralelo con una secuencia estandarizada de presiones de insuflación pico. Para abrir los pulmones, la presión se ajustó primero a 35 cmH₂O durante 1 minuto. Después de esta maniobra de reclutamiento, la presión se redujo a 25 cmH₂O durante 15 minutos y posteriormente a 20 y 15 cmH₂O. Finalmente, se aumentó de nuevo la presión a 25 cmH₂O durante 5 minutos, después de lo cual se ventilaron los pulmones durante 5 minutos adicionales con nitrógeno y luego se escindieron para las mediciones de volumen de gas. Los experimentos se realizaron sin PEEP. Tanto los volúmenes totales de respiración como los volúmenes de gas pulmonar se dan como valores medianos.

10 Los pulmones se fijaron mediante inmersión en formalina 4% neutra, deshidratada e incrustada en parafina. Las secciones transversales se tiñeron con hematoxilina y eoxina. La densidad volumétrica alveolar se midió con un analizador de imágenes asistido por ordenador utilizando el parénquima total como volumen de referencia.

15 Los resultados indican que el tensioactivo reconstituido que comprende una mezcla de fosfolípidos con base en PL de hígado y DPPC y POPG como fosfolípidos sintéticos, 2% cada uno de SP-C33Leu y ox Mini-B(Leu) dio volúmenes totales de respiración (figura 1) y volumen de gas pulmonar (figura 2) similares a los obtenidos con Curosurf™. Además, a partir de la Tabla 3, puede apreciarse que dicho tensioactivo reconstituido dio una densidad volumétrica alveolar similar a la de Curosurf™ y significativamente mayor que solamente la mezcla de fosfolípidos.

Tabla 3: Densidad volumétrica alveolar (%) en conejos prematuros

	n	Densidad volumétrica alveolar (%)
SP-C33Leu al 2% + Mini-Bleu al 2%	10	64**
PL de hígado al 40%+ DPPC al 50%+ POPG al 10%		
solo fosfolípidos	12	43
Curosurf™	10	61#
Controles no tratados	11	40
**p < 0,002-0,0002 vs todos los grupos excepto Curosurf™		
#p < 0,02-0,0002 vs todos los grupos excepto el tensioactivo reconstituido		

20 Ejemplo 3-Experimento in vivo con un tensioactivo reconstituido hecho de ox Mini-B(Leu) al 2% + SP-C33(Leu) al 2% + DPPC al 50% + POPG al 10% + PC de yema de huevo no purificada al 40%

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 2.

25 Tanto los volúmenes totales de respiración como los volúmenes de gas pulmonar se reportan en la Figura 3 y 4 como valores medianos.

Los resultados indican que también un tensioactivo reconstituido que comprende una mezcla de fosfolípidos que contiene DPPC al 50%, PC de yema de huevo al 40% y POPG al 10% tenía volúmenes totales de respiración y volúmenes de gas pulmonar similares a Curosurf™.

30 Ejemplo 4-Experimento in vivo con un tensioactivo reconstituido hecho de ox Mini-B(Leu) al 2% + SP-C33(Leu) al 2% + DPPC al 50% + POPG al 10% + PC de yema de huevo pura al 40%

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 2.

Tanto los volúmenes totales de respiración como los volúmenes de gas pulmonar se reportan en la Figura 5 y 6 como valores medianos.

35 Los resultados indican que, aunque se utiliza PC de yema de huevo pura, el tensioactivo reconstituido correspondiente tenía volúmenes de gas pulmonar similares a Curosurf™, pero volúmenes totales de respiración algo menores, no de manera significativa.

Ejemplo 5-Experimento in vivo con un tensioactivo reconstituido hecho de ox Mini-B27 al 2% + SP-C33(Leu) al 2% + DPPC al 50% + POPG al 10% + PC de yema de huevo pura al 40%

El experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 2. Sin embargo, como análogo de SP-B, se usó el polipéptido citado como ox Mini-B27 en lugar de ox Mini-B(Leu).

- 5 Este es un análogo más corto de ox Mini-B(Leu), pero dicho polipéptido da lugar a una preparación viscosa cuando se mezcla con una mezcla de fosfolípidos que consiste en DPPC:POPG 7:3 (p/p).

Tanto los volúmenes totales de respiración como los volúmenes de gas pulmonar obtenidos se reportan en la Figura 7 y 8 como valores medianos.

- 10 Dicho tensioactivo reconstituido dio lugar a volúmenes totales de respiración algo menores que Curosurf™, pero los volúmenes de gas pulmonar fueron similares. Además, la formulación correspondiente en forma de suspensión acuosa a 80 mg/ml tenía una baja viscosidad.

Ejemplo 6-Experimento in vivo con volúmenes totales de respiración constantes

- 15 Conejos inmaduros recién nacidos (edad gestacional de 27 días) fueron tratados al nacer con 200 mg/kg de diferentes preparaciones de tensioactivos (80 mg/ml). Los animales que recibieron la misma dosis de Curosurf™ sirvieron como controles positivos y compañeros de camada no tratados como controles negativos. Los conejos recién nacidos fueron ventilados en paralelo con presiones individuales con el fin de obtener volúmenes totales de respiración estandarizados. Se utilizó un volumen total de respiración constante de 6 ml/kg.

- 20 Para abrir los pulmones, la presión se ajustó primero a 35 cmH₂O durante 1 minuto. Después de esta maniobra de reclutamiento, se redujo la presión para mantener los volúmenes totales de respiración durante 30 minutos entre 6-8 ml/kg. Los experimentos se realizaron sin PEEP.

Se probaron las siguientes muestras:

1. DPPC al 50% + PC de yema de huevo al 40%+POPG al 10%+SP-C33Leu al 2%+Mini-B27 al 2%
2. DPPC al 50% + PC de yema de huevo al 40%+POPG al 10%+SP-C33Leu al 2%+Mini-BLeu al 2%
3. Curosurf™
- 25 4. Controles no tratados

Tanto los volúmenes totales de respiración como los volúmenes de gas pulmonar se reportan como valores medianos en las Figuras 9 y 10.

