

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication :
MA 25381 A1

(51) Cl. internationale :
A61P 11/00

(43) Date de publication :
01.04.2002

(21) N° Dépôt :
26285

(22) Date de Dépôt :
03.08.2001

(30) Données de Priorité :
12.02.1999 IT MI99A000275

(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT:
PCT/EP00/01044 09.02.2000

(71) Demandeur(s) :
CHIESI FARMACEUTICI S.P.A, VIA PALERMO 26/A, I-43100 PARMA (IT)

(72) Inventeur(s) :
PAOLO VENTURA ; BENGT ROBERTSON ; JAN JOHANSSON ; TORE CURSTEDT ; HANS JÖRNVALL

(74) Mandataire :
CABINET PATENTMARK

(54) Titre : **PEPTIDES ARTIFICIELS A ACTIVITE DE SURFACE ET LEUR USAGE DANS LA PREPARATION DE SURFACTANT ARTIFICIEL**

(57) Abrégé : **PEPTIDES ARTIFICIELS A ACTIVITE DE SURFACE ET LEUR USAGE DANS LA PREPARATION DE SURFACTANT ARTIFICIEL**

I.V. 2020
du 3/8/2001

PEPTIDES ARTIFICIELS A ACTIVITE DE SURFACE ET LEUR USAGE DANS
LA PREPARATION DE SURFACTANT ARTIFICIEL

5

La présente invention propose de nouveaux peptides artificiels à activité de surface. En particulier, la présente invention propose des analogues de la SP-C qui, une fois combinés avec des lipides adaptés, sont particulièrement efficaces pour réduire la tension superficielle à l'interface air-liquide.

10

Par conséquent, les peptides de l'invention peuvent être utilisés en association avec des lipides, et facultativement avec la SP-B ou un analogue actif de celle-ci ou un substitut de la SP-B, pour la préparation de surfactants artificiels utiles dans le traitement du syndrome de détresse respiratoire (SDR), d'autres déficits en surfactant ou dysfonctionnement, de maladies pulmonaires apparentées telles que les

15 pneumonie, bronchite, asthme, syndrome d'aspiration de méconium et aussi d'autres maladies comme l'otite media sérique (otorrhée).

15

Arrière-plan de l'invention

20

Le surfactant pulmonaire réduit la tension superficielle à l'interface air-liquide de la paroi alvéolaire, évitant le collapsus des poumons en fin d'expiration. Le déficit en surfactant est une affection courante chez les enfants nés prématurés et provoque le syndrome de détresse respiratoire (SDR) qui peut être traité efficacement avec des surfactants naturels extraits de poumons d'animaux (Fujiwara, T. et Robertson B. (1992) dans : Robertson, B., van Golde, L.M.G. et Batenburg, B. (éd.) *Pulmonary Surfactant : From molecular biology to clinical practice*, Amsterdam, Elsevier, p.

25 561-592). Les principaux composants de ces préparations de surfactant sont des phospholipides comme les 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DPPC), phosphatidylgly-cérol (PG) et les protéines hydrophobes associées au surfactant B et C (SP-B et SP-C). Les protéines hydrophiles associées au surfactant SP-A et SP-D qui sont des lectines collagènes de type C (dépendant du Ca^{2+}) et censées agir

30 principalement dans le système défense-hôte, ne sont normalement pas comprises dans les préparations de surfactant à cause des procédés utilisés d'extraction du solvant organique.

25

30

Les SP-B et SP-C représentent 1 à 2% uniquement de la masse de surfactant, mais elles peuvent quand même exercer des améliorations considérables sur l'activité

25
30
01 AVR 2002

fect

de surface, par rapport aux préparations lipidiques pures (Curstedt, T. et autres (1987) Eur. J. Biochem. **168**, 255-262 ; Takahashi, A., Nemoto, T. et Fujiwara, T. (1994) Acta Paediatr. Jap. **36**, 613-618). Les structures primaires et secondaires des SP-B et SP-C et une structure tertiaire de SP-C en solution ont été déterminées (voir 4). La

5 SP-B est composée de deux chaînes polypeptidiques identiques de 79 acides aminés, reliées par un pont disulfure intercaténaire (Curstedt, T. et autres (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**, 2985-2989 ; Johansson, J., Curstedt, T. et Jörmvall, H. (1991) Biochemistry **30**, 6917-6921). Chaque chaîne monomère a trois ponts disulfure intracaténaires et au moins quatre hélices amphipathiques exposant une surface

10 polaire et une surface apolaire par lesquelles la SP-B peut interagir avec deux doubles couches lipidiques et les rapprocher (Andersson, M. et autres (1995) FEBS Lett. **362**, 328-332). La SP-C est une lipoprotéine composée de 35 résidus d'acides aminés avec un domaine α -hélicoïdal entre les résidus 9-34 (Johansson, J. et autres (1994) Biochemistry **33**, 6015-6023). L'hélice est composée principalement de résidus valyle

15 et est incorporée dans une double couche lipidique et orientée parallèlement aux chaînes lipidiques acyle (Vandenbussche, et autres (1992) Eur. J. Biochem. **203**, 201-209). Les deux groupements palmitoyle sont liés par covalence aux résidus cystéine dans les positions 5 et 6 dans la partie N-terminale du peptide (Curstedt, T. et autres (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **87**, 2985-2989). Les deux résidus conservés

20 chargés positivement, l'arginine et la lysine, aux positions 11 et 12, interagissent peut-être avec les groupements de tête chargés négativement de la membrane lipidique, augmentant ainsi sa rigidité. La rigidité de l'interaction lipide-peptide peut être réduite vers l'extrémité C-terminale, puisqu'elle contient seulement des petits résidus ou des

25 résidus hydrophobes, rendant cette partie potentiellement plus mobile dans une double couche phospholipidique. Il semblerait que la SP-C influence l'épaisseur et la fluidité des lipides environnants grâce à l'hélice poly-valyle extrêmement stable (Johansson, J. et Curstedt, T. (1997) Eur. J. Biochem. **244**, 675-693).