- 30 Parece que las preparaciones tensioactivas reconstituidas que contienen Mini-B27 o Mini-BLeu tuvieron volúmenes de gases pulmonares similares a los animales tratados con Curosurf™ en experimentos cuando los animales fueron ventilados con volúmenes totales de respiración fisiológicos (aproximadamente 6 ml/kg) sin PEEP.

Listado de secuencia

- <110> Chiesi Farmaceutici spa
- <120> TENSIOACTIVOS PULMONARES RECONSTITUIDOS
- <130> 1521PCT
- 35 <160> 18
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 33
- <212> PRT
- 40 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> péptido sintético

ES 2 644 317 T3

<400> 1

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

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

Leu

<210> 2

<211> 33

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 2

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

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

10 Leu

<210> 3

<211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 3

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

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

Leu

<210> 4

20 <211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

25 <220>

ES 2 644 317 T3

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (31)..(31)

<223> Xaa es norLeu

<400> 4

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

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

5 Leu

<210> 5

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 5

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

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

<210> 6

15 <211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

20 <400> 6

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

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

<210> 7

<211> 34

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 7

ES 2 644 317 T3

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

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

Cys Ser

<210> 8

<211> 34

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 8

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

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

Cys Ser

10 <210> 9

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 9

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

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

Cys Ser

<210> 10

<211> 34

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 10

ES 2 644 317 T3

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

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

Cys Ser

<210> 11

<211> 41

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 11

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

Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys Gly Gly Arg Met Leu Pro Gln Leu
20 25 30

10 Val Cys Arg Leu Val Leu Arg Cys Ser
35 40

<210> 12

<211> 41

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 12

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

Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys Gly Gly Arg Met Leu Pro Gln Leu
20 25 30

Val Cys Arg Leu Val Leu Arg Cys Ser
35 40

<210> 13

20 <211> 41

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

25 <400> 13

ES 2 644 317 T3

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

Arg Ile Gln Ala Leu Ile Pro Lys Gly Gly Arg Leu Leu Pro Gln Leu
20 25 30

Val Cys Arg Leu Val Leu Arg Cys Ser
35 40

<210> 14

<211> 41

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 14

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

Arg Ile Gln Ala Leu Ile Pro Lys Gly Gly Arg Leu Leu Pro Gln Leu
20 25 30

Val Cys Arg Leu Val Leu Arg Cys Ser
35 40

10

<210> 15

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 15

Cys Leu Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Phe Asn Arg Tyr Leu Thr
1 5 10 15

Pro Gln Leu Val Cys Arg Leu Val Leu Arg Cys
20 25

<210> 16

20 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

25 <400> 16

ES 2 644 317 T3

Cys Trp Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Phe Asn Arg Tyr Leu Thr
1 5 10 15

Pro Gln Leu Val Cys Arg Leu Val Leu Arg Cys
20 25

<210> 17

<211> 28

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 17

Ala Leu Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Phe Asn Arg Tyr Leu Thr
1 5 10 15

Pro Gln Leu Val Cys Arg Leu Val Leu Arg Ala Ala
20 25

10 <210> 18

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 18

Gly Leu Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Phe Asn Arg Tyr Leu Thr
1 5 10 15

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

REIVINDICACIONES

1. Un tensioactivo reconstituido que comprende:
 una mezcla de fosfolípidos;
 un polipéptido análogo de la proteína tensioactiva nativa SP-B; y
- 5 un polipéptido análogo de la proteína tensioactiva nativa SP-C representada por la fórmula general:
 $IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLLLLLILGALL\Omega_pG_pL_p$ (I)
 en la que:
 Ω es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en M o M oxidado sobre el átomo de azufre, I, L, y nL (norLeucina);
- 10 p es 0 o 1
 dicha mezcla de fosfolípidos comprendiendo:
 i) una cantidad de 50% en peso de DPPC;
 ii) una cantidad de 10% en peso de POPG; y
 iii) una cantidad de 40% en peso de una fracción derivada de manera natural de fosfolípidos insaturados que consiste esencialmente en:
 desde 30 a 50% de POPC, desde 10 a 20% de PLPC, desde 4 a 10% de P(:1)OPC, desde 5 a 8% de SLPC, desde 5 a 8% de DOPC, desde 1 a 3% de SAPC, desde 5 a 15% de SOPC, desde 1 a 2% de PAPC, desde 1 a 3% de PDPC, desde 0 a 3,5% de SOPE, desde 0 a 8% de SAPE, desde 0 a 4% de SLPE, desde 0 a 2,5% de PLPE, desde 0 a 3,5% de POPE; desde 0 a 2,0% de LAPE, desde 0 a 2% de LLPE, desde 0 a 10% de PSM;
- 20 siendo calculadas todas las cantidades i), ii) y iii) sobre el peso total de la mezcla de fosfolípidos;
 en el que el análogo de polipéptido de la proteína tensioactiva nativa SP-B está representada por la fórmula general (II)
 $(FP\theta PLPY)_fC\Delta LCRALIKRIQA\Omega IPKGGR\Omega LPQLVCRLVL\Phi CS$ (II)
 en el que:
- 25 θ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L, I y C, preferiblemente C; y
 Δ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, I y L, preferiblemente W;
 Ω es un residuo de aminoácido seleccionado independientemente del grupo que consiste en M, I, L y nL, preferiblemente L;
 Φ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R y T, preferiblemente R; y
- 30 f es un número entero que tiene un valor de 0 o 1;
 o el análogo polipéptido de la proteína tensioactiva nativa SP-B está representado por la fórmula general (III)
 $X\Delta LCRALIKRFNRYLTPQLVCRLVLR\Phi \Sigma_q$ (III)
 en el que
 X es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en C, A y G, preferiblemente C;
- 35 Δ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, L, nL e I, preferiblemente W o L;
 Φ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en C, A y G, preferiblemente C;
 Σ es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en S, G y A; y
 q es 0 o 1.
- 40 2. El tensioactivo reconstituido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el análogo de polipéptido de la proteína tensioactiva nativa SP-C está representado por la fórmula