Etat de la technique

Puisque les préparations de surfactant obtenues à partir de tissu animal présentent des

30 désavantages, comme leur disponibilité en quantités limitées et le fait qu'elles peuvent contenir des agents infectieux et provoquer des réactions immunologiques, il y a eu des tentatives de créer des surfactants artificiels (Johansson, J. et Curstedt, T. (1997)

Eur. J. Biochem. **244**, 675-693 ; Johansson, J. et autres (1996) *Acta Paediatr.* **85**, 642-646), habituellement à partir de lipides synthétiques et de protéines hydrophobes.

Les travaux précédents ont démontré que la SP-C synthétique ne pouvait pas se replier comme le peptide natif en une conformation α -hélicoïdale nécessaire à une
5 activité de surface optimale (Johansson, J. et autres (1995) *Biochem. J.* **307**, 535-541), et par conséquent elle ne pouvait pas bien interagir avec les lipides du surfactant.

Par conséquent, les analogues de SP-C synthétique ne se replient pas comme le peptide natif et n'interagissent pas bien avec les lipides du surfactant. Pour
10 contourner ce problème, plusieurs tentatives ont été faites pour modifier la séquence, par exemple en remplaçant tous les résidus Val hélicoïdaux dans la SP-C par Leu, ce qui favorise fortement la conformation α -hélicoïdale. L'analogue transmembranaire correspondant, SP-C (Leu), révèle un bon étalement à l'interface air-liquide lorsqu'il est combiné avec un mélange DPPC :PG :PA (68 :22 :9) (p/ p/ p). Cependant, la
15 valeur de tension superficielle maximale pendant la compression superficielle cyclique (γ_{\max}) était considérablement supérieure à celle du surfactant natif. Il n'était en plus pas possible de préparer des mélanges lipide-peptide de concentrations supérieures à 20 mg/ ml environ, sans doute à cause de la formation d'oligomères peptidiques (Nilsson, G. et autres (1998) *Eur. J. Biochem.* **255**, 116-124). D'autres ont
20 synthétisé des analogues bioactifs de SP-C polyleucine de longueurs différentes (Takei, T. et autres (1996) *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 1550-1555). Dans ces dernières études, ni l'auto-oligomérisation ni les problèmes de production d'échantillons avec une concentration lipidique élevée ne sont abordés.

Des publications diverses traitent du problème concernant la provision
25 d'analogues peptidiques de peptides de surfactant naturel et elles donnent un certain nombre de solutions variées. Parmi ces publications, WO93 21225, EP 733 645, WO96 17872, au nom de Tokyo Tanabe, révèlent des analogues peptidiques de la SP-C naturelle, qui diffèrent de manière générale du peptide natif par rapport à la séquence de la partie N-terminale.

30 Les demandes de brevet du Scripps Research Institute WO89 06657 et WO92 22315 révèlent des analogues de la SP-B ayant d'autres résidus acide aminé hydrophobes et hydrophiles. Parmi d'autres, un peptide alternant des résidus Leucine et Lysine (KL₄) est revendiqué.

Clercx A. et autres, *Eur. J. Biochem* 229, 465-72, 1995, révèlent des peptides de longueurs différentes correspondant à l'extrémité N-terminale de la SP-C porcine et des peptides hybrides dérivés de la SP-C porcine et la bactériorhodopsine.

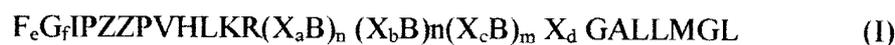
Johansson J. et autres, *Biochem. J.* 307, 535 : 41, 1995, révèlent des peptides synthétiques qui diffèrent de la SP-C native porcine par la substitution de certains acides aminés.

WO89/ 04326 au nom de California Biotechnology – Byk Gulden et WO91/ 18015 au nom de California Biotechnology – Scios Nova, révèlent des analogues de la SP-C qui contiennent une séquence N-terminale initiale dans laquelle les deux Cys de la SP-C naturelle sont remplacées par deux Ser.

Description de l'invention

On a trouvé maintenant que des peptides analogues de la SP-C qui combinent les caractéristiques suivantes : 1) substitution des résidus Val par d'autres résidus neutres et hydrophobes ; 2) substitution des résidus Cys par des résidus Ser ; 3) remplacement de certains des résidus acide aminé neutres par des résidus volumineux ou polaires, révélaient des propriétés particulièrement favorables à la réduction de la tension superficielle. En particulier, on a trouvé que la dernière caractéristique, en raison des charges positives conférées par les résidus polaires ou l'encombrement stérique conféré par les substituants volumineux, permettait d'éviter l'auto-oligomérisation.

Comme il suit, suivant un premier aspect, l'invention propose des analogues de la SP-C ayant la formule générale (I), en utilisant le code des acides aminés à une lettre :



où :

X est un acide aminé sélectionné parmi le groupe composé de V, I, L, Nle (norleucine) ;

B est un acide aminé sélectionné parmi le groupe composé de Ornithine, K, I, W, F, Y, Q, N ;

Z est un acide aminé sélectionné parmi le groupe composé de S, C, F, où les résidus Ser ou Cys sont facultativement liés par des liaisons ester ou thio-ester avec des groupements acyle contenant de 12 à 22 atomes de carbone liés.

a est un nombre entier de 1 à 19

- b est un nombre entier de 1 à 19
 c est un nombre entier de 1 à 21
 d est un nombre entier de 0 à 20
 e est 0 ou 1
 5 f est 0 ou 1
 n est 0 ou 1
 m est 0 ou 1
- avec les conditions :
- $n + m > 0$;
 10 - $f \geq e$;
 - $(X_a B)_n (X_b B)_n (X_c B)_m X_d$ est une séquence ayant un maximum de 22 acides aminés, préférablement de 10 à 22.

Les peptides de formule (I) préférés ont les séquences suivantes :

- (Ia) FGIPSSPVHLKRX₄BX₄BX₄BXGALLMGL
 15 (Ib) FGIPSSPVHLKRX₅BX₅BX₄GALLMGL
 (Ic) FGIPSSPVHLKRX₄BX₁₁GALLMGL
 (Id) FGIPSSPVHLKRX₈BX₇GALLMGL
 (Ie) FGIPSSPVHLKRX₁₁BX₄GALLMGL

- Parmi les séquences (Ia) – (Ie), celles ayant B = Lys ou Phe et X = Leu, Ile ou
 20 Nle sont préférés.