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLILLGALLLGL (Ic)

3. El tensioactivo reconstituido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el análogo de polipéptido de fórmula (II) en la que f es 0 se selecciona del grupo de secuencias representadas por las "fórmulas"

CWLCCRALIKRIQAMIPKGGRRMLPQLVCRLVLRCS (IIa)

5 CLLCCRALIKRIQAMIPKGGRRMLPQLVCRLVLRCS (IIb)

CWLCCRALIKRIQALIPKGGRRLLPQLVCRLVLRCS (IIc)

CLLCCRALIKRIQALIPKGGRRLLPQLVCRLVLRCS (IId)

4. El tensioactivo reconstituido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el polipéptido de fórmula (II) en la que f es 1 se selecciona del grupo de secuencias representadas por las "fórmulas"

10 FPCPLPYCWLCCRALIKRIQAMIPKGGRRMLPQLVCRLVLRCS (IIe)

FPIPLPYCWLCCRALIKRIQAMIPKGGRRMLPQLVCRLVLRCS (IIf)

FPCPLPYCWLCCRALIKRIQAMIPKGGRRMLPQLVCRLVLRCS (IIg)

FPIPLPYCWLCCRALIKRIQALIPKGGRRLLPQLVCRLVLRCS (IIh)

15 5. El tensioactivo reconstituido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el polipéptido de fórmula (III) se selecciona del grupo de secuencias representadas por las "fórmulas"

CLLCCRALIKRFNRYLTPQLVCRLVLRCS (IIIa)

CWLCCRALIKRFNRYLTPQLVCRLVLRCS (IIIb)

ALLCCRALIKRFNRYLTPQLVCRLVLRCS (IIIc)

GLLCCRALIKRFNRYLTPQLVCRLVLRGG (IIId)

20 6. El tensioactivo reconstituido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la fracción derivada de manera natural de fosfolípidos insaturados es una L- α -fosfatidilcolina derivada de yema de huevo.

7. Una formulación farmacéutica que comprende un tensioactivo reconstituido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, estando dicha formulación en forma de una solución, una dispersión, una suspensión o un polvo seco, opcionalmente en combinación con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

25 8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicha formulación está en forma de una suspensión acuosa.

9. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el tensioactivo reconstituido está en una concentración comprendida entre 5 y 100 mg/ml de la suspensión acuosa.

10. Un kit, que comprende:

30 a) un tensioactivo reconstituido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en forma de polvo en una primera forma de dosificación unitaria;

b) un portador farmacéuticamente aceptable en una segunda forma de dosificación unitaria; y

c) medios de recipiente para contener dichas primera y segunda formas de dosificación.

35 11. El tensioactivo reconstituido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso como medicamento.

12. El tensioactivo reconstituido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento o profilaxis del síndrome de dificultad respiratoria (RDS) en bebés prematuros o para el tratamiento o profilaxis de otras enfermedades relacionadas con una deficiencia o disfunción de tensioactivo.

40 13. El tensioactivo reconstituido para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la enfermedad incluye RDS en adultos (ARDS), síndrome de aspiración de meconio (MAS) y displasia broncopulmonar (BPD).