Suivant les réalisations préférées, les peptides de formule (Ia) – (Ie) ont les séquences suivantes, respectivement :

- FGIPSSPVHLKRLILKLLLLKILLKLGALLMGL [SP-C (LKS)]
 FGIPSSPVHLKRLILKLLLLIKLLILGALLMGL [SP-C (LKS)₁]
 25 FGIPSSPVHLKRLILKLLLLILLLILGALLMGL [SP-C (LKS)₂]
 FGIPSSPVHLKRLILLLLLKLILLILGALLMGL [SP-C (LKS)₃]
 FGIPSSPVHLKRLILLLLLLIKLLILGALLMGL [SP-C (LKS)₄]
 FGIPSSPVHLKRLILFLLLFILLFLGALLMGL [SP-C (LFS)]

- Dans une réalisation plus préférée de l'invention, les résidus Ser sont liés par
 30 covalence avec des groupements acyle contenant de 12 à 22 atomes de carbone.

Les peptides de formule (I) peuvent être préparés par des méthodes de synthèse ou des techniques de recombinaison.

Des méthodes de synthèse classiques sont décrites, par exemple, dans Schroeder et autres, « Les peptides », vol. 1, Academic Press, 1965 ; Bodanszky et autres, « Peptide synthesis », Interscience Publisher, 1996 ; Baramy & Merrifield, « The peptides ; Analysis, Synthesis, Biology », vol. 2, chapitre 1, Academic Press, 5 1980. Lesdites techniques comprennent la synthèse peptidique en phase solide, en solution, les méthodes de synthèse de chimie organique ou des combinaisons de celles-ci.

Les peptides S- ou O-acylés sont préférablement synthétisés par traitement des peptides non acylés avec du chlorure d'acyle dans de l'acide trifluoroacétique pur 10 comme il a été décrit par Yousefi-Salakdeh et autres, *Biochem. J.* 1999, 343, 557-562. Après synthèse et purification, les peptides synthétiques ont été caractérisés de manière biochimique et biophysique, comme il est décrit dans la section « Exemples ».

L'activité des peptides de l'invention dans la réduction de la tension 15 superficielle a été évaluée en association à des lipides et des phospholipides, de la SP-B, des analogues de la SP-B ou des substituts de la SP-B. En particulier, les peptides ont été combinés avec de la DPPC (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine) / PG (phosphatidylglycérol)/ PA (acide palmitique) avec ou sans SP-B, un analogue actif de celle-ci et des polymyxines.

20 Les résultats des essais d'activité de surface à bulle-pulsation montrent clairement que les peptides synthétiques suivant la présente invention réduisent fortement les tensions superficielles minimale et maximale pendant la compression superficielle cyclique (γ_{\min} et γ_{\max}) jusqu'à des valeurs comparables à celles obtenues en utilisant des surfactants de sources naturelles.

25 L'addition de SP-B ou d'un analogue actif de celle-ci au mélange peptide/lipides-phospholipides a donné des résultats particulièrement favorables. De plus, de façon étonnante, on a trouvé que les polymyxines, en particulier la polymyxine B, agissaient comme des substituants de la SP-B et que leur addition donnait des résultats comparables à ceux obtenus avec la SP-B.

30 Suivant un deuxième aspect, l'invention propose un surfactant synthétique comprenant un ou plusieurs peptides de formule (I), en mélange avec des lipides et/ou des phospholipides et facultativement de la SP-B, un dérivé actif de celle-ci ou des polymyxines. Les lipides/ phospholipides adaptés peuvent être sélectionnés parmi le

groupe composé des phosphatidyl-cholines (préférentiellement DPPC), PG, PA, triacylglycérols, sphingomyéline.

Dans une réalisation encore plus préférée de l'invention, des mélanges de surfactant contenant le peptide dans lequel les chaînes de palmitoyle sont liées par O-covalence aux résidus Ser doivent être utilisés. On a trouvé que les mélanges de surfactant contenant une forme dipalmitoylée du peptide de référence (SP-C (Leu)) révélèrent une stabilité de film de surface plus importante et une taille accrue du réservoir lipidique associé à la surface, par rapport aux mélanges contenant le peptide non palmitoylé correspondant, comme il a été mesuré par un système de bulle piégée.

10 Dans les échantillons contenant 5% de peptide dipalmitoylé, la valeur γ_{\min} était inférieure à 1,5 mN / m et les films étaient très stables, alors que la tension superficielle augmentait de moins de 0,5 mN / m en 10 mn à un volume de bulle constant. Au contraire, la valeur γ_{\min} pour le peptide non palmitoylé était approximativement de 5 mN / m et les films étaient moins stables comme il a été observé avec un claquement de bulle fréquent à des tensions superficielles faibles. De plus, après déplétion de la sous-phase pour les échantillons qui contenaient le peptide non palmitoylé, la capacité d'atteindre une tension superficielle stable proche de zéro était perdue après quelques étapes d'adsorption, tandis qu'avec le peptide dipalmitoylé la qualité du film ne se détériorait pas même après plus de 10 étapes d'expansion et l'incorporation de matière de réservoir équivalente à plus deux couches uniques. L'activité de surface améliorée des peptides dipalmitoylés a aussi été démontrée à l'aide d'un surfactomètre à bulle à pulsation. De plus, on a trouvé que la présence de groupements acyle réduisait davantage la tendance à former des oligomères. Cette découverte est très importante, car pendant la préparation des surfactants artificiels, il a été trouvé que l'oligomérisation peptidique empêchait la préparation des mélanges à des concentrations supérieures à 20 mg / ml (Nilsson et autres. *Eur. J. Biochem.* 1998, 255, 116-124).

25

Le surfactant synthétique peut être préparé en mélangeant des solutions ou des suspensions de peptides et de lipides et en séchant le mélange par la suite.

30 En l'occurrence, le mélange sec peut être mis en suspension, dispersé ou administré comme tel aux sujets qui ont besoin de traitement contre un déficit en surfactant.

Le surfactant synthétique sera préférablement administré par voie endotrachéale ou par aérosol. Cette dernière forme d'administration nécessitera la combinaison de petites particules de surfactant avec un propulseur inactif adapté. D'autres formes d'administration, comme la nébulisation ou la vaporisation de solutions ou de suspensions stables de surfactant sont aussi comprises dans le champ de l'invention.