Figura 1

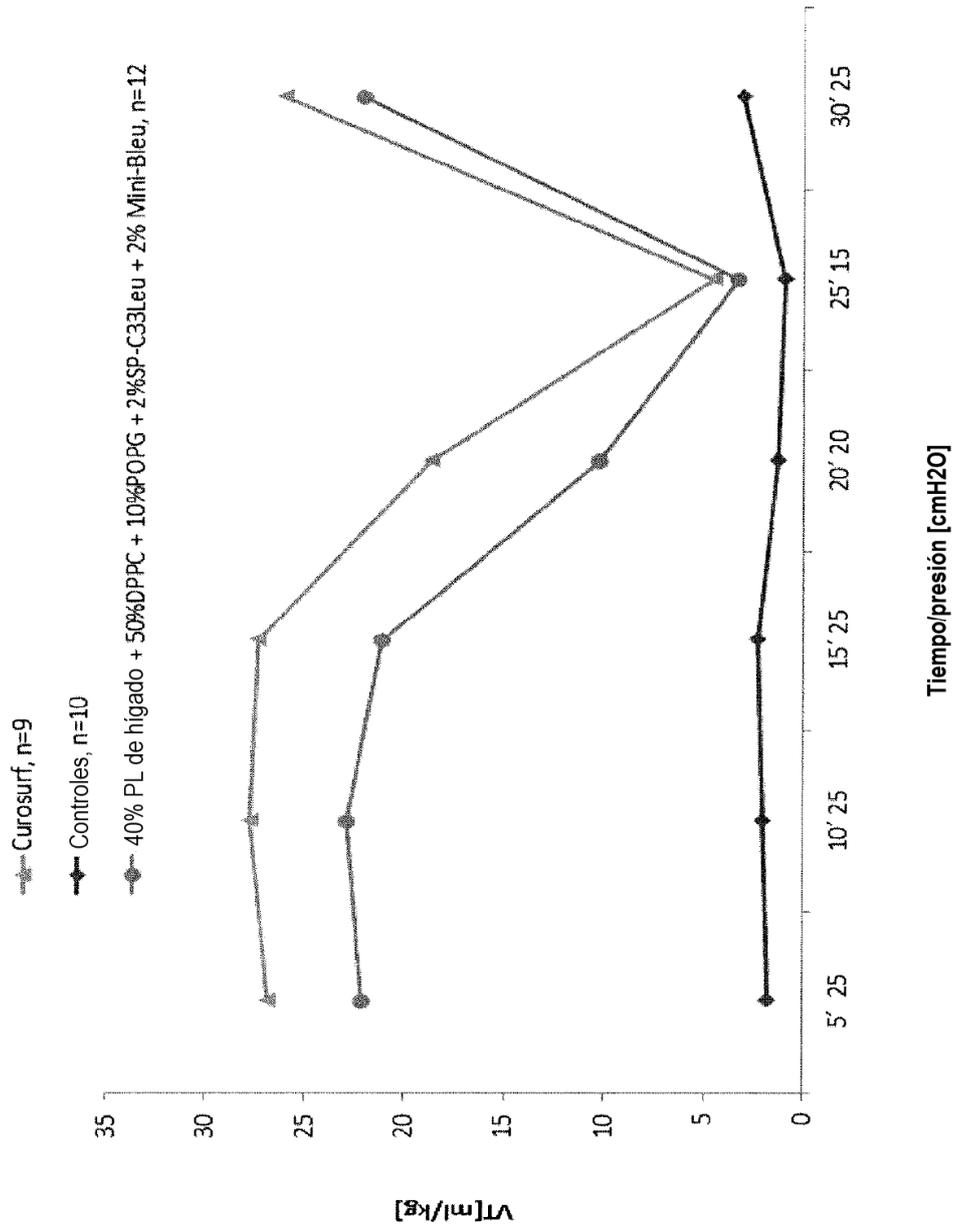


Figura 2

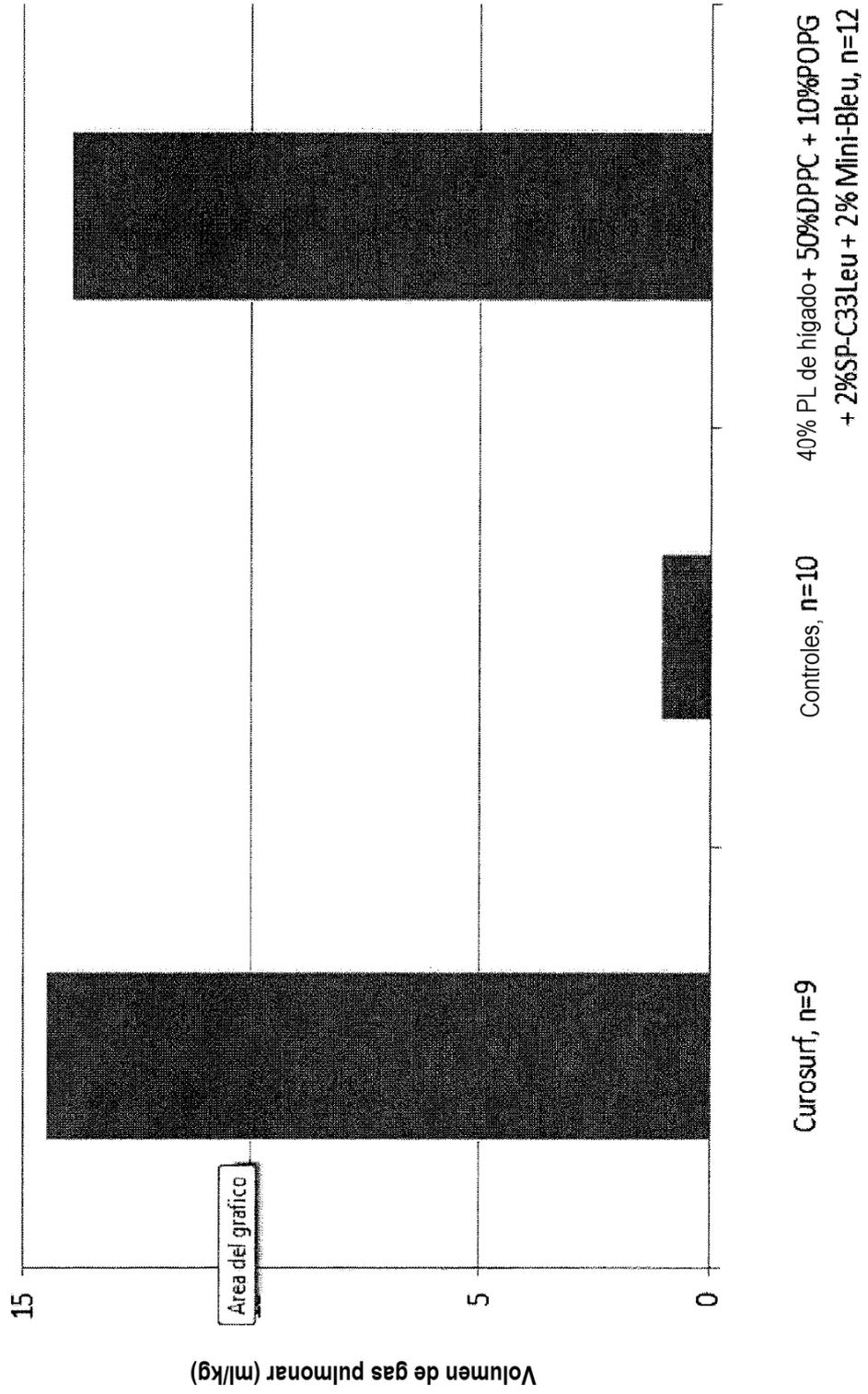


Figura 3

■ DP PC 50%+ PC de yema de huevo 40% +POPG 10% + SP-C33Leu 2% + Mini-BLeu 2%, n=9