Suivant un autre aspect, l'invention propose l'utilisation des peptides décrits pour la préparation d'un agent surfactant devant être utilisé dans tous les cas de déficit en surfactant néonatal ou de l'adulte ou de dysfonctionnement, de maladies pulmonaires apparentées comme les pneumonie, bronchite, asthme, syndrome d'aspiration de méconium et aussi d'autres maladies comme l'otite moyenne sérique (otorrhée).

Typiquement, l'agent surfactant sera utilisé, préférablement sur administration par voie endotrachéale, dans le traitement du syndrome de détresse respiratoire qui touche souvent les enfants nés prématurés.

Les exemples suivants illustrent l'invention de façon plus détaillée.

Exemple 1

Synthèse peptidique et purification

Un analogue de la SP-C, SP-C (LKS) (Fig. 1) a été synthétisé à l'aide de la technologie en phase solide pas à pas et la chimie du *tert*-butyloxycarbonyle (Kent, S.B.H. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 957-989) dans un instrument 430A de chez Applied Biosystems. La rupture de la liaison résine-peptide et la déprotection des chaînes latérales ont été réalisées dans un mélange fluorure d'hydrogène anhydre/métoxybenzène/ sulfure diméthylque, 10 : 1 : 1 (v/ v/ v) pendant 1,5 h à 0° C. Les groupements protecteurs et les capteurs ont été retirés par extraction répétée avec de l'éther diéthylique et le peptide a été extrait par la suite de la résine avec un mélange dichlorométhane/ acide trifluoroacétique (TFA) 3 : 1 (v/ v) suivi par une évaporation par rotation. L'extrait peptidique brut a été dissous à nouveau suivant une concentration de 100 mg/ ml dans un mélange chloroforme/ méthanol 1 : 1 (v/v) contenant 5% de H₂O. Une aliquote de 10 mg a été appliquée sur une colonne Sephadex LH-60 (40 x 1 cm) dans le même solvant (Curstedt, T. et autres (1987) *Eur. J. Biochem.*, **168**, 255-262). Des fractions de 2,5 ml ont été recueillies et les capacités

d'absorption à 214 et 280 nm ont été mesurées. L'identification et le dosage ont été réalisés par analyse des acides aminés.

Pour l'acylation, le peptide purifié (typiquement de 5 mg environ) est séché, dissous dans du TFA distillé (100 µl) et du chlorure d'acyle (10-20 équivalents par rapport au peptide) est ajouté. Après 10 minutes, la réaction est étouffée avec de l'éthanol aqueux à 80% (1,9 ml). La purification des peptides acyle est réalisée par chromatographie sur Lipidex 5000 dans un mélange chlorure d'éthylène/ méthanol 1 : 4 (v/v) suivi par une HPLC en phase inverse sur une colonne C18 en utilisant un gradient linéaire de 2-propanol/ TFA 0,1% jusqu'à méthanol (aqueux) 60% / TFA 0,1 % ou éthanol (aqueux) 75% / TFA 0,1 %.

Exemple 2

Caractérisation biochimique

La pureté du peptide a été vérifiée par électrophorèse sur gel de dodécylsulfate de sodium (SDS) et de polyacrylamide (PAGE) (Phast-system, Pharmacia, Suède) et par chromatographie en phase liquide sous haute pression en phase inverse (HPLC), en utilisant une colonne C₁₈ et un gradient linéaire de méthanol aqueux 60% / TFA 0,1 % et d'isopropanol / TFA 0,1% (Gustafsson, M. et autres (1997) *Biochem. J.* **326**, 799-806).

Les masses moléculaires ont été déterminées par spectrométrie de masse de désorption-ionisation laser assistée par matrice – temps de vol (MALDI-TOF) (Lasermat 2000, Finnigan, MAT) calibrée avec un peptide intestinal vasomoteur (M_r 3326.8).

La structure secondaire peptidique a été étudiée à l'aide d'une spectroscopie de dichroïsme circulaire (DC) (Jasco-720 Jasco, Japon). Après solubilisation avec du trifluoroéthanol (TFE), les spectres ont été enregistrés de 260 à 184 nm avec une vitesse de balayage de 20 nm / mn et une résolution de 2 points de donnée/ nm. L'ellipticité molaire résiduelle a été calculée et exprimée en kdeg x cm² / dmol. Les ellipticités molaires à 208 et 222 nm ont été utilisées pour évaluer la concentration de la structure hélicoïdale (Barrow, C. J. et autres (1992) *J. Mol. Biol.* **225**, 1075-1093).

Les études de structure secondaire du SP-C (LKS) à l'aide de la spectroscopie DC ont révélé un spectre typique pour les peptides α-hélicoïdaux et une concentration α-hélicoïdale de 75% environ a été évaluée à partir des valeurs minimales de 208 nm

et 222 nm. La structure secondaire restait stable après la dilution successive avec H₂O jusqu'à ce que du TFE 12% fasse que le peptide se solubilise dans du TFE pur.

La SDS-PAGE de SP-C (LKS) a révélé une bande unique semblable à la SP-C native tandis que l'analogue SP-C (Leu) sans Lys dans la partie hélicoïdale formait des oligomères. Contrairement à notre expérience avec des mélanges SP-C (Leu)/ lipides, qui sont difficiles à solubiliser dans des concentrations supérieures à 20 mg/ml (Nilsson, G. et autres (1998) *Eur. J. Biochem.* 255, 116-124), il a été possible de faire un mélange SP-C (LKS)/ lipides avec une concentration lipidique de 80 mg/ml et un rapport polypeptide/ lipide de 0,03.

10 Exemple 3

Préparation des mélanges peptide / lipide

Les DPPC, PG et PA ont été achetés chez Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Les lipides, dissous dans un mélange chloroforme/ méthanol 98 : 2 (v / v), ont été mélangés dans les proportions DPPC : PG : PA 68 : 22 : 9 (p / p / p) ou DPPC / PG 7 : 3 (p / p). Les préparations de surfactant ont été préparées en ajoutant le SP-C (LKS) seul ou SP-C (LKS) et SP-B, à chacun des mélanges lipidiques, suivant des rapports totaux en poids polypeptide/ lipide de 0 – 0,5. Les mélanges ont été évaporés sous azote et remis en suspension dans du NaCl 150 mmol/l ou dans du tampon de HEPES à pH 6,9 10 mmol/l contenant du NaCl 140 mmol/l et du CaCl₂ 2,0 mmol/l, suivant des concentrations lipidiques de 10 – 80 mg / ml. La congélation et le traitement par ultrasons répétés (50 W, 48 kHz) ont été réalisés jusqu'à l'obtention de suspensions homogènes. Dans certains cas, les suspensions finales ont été incubées à 45° C pendant 1 h.