▲ Curosurf, n=10

◆ Controles no tratados , n=9

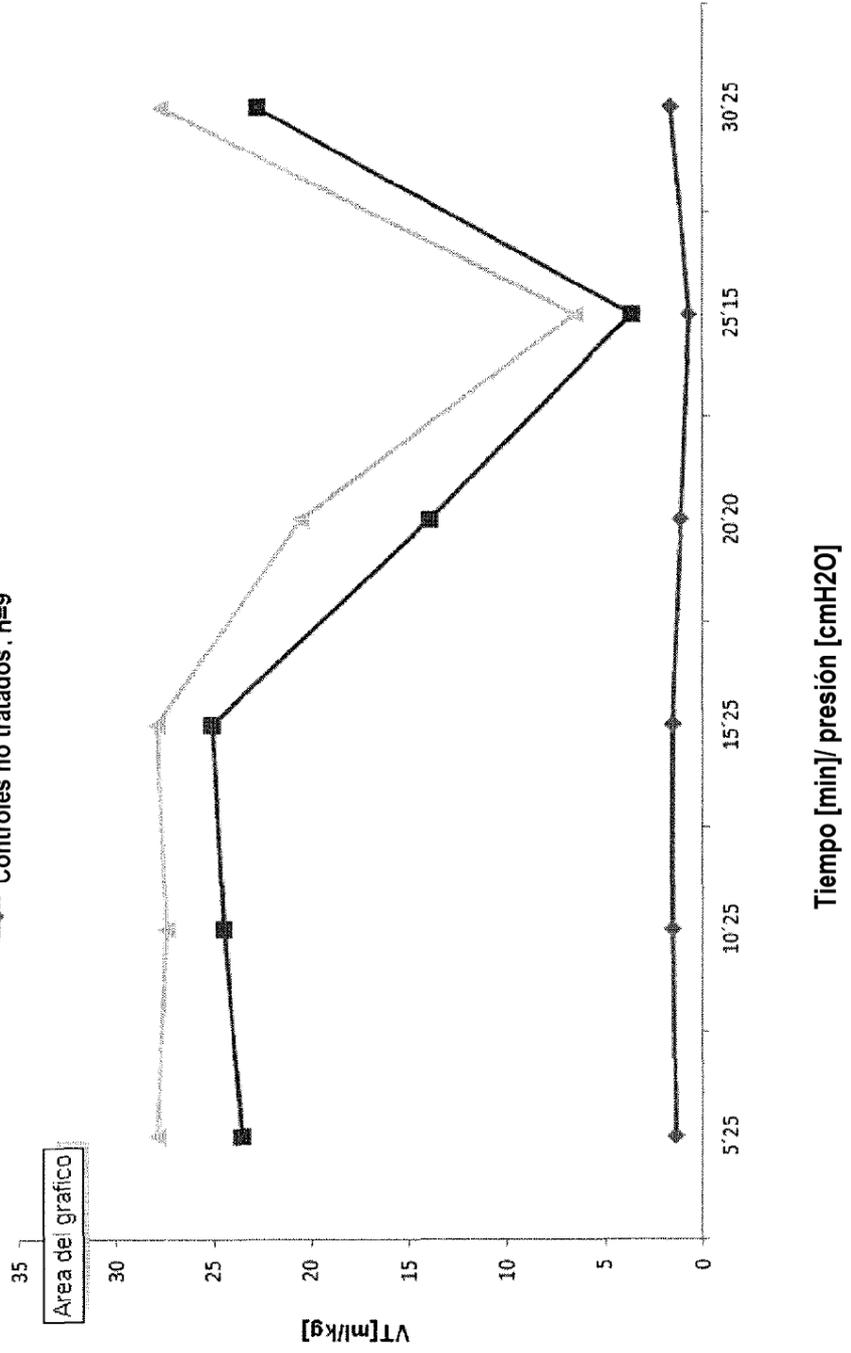


Figura 4