Les préparations de surfactant mises en suspension dans du NaCl 150 mmol/l ont un pH de 3,5-5,5. Les valeurs de pH les plus basses 3,5-4,5 ont été observées dans les préparations contenant la SP-B. Puisque la SP-B native est purifiée à l'aide de solvants organiques acidifiés (Curstedt, T. et autres (1987) *Eur. J. Biochem.* 168, 255-262), il peut rester des petites quantités d'acide dans les préparations. Un pH proche du pH physiologique a été obtenu en mettant en suspension la préparation de surfactant dans un tampon de HEPES pH à 6,9, contenant du NaCl 140 mmol/l et du CaCl₂ 2 mmol/l (Tableau 1). Par rapport aux préparations correspondantes dans de la saumure non tamponnée, il n'y avait pas de changement des valeurs γ_{\max} et γ_{\min} lorsqu'un mélange DPPC/ PG 7 : 3 (p / p) était utilisé comme mélange lipidique.

Cependant lorsque du PA était inclus dans le mélange peptidique les deux valeurs γ_{\max} et γ_{\min} ont augmenté au pH le plus élevé (Tableaux 1 et 2).

Tableau 1 : propriétés superficielles des préparations de surfactant artificiel dans une solution salée physiologique

Les mesures ont été réalisées directement après la préparation des échantillons ou après incubation pendant 1 heure à 45° C. La concentration en phospholipides était 10 mg / ml dans du NaCl 150 mmol / l. Les valeurs enregistrées ont été obtenues à différents intervalles de temps avec un surfactomètre à bulle à pulsations à 37° C, compression superficielle de 50% et à raison de 40 cycles par minute. Les valeurs sont la moyenne (écart standard) de 3-5 mesures. Les abréviations sont définies dans le texte.

Préparation de surfactant		Température d'incubation	Tension superficielle (mM / m)					
SP-C (LKS) (% p / p)	SP-B (% p / p)		7,5 s		1 mn		5 mn	
			γ_{\min}	γ_{\max}	γ_{\min}	γ_{\max}	γ_{\min}	γ_{\max}
3	-	-	<1	41 (1)	<1	41 (1)	<1	41 (0)
3	-	45° C	<1	41 (1)	<1	41 (1)	<1	41 (1)
3	2	-	<1	33 (2)	<1	33 (2)	<1	33 (2)
3	2	45° C	<1	34 (1)	<1	34 (2)	<1	25 (2)
3	-	-	12	39 (5)	14 (4)	42 (4)	9(5)	42 (2)
3	-	45° C	8 (3)	35 (5)	9 (3)	39 (5)	6 (4)	42 (3)
3	2	-	2 (1)	31 (1)	2 (1)	31 (3)	2 (1)	33 (1)
3	2	45° C	3 (3)	29 (3)	1 (1)	33 (2)	1 (0)	36 (1)
3	1	-	<1	24 (4)	1 (2)	26 (4)	<1	31 (1)
3	0,5	45° C	4 (2)	29 (1)	4 (3)	29 (2)	3 (1)	34 (2)

1001

Tableau 2 : propriétés superficielles des préparations de surfactant artificiel dans une solution salée tamponnée

Les mesures ont été réalisées sur des échantillons contenant des phospholipides à une conc. de 10 mg / ml dans du tampon HEPES (pH 6,9), contenant tour à tour du NaCl 140 mmol / l et du CaCl₂ 2,0 mmol / l. Les valeurs enregistrées ont été obtenues à différents intervalles de temps avec un surfactomètre à bulle à pulsations à 37° C, compression superficielle de 50% et à raison de 40 cycles par minute. Les valeurs sont la moyenne (écart standard) de 3-5 mesures. Les abréviations sont définies dans le texte.

Préparation de surfactant		Tension superficielle (mM / m)						
SP-C (LKS) (% p / p)	SP-B (% p / p)	phospholipides	7,5 s		1 mn		5 mn	
			γ_{min}	γ_{max}	γ_{min}	γ_{max}	γ_{min}	γ_{max}
3	-	DPPC/ PG/ PA	4 (1)	44 (2)	5 (2)	47 (2)	7 (2)	50 (1)
3	2	DPPC/ PG/ PA	3(3)	38 (3)	4 (4)	40 (2)	3 (3)	44 (2)
3	-	DPPC/ PG	15 (3)		16 (2)	42 (3)	13 (3)	44 (3)
3	2	DPPC/ PG	39 (4)		1 (1)	29 (3)	<1	35 (1)
			2 (2)	26 (3)				

Exemple 4.

Préparation de mélanges phospholipidiques avec du SP-C (LKS) et de la polymyxine B.

Les DPPC et PG ont été achetés chez Sigma Chemical Co (St. Louis, MO).

- 5 Les phospholipides, dissous dans un mélange chloroforme/ méthanol 98 : 2 (v / v), ont été mélangés dans les proportions DPPC / PG 7 : 3 (p / p). Le SP-C (LKS) a été ajouté aux mélanges phospholipidiques, suivant un rapport total en poids polypeptide / phospholipide de 0,03. Les mélanges ont été évaporés sous azote et remis en suspension à température ambiante dans du tampon Hepes à pH 6,9 10 mmol
- 10 / l contenant du NaCl 140 mmol/ l et du CaCl₂ 2,0 mmol/ l ou dans le même tampon contenant de la polymyxine B 0,01% (PxB) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO). La congélation et le traitement aux ultrasons répétés (50 W, 48 kHz) ont été réalisés jusqu'à l'obtention de suspensions homogènes. La concentration finale en phospholipide pour les deux préparations était 10 mg/ ml. L'addition de PxB a réduit
- 15 les deux valeurs γ_{\max} et γ_{\min} et l'activité de surface optimale a été obtenue (Tableau 3).

Tableau 3 : propriétés superficielles du surfactant artificiel avec et sans polymyxine B

Les mesures ont été obtenues à différents intervalles de temps avec un surfactomètre à bulle à pulsations à 37° C, compression superficielle de 50% et à raison de 40 cycles par minute. Les valeurs sont la moyenne (écart standard) de 5-11 mesures. Les abréviations sont définies dans le texte.

Préparation de surfactant		Tension superficielle (mM / m)						
SP-C (LKS) (% p / p)	P x B (% p / p)	phospholipides	7,5 s		1 mm		5 mn	
			γ_{min}	γ_{max}	γ_{min}	γ_{max}	γ_{min}	γ_{max}
3	-	DPPC/PG	15 (3)	39 (4)	16 (2)	42 (3)	13 (3)	44 (3)
3	I	DPPC/PG	3(2)	29 (3)	2 (2)	31 (4)	1 (1)	34 (1)

Handwritten signature

Exemple 5

Caractérisation biophysique

La cinétique d'étalement de surface a été mesurée à 34-37° C environ avec une balance de surface de Wilhelmy (Biegler, Vienne, Autriche). La tension superficielle a été surveillée pendant 10 mn à l'aide d'une plaque de platine raccordée à une jauge de contrainte et insérée 1 mm dans une hypophase de 20 ml de NaCl 150 mmol/l dans un bac de téflon. Les suspensions ont été ajoutées sous la forme de gouttelettes, au total 1 mg de lipides, sur l'hypophase, à 4 cm de la plaque de platine.

Les mesures cinétiques de 3% en poids de SP-C (LKS) dans un mélange DPPC/ PG 7 : 3 (p / p), à l'aide de la balance de Wilhelmy ont révélé un étalement rapide avec une tension superficielle de 28 mN / m après 3 s (Fig. 2). L'étalement a été quelque peu plus lent en utilisant 1 % en poids de SP-C (LKS) dans le même mélange lipidique (données pas montrées). L'addition de 2 % en poids de SP-B n'a pas changé considérablement la vitesse d'étalement ou la tension superficielle à l'équilibre (Fig. 2). On n'a pas observé d'amélioration après l'incubation du mélange pendant 1 h à 45° C (données pas montrées). Des résultats similaires ont été obtenus avec un mélange DPPC : PG : PA, 68 : 22 : 9 (p / p / p) comme mélange lipidique (données pas montrées).

La tension superficielle dynamique a été enregistrée à l'aide d'un surfactomètre à bulle à pulsations (Surfactometer International, Toronto, Canada) à 37° C pendant une compression cyclique de 50% de la surface de bulle et à une fréquence de 40 cycles par mn. Toutes les mesures ont été réalisées pendant 5 mn et à une concentration lipidique de 10 mg/ ml. Les gradients de pression à travers la paroi de bulle étaient mesurés à des intervalles de temps spécifiques et utilisés pour calculer les tensions superficielles à une taille de bulle minimale (γ_{\min}) et maximale (γ_{\max}).

Dans le surfactomètre à bulle à pulsations 3% en poids de SP-C (LKS) dans un mélange DPPC : PG : PA, 68 : 22 : 9 (p / p / p) ont produit une tension superficielle inférieure à 1 mN / m au rayon de bulle minimum (γ_{\min}) tandis qu'une valeur γ_{\min} de 9-14 mN / m a été observée avec 3 % en poids de SP-C (LKS) dans un mélange DPPC : PG, 7 : 3 (p / p) (Tableau 1). La tension superficielle au rayon maximum (γ_{\max}) était de 40 mN / m environ dans les deux cas. L'addition de 2 % en poids de SP-B a donné des valeurs γ_{\max} de 31-33 mN / m et γ_{\min} de 0-2 mN / m pour les deux préparations lipidiques. Ces valeurs sont très semblables à celles obtenues avec des

préparations de surfactant isolé à partir de sources naturelles (Robertson, B. et autres (1990) *Prog. Respir. Res.* **25**, 237-246). L'incubation des préparations à 45° C pendant 1 h n'a pas eu d'effet significatif sur l'activité de surface (Tableau 1). La réduction de la quantité de SP-B jusqu'à 0,5 % en poids dans 3 % en poids de SP-C (LKS) dans un mélange DPPC : PG 7 : 3 (p / p) a eu tendance à augmenter la valeur γ_{\min} bien que les résultats n'étaient pas statistiquement significatifs (Tableau 1). Contrairement à la SP-B, l'addition de 2 % en poids de KL₄ (Cochrane, C. G. et Revak, S. D. (1991) *Science* **254**, 566-568) à 3 % en poids de SP-C (LKS) dans un mélange DPPC : PG : PA 68 : 22 : 9 (p / p) n'a pas réduit la valeur γ_{\max} qui est restée relativement élevée à 41-42 mN / m.

Exemple 6

Comparaison entre des mélanges contenant des peptides de référence dipalmitoylés et non palmitoylés.

Des préparations de surfactant ont été préparées en ajoutant 3 % p / p de SP-C (Leu) ou SP-C (Leu) dipalmitoylé à chaque mélange lipidique, composés de DPPC / PG / PA 68 : 22 : 9 p / p / p. Les mélanges ont été évaporés sous azote et remis en suspension dans du NaCl 150 mmol / l à des concentrations lipidiques de 10 mg / ml. Dans les échantillons dans lesquels un substituant de SP-B a aussi été utilisé, 1 % p / p de polymyxine B a été ajouté.

Les mélanges contenant le SP-C (Leu) dipalmitoylé, avec ou sans polymyxine B, révèlent une amélioration considérable en particulier la réduction de la valeur γ_{\max} à 5 mn et la valeur γ_{\min} à des intervalles de temps précédents.

Tableau 4 : propriétés de surface

La tension superficielle des mélanges a été obtenue avec un surfactomètre à bulle à pulsation. Après deux minutes d'équilibrage, les valeurs enregistrées ont été obtenues à des périodes différentes, à 37° C, une compression superficielle de 50 % et à raison de 40 cycles par mn.