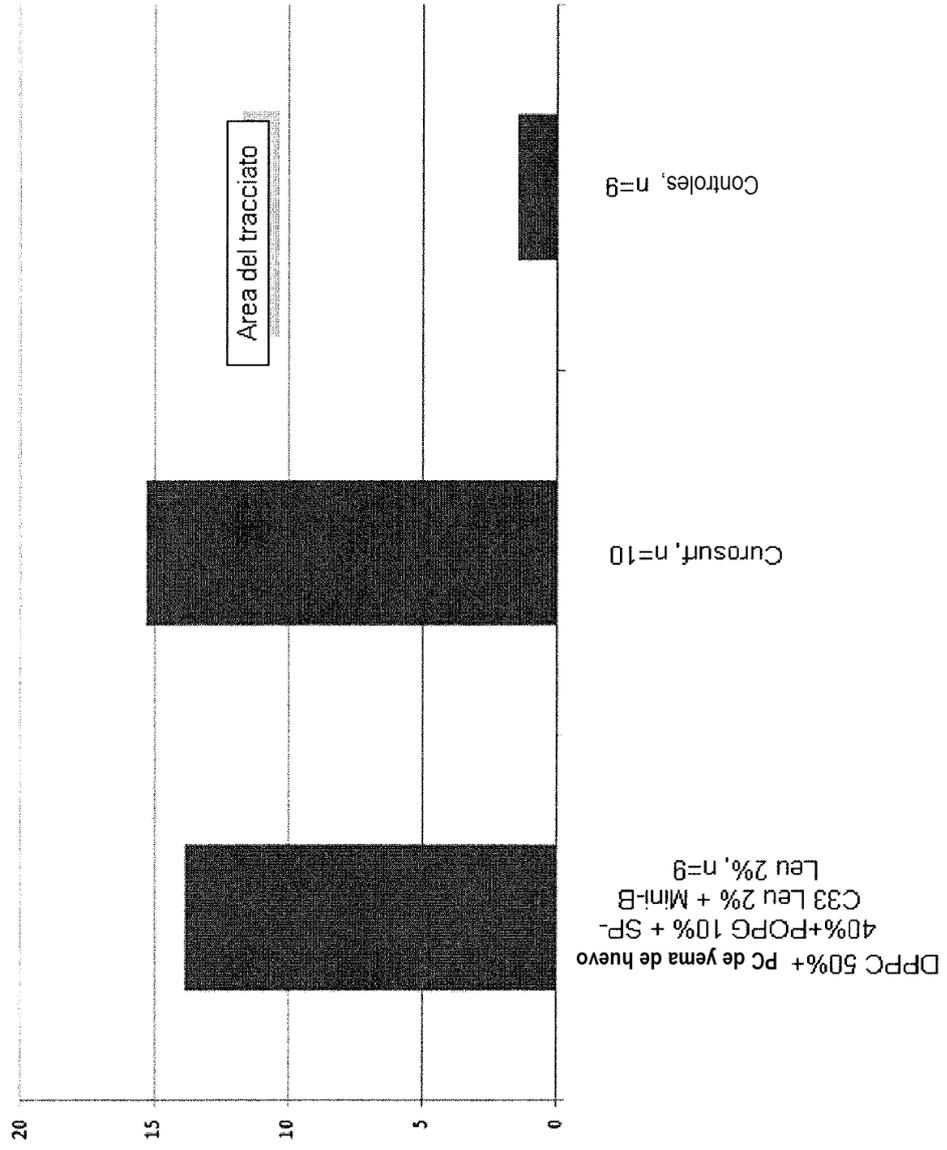


Figura 5

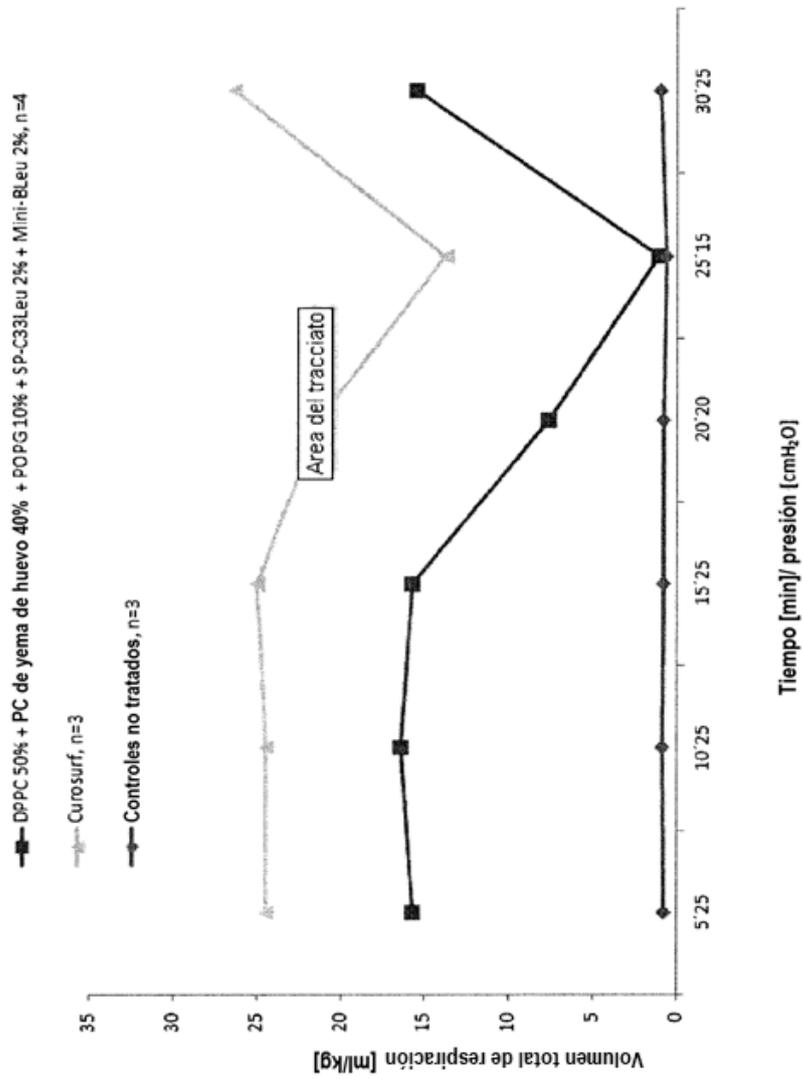


Figura 6

Volumen de gas pulmonar