30

Préparation de surfactant					Tension superficielle (mN / m)						
SP-C (Leu)		SP-C (Leu)		P x B	7,5 s		1 mn		5 mn		
		dipalm.									
(% poids)	en	(% poids)	en	(% poids)	en	γ_{\min}	γ_{\max}	γ_{\min}	γ_{\max}	γ_{\min}	γ_{\max}
1						11	39	6,2	39	2	42
1				1		3	37	3	38	0	40
		1		-		1	34	1	35	1	36
		1		1		0	29	0	34	0	35

Exemple 7

5 **Détermination in vivo**

L'effet de la thérapie au surfactant sur les propriétés mécaniques des poumons immatures a été évalué dans 9 lapins nés prématurés d'un âge gestationnel de 27 jours. Les animaux ont été trachéotomisés à la naissance et cinq d'entre eux ont reçu par la canule trachéale, deux fois 2,5 ml / kg de surfactant artificiel contenant de la DPPC, du PG et du SP-C (LKS), avec ou sans polymyxine B, dans les proportions données ci-dessus. La concentration phospholipidique totale de la matière exogène de surfactant était 40 mg / l. Deux animaux servant de témoins négatifs n'ont reçu aucune substance par le tube trachéal, et deux autres servant de témoins positifs ont été traités avec la même dose de surfactant naturel modifié (Curosurf, Chiesi Farmaceutici Spa, Parma, Italie), dilué jusqu'à 40 mg / ml. Un animal a été traité avec un mélange de DPPC et de PG dans de la saumure (mêmes concentrations que ci-dessus) dans une dose de 2,5 ml / kg. Tous les animaux ont été gardés dans des boîtes de pléthysmographe à une température de 37° C et ventilés en parallèle pendant 60 mn avec 100% oxygène, à l'aide d'un ventilateur Servo 900 B (Siemens-Elema, Solna, Suède) réglé sur une fréquence de 40 mn et un temps d'inspiration de 50%. Les volumes courants ont été mesurés avec un pneumotachygraphe relié à chaque boîte de pléthysmographe. Les animaux ont été ventilés avec un volume courant normalisé de 8-10 ml / kg et sans pression positive expiratoire (PEEP). La compliance poumon-

thorax a été définie comme le rapport entre le volume courant et la pression inspiratoire maximale, et elle est exprimée en ml / cm H₂O kg.

Par rapport à l'animal témoin non traité, la compliance a été améliorée considérablement chez les animaux traités avec le surfactant artificiel, en particulier chez l'animal recevant le surfactant contenant de la polymyxine B. Notamment, l'amélioration semble être supérieure à celle remarquée après le traitement avec une dose semblable de surfactant naturel modifié (Fig. 3).

Description brève des figures.

Fig. 1. Séquences d'acides aminés et présentations en roue hélicoïdale de la SP-C et de ses analogues.

La séquence de la SP-C humaine est prise de Johansson, J. et autres (1988) FEBS Lett. 232, 61-64 et celle de SP-C (Leu) de Nilsson, G. et autres (1998) *Eur. J. Biochem.* 255, 116-124). Le SP-C (LKS) est basé sur la structure primaire de la SP-C mais tous les résidus Val aux positions 16-28 sauf la position 17 sont remplacés par des résidus Leu, des résidus Lys ont été introduits aux positions 17, 22 et 27, et les Cys palmitoylés aux positions 5 et 6 ont été remplacés par Ser.

Fig. 2. Etalement superficiel des préparations de surfactant synthétique.

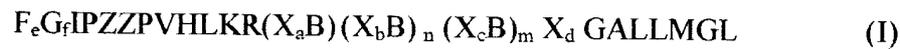
Cinétique d'étalement de 3 % en poids de SP-C (LKS) (carrés remplis, ligne pleine) et de 3 % en poids de SP-C (LKS) avec l'addition de 2 % en poids de SP-B (triangles ouverts, ligne en pointillé). Toutes les préparations ont été examinées à une concentration de 10 mg / ml de DPPC / PG, 7 : 3 (p / p) dans du NaCl 150 mmol/l. Les valeurs enregistrées ont été obtenues avec une balance de Wilhelmy et chaque point de donnée représente la moyenne de trois valeurs enregistrées différentes.

Fig. 3. résultats in vivo

La compliance poumon-thorax dans 5 lapins nés prématurés (âge gestationnel de 27 jours) ventilés avec un volume courant normalisé de 8-10 ml / kg et sans pression positive expiratoire (PEEP). La compliance a été améliorée considérablement chez les animaux traités. L'addition de polymyxine B (PxB) semble augmenter l'effet du surfactant artificiel. La concentration des phospholipides est identique dans toutes les préparations de surfactant, à savoir 40 mg / ml.

REVENDICATIONS

1. Des analogues de la SP-C ayant une formule générale (I), suivant le code des acides aminés à une lettre :



5 où :

X est un acide aminé sélectionné parmi le groupe composé de I, L, Nle (norleucine) ;

B est un acide aminé sélectionné parmi le groupe composé de K, W, F, Y, Ornithine ;

10 Z est S et peut être facultativement lié par des liaisons ester ou thio-ester avec un groupement acyle contenant de 12 à 22 atomes de carbone.

a est un nombre entier de 1 à 19 ;

b est un nombre entier de 1 à 19 ;

c est un nombre entier de 1 à 21 ;

15 d est un nombre entier de 0 à 20 ;

e est 0 ou 1 ;

f est 0 ou 1 ;

n est 0 ou 1 ;

m est 0 ou 1 ;

20 avec les conditions :

- $n + m > 0$;

- $f \geq e$;

- $(X_a B) (X_b B)_n (X_c B)_m X_d$ est une séquence ayant un maximum de 22 acides aminés, préférablement de 10 à 22 acides aminés.

25

2. Des analogues de la SP-C suivant la revendication 1, ayant la formule (Ia) :



3. Des analogues de la SP-C suivant la revendication 1, ayant la formule (Ib) :



4. Des analogues de la SP-C suivant la revendication 1, ayant la formule (Ic) :



5. Des analogues de la SP-C suivant la revendication 1, ayant la formule (Id) :
(Id) FGIPSSPVHLKRX₈BX₇GALLMGL

6. Des analogues de la SP-C suivant la revendication 1, ayant la formule (Ie) :
5 (Ie) FGIPSSPVHLKRX₁₁BX₄GALLMGL

7. Des analogues de la SP-C suivant les revendications 1-6, dans lesquels les résidus Ser sont acylés préférablement avec des groupements palmitoyle.

10 8. Des analogues de la SP-C suivant les revendications 1-7, dans lesquels B est Lysine ou Phénylalanine et X est Leucine, Isoleucine ou Norleucine.

9. Des analogues de la SP-C suivant la revendication 8, sélectionnés parmi le groupe composé de :

15 SP-C (LKS) FGIPSSPVHLKRLILKLLLLKILLKLGALLMGL
SP-C (LKS)₁ FGIPSSPVHLKRLILKLLLLIKLLILGALLMGL
SP-C (LKS)₂ FGIPSSPVHLKRLILKLLLLLILLLILGALLMGL
SP-C (LKS)₃ FGIPSSPVHLKRLILLLLLLKLILLILGALLMGL
SP-C (LKS)₄ FGIPSSPVHLKRLILLLLLLLIKLLILGALLMGL
20 SP-C (LFS) FGIPSSPVHLKRLILFLLLLIFLLFLGALLMGL

10. Un surfactant synthétique comprenant au moins un analogue de la SP-C de formule (I) en mélange avec des lipides et des phospholipides.

25 11. Un surfactant synthétique suivant la revendication 10, dans lequel le mélange lipides/ phospholipides comprend de la DPPG, du PG et du PA.

12. Un surfactant synthétique suivant les revendications 10-11, comprenant en outre de la SP-B ou un dérivé actif de celle-ci ou une polymyxine.

30

13. Un surfactant artificiel suivant les revendications 10-12, sous forme d'une solution, dispersion, suspension, poudre sèche.

FEUILLE MODIFIEE

14. L'utilisation des analogues de SP-C des revendications 1-7 pour la préparation d'un surfactant synthétique destiné à être utilisé dans tous les cas de déficit en surfactant.
- 5 15. L'utilisation d'une polymyxine, préférablement une polymyxine B pour la préparation d'un surfactant artificiel suivant les revendications 10-13, pour le traitement de tous les cas de déficit en surfactant ou de dysfonctionnement, ou de l'otite moyenne sérique (otorrhée).
- 10 16. L'utilisation suivant les revendications 14 et 15, où le déficit en surfactant est le syndrome de détresse respiratoire.

15

FEUILLE MODIFIEE

FIGURE 2

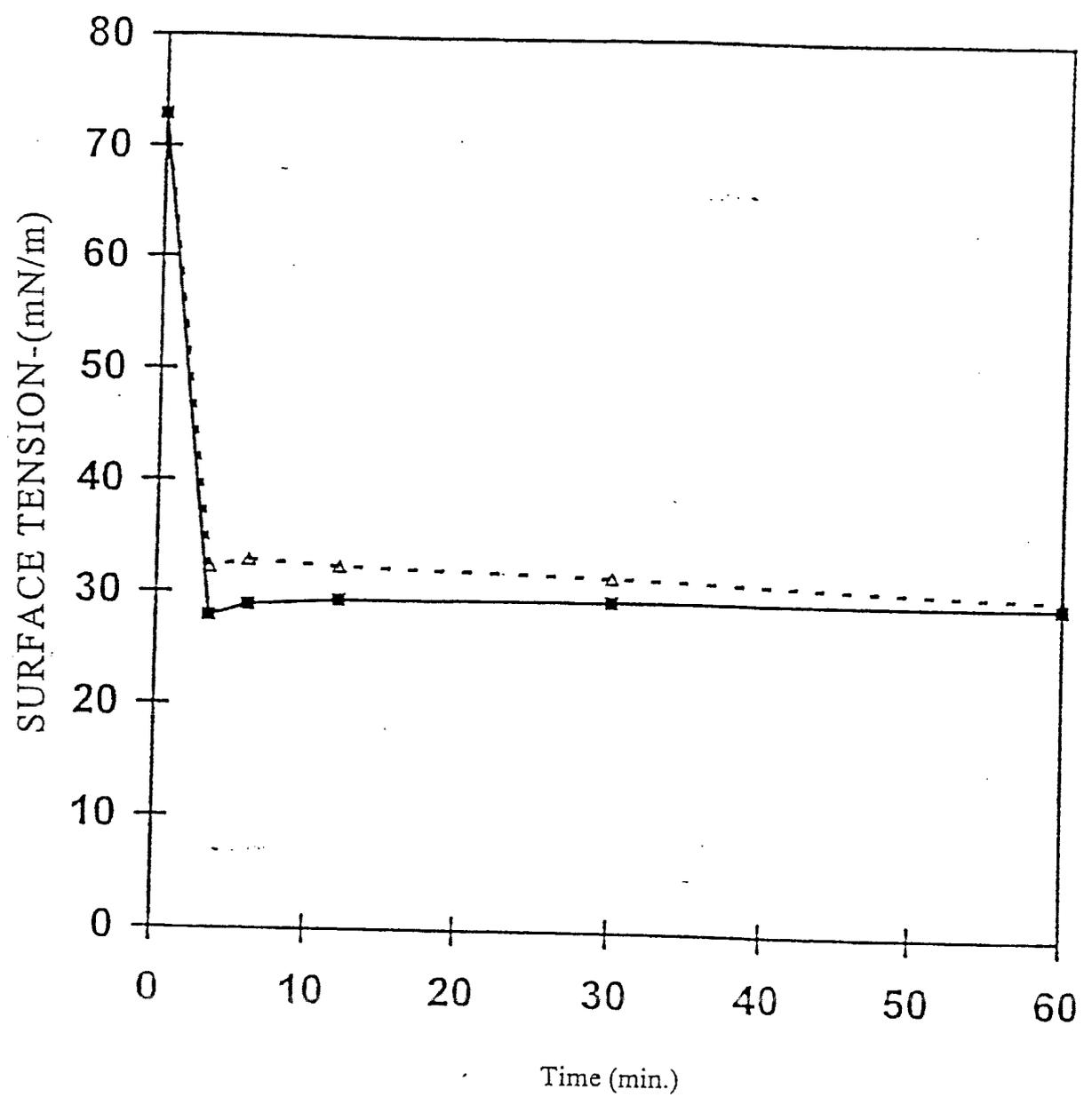


FIGURE 3