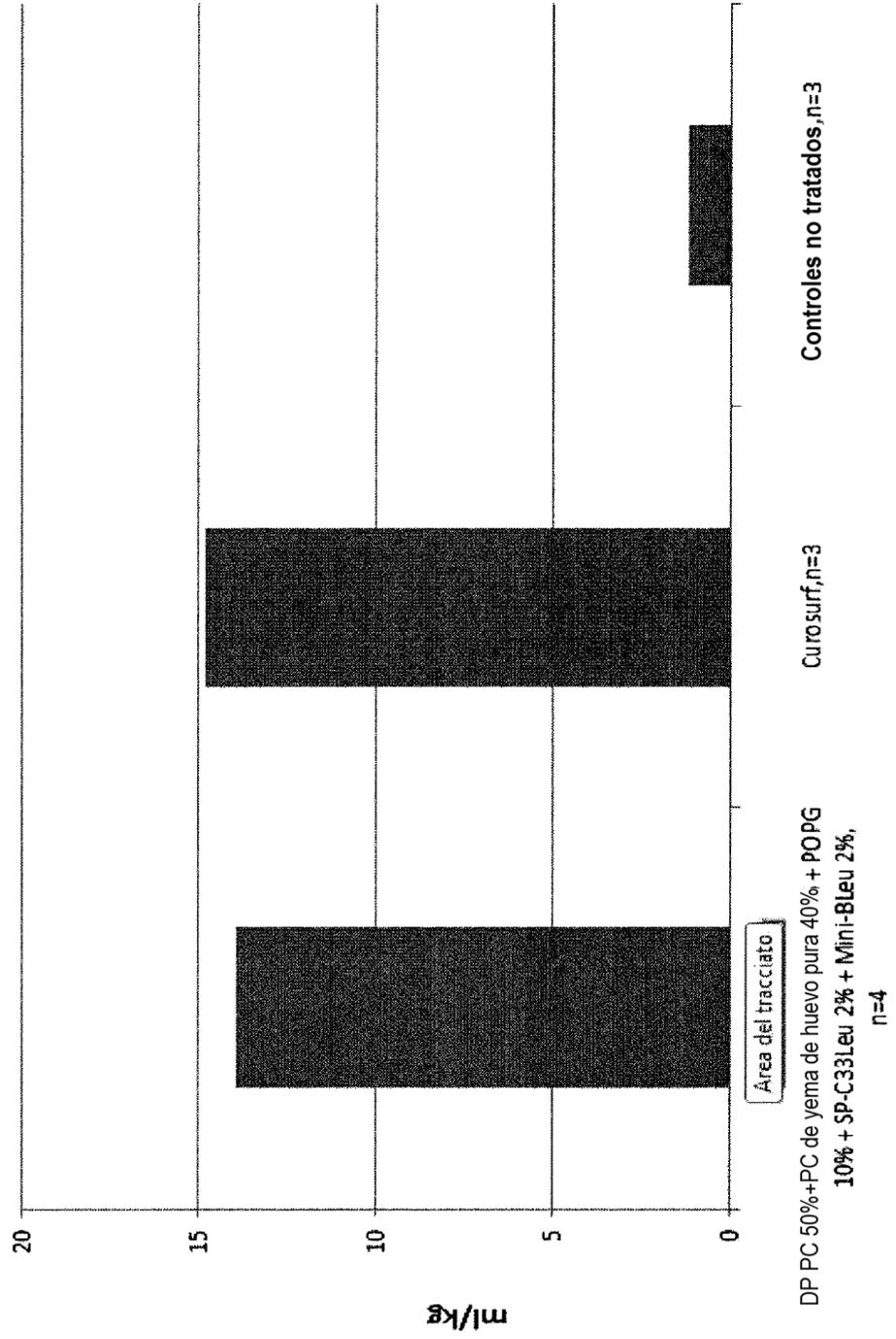


Figura 7

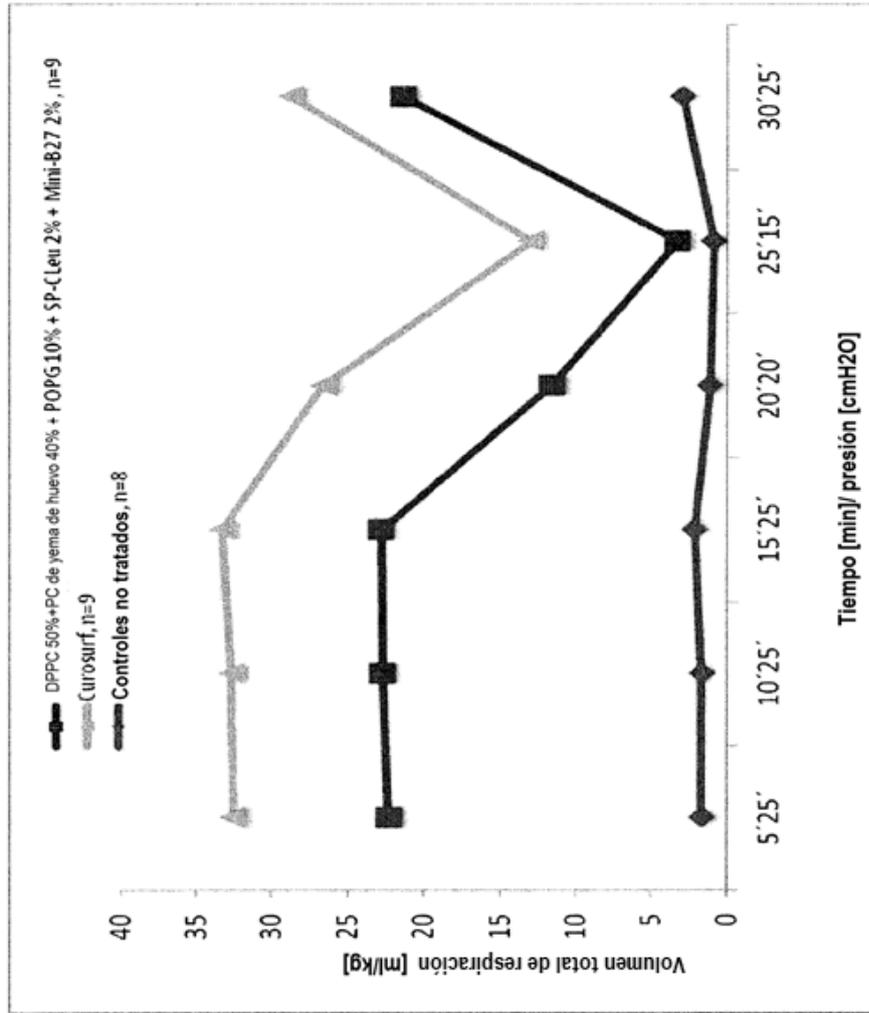


Figura 8

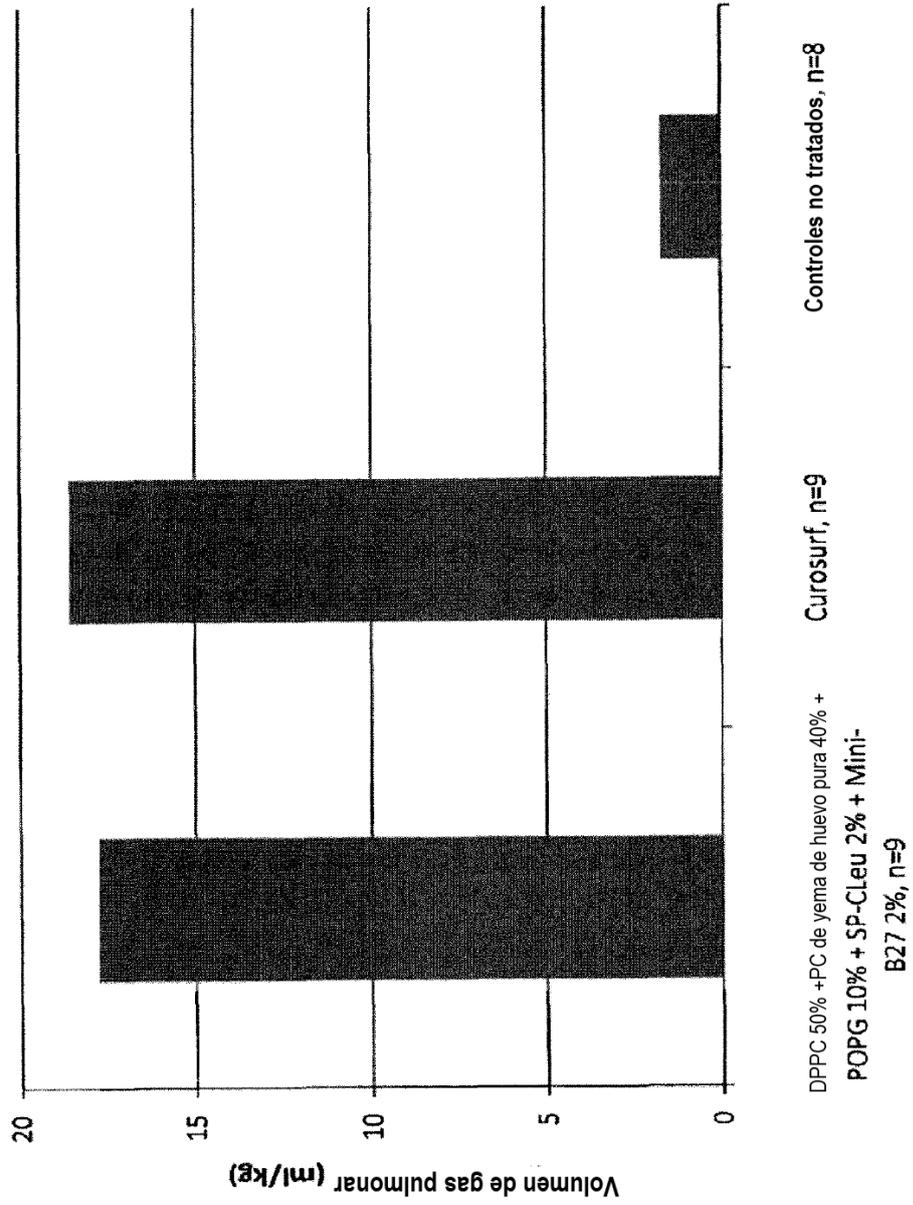


Figura 9

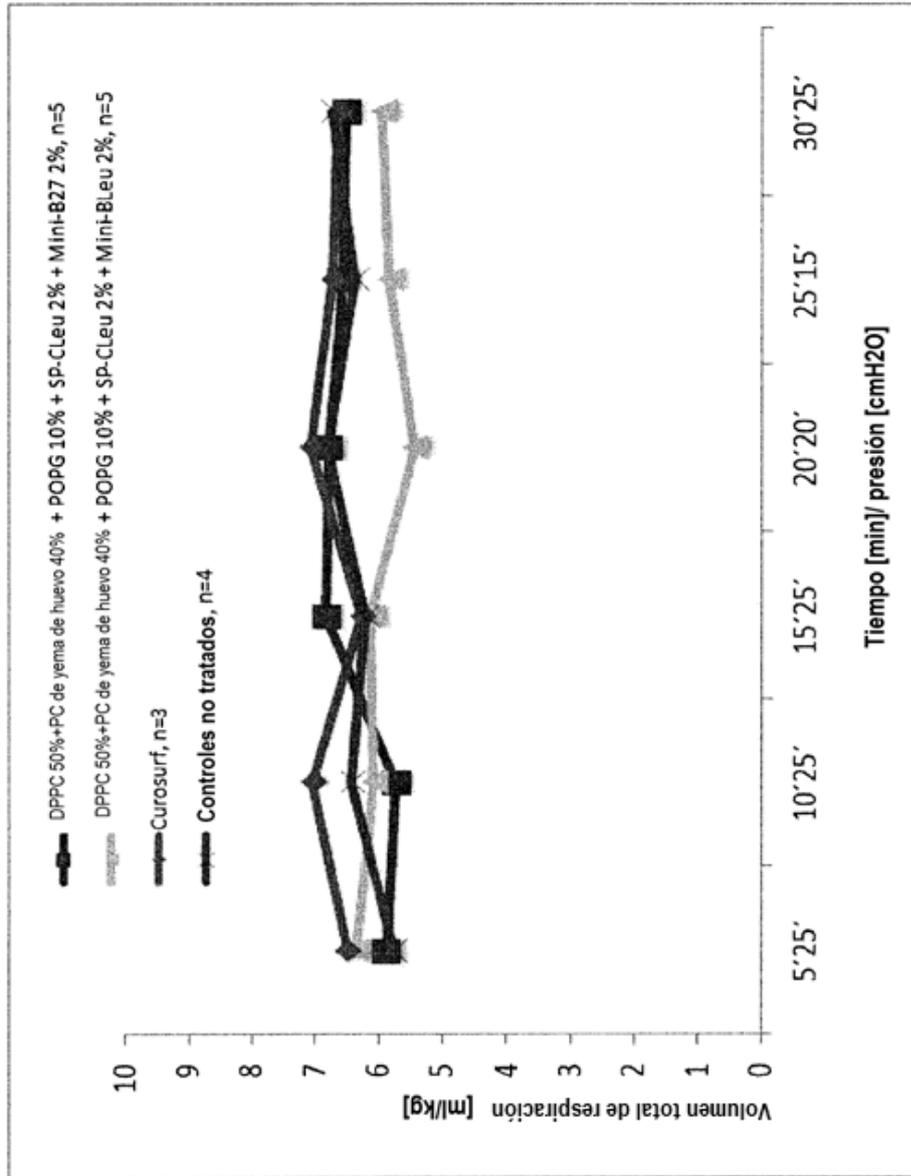


Figura 10

