

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 27960 A1**  
(51) Cl. internationale : **A61K 38/17; C07K 14/785; A61P 11/00**  
(43) Date de publication : **03.07.2006**

---

(21) N° Dépôt :  
**27946**

(22) Date de Dépôt :  
**16.11.2004**

(30) Données de Priorité :  
**17.05.2002 IT MI02A001058**

(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT:  
**PCT/EP03/04937 12.05.2003**

(71) Demandeur(s) :  
**Chiesi Farmaceutici S.p.A., Via Palermo, 26/A, I-43100 Parma (IT)**

(72) Inventeur(s) :  
**JOHANSSON, Jan ; CURSTEDT, Tore ; ROBERTSON, Bengt**

(74) Mandataire :  
**TMP AGENTS**

---

(54) Titre : **MELANGES LIPIDIQUES SYNTHETIQUES AMELIORES POUR LA PREPARATION D'UN TENSIOACTIF RECONSTITUE.**

(57) Abrégé : L'INVENTION CONCERNE DES TENSIOACTIFS RECONSTITUÉS COMPRENANT DES PHOSPHOLIPIDES ET DES LIPIDES ARTIFICIELS AMÉLIORÉS CAPABLES D'ABAISSE LA TENSION SUPERFICIELLE À L'INTERFACE AIR-LIQUIDE, PLUS PARTICULIÈREMENT DES TENSIOACTIFS RECONSTITUÉS COMPRENANT DES MÉLANGES PHOSPHOLIPIDIQUES SPÉCIAUX ET DES PEPTIDES ARTIFICIELS QUI SONT DES ANALOGUES DE LA PROTÉINE NATURELLE SP-C. CES TENSIOACTIFS SONT DESTINÉS AU TRAITEMENT DU SYNDROME RESPIRATOIRE AIGU SÉVÈRE (SRAS) ET AUTRES PATHOLOGIES ASSOCIÉES À DES DYSFONCTIONNEMENTS DE TENSIOACTIFS PULMONAIRES

### **Abrégé**

L'invention concerne des tensioactifs reconstitués comprenant des phospholipides et des lipides artificiels améliorés capables d'abaisser la tension superficielle à l'interface air-liquide, plus particulièrement des tensioactifs reconstitués comprenant des mélanges phospholipidiques spéciaux et des peptides artificiels qui sont des analogues de la protéine naturelle SP-C. Ces tensioactifs sont destinés au traitement du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) et autres pathologies associées à des dysfonctionnements de tensioactifs pulmonaires

Mélanges lipidiques synthétiques améliorés pour la préparation d'un tensioactif reconstitué

La présente invention porte sur un des surfactants reconstitués consistant en des phospholipides et des peptides artificiels capables de diminuer la tension de surface dans une interface d'air liquide. Cette invention porte notamment sur des surfactants reconstitués comprenant des mélanges de phospholipides particuliers et des peptides artificiels analogue de la protéine SP-C de surfactant naturel pour le traitement du syndrome de douleur respiratoire (SDR) et autres maladies de dysfonctionnement de surfactant pulmonaire.

**Domaine de l'invention :**

Le surfactant pulmonaire diminue la tension de surface survenant à l'interface air liquide de la paroi alvéolaire interne prévenant les poumons ainsi de tout échec à la fin de la l'expiration. La déficience en surfactant est un dysfonctionnement qui affecte communément les enfants prématurés et provoque un SDR, une maladie qui peut être effectivement traitée avec des surfactants naturels extraits des poumons des animaux. Les composants principaux de ces préparations de sulfactants sont les phospholipides comme 1,2-dipalmitoyle-sn-lycero-3-phospholine communément connue comme di-palmitoyle-phosphatidyle-choline (DPPC), phosphatidylglycérole (PG) et les protéines hydrophobiques de surfactant B et C (SP-B et SR-C). Les protéines des surfactants hydrophiles SP-A et SP-D, qui sont des lectines collagènes de type-C ( $Ca^{2+}$ -dependant), censées agir principalement sur le système de défense hôte ne sont pas en conditions ordinaires incluses dans les préparations de sulfactants en raison des procédures d'extraction du solvant organique mises en œuvre. Les préparations de sulfactant naturel modifié obtenues des tissus animaliers sont utilisées dans les pratiques thérapeutiques courante. Ces préparations consistent souvent dans les composants susmentionnés à l'exception des protéines hydrophile qui sont enlevées par extraction à l'aide de solvants organiques.

En raison des désavantages des préparations du sulfactant à partir de tissus animaliers, comme la complexité du processus de fabrication et de stérilisation et l'éventuelle introduction de réactions immunisées, des essais pour la préparation de sulfactants artificiels ont été effectués. Stricto sensu, les surfactants artificiels sont des mélanges exclusifs de phospholipides ou des mélanges de phospholipides et autres lipides synthétiques. Les surfactants reconstitués sont des surfactants artificiels avec des protéines hydrophiles- soit isolés de tissus animaux ou obtenus par des techniques de recombinaison- ou des peptides synthétiques dérivés de ces protéines.

Les propriétés et l'activité des surfactants reconstitués dépendent en majeure partie non seulement des composants protéine/peptide mais aussi de la composition du mélange phospholipide.

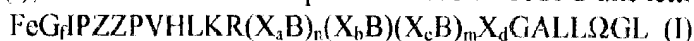
**Description de l'invention :**

Récemment, il a été établi que le phosphatidylcholine dipalmitoyle (DPPC) en mélange avec des phospholipides oleyle palmitoyle constitue un véhicule idéale pour des peptides artificiels communément utilisés dans les surfactants reconstitués comme analogues des protéines de surfactants naturels SP-C et/ou SP-B. Les surfactants reconstitués comprennent en particulier des analogues SP-C révélés dans le WO 00:47623 en combinaison avec DPPC et un phospholipide oleyle palmitoyle – sélectionné de préférence du phosphatidylglycérole oleyle palmitoyl (PGOP) ou un mélange de POPG avec du phosphatidylcholine oleyle palmitoyl (PCOP) – dans le ratio de poids de 80:20 à 60:40, qui est démontré susceptible de réduire la tension de la surface et la viscosité de la préparation qui en est obtenue. Contrairement à la littérature courante, il a été étonnamment révélé que l'ajout de l'acide palmitique (AP) est inutile, il peut même dans certains cas réduire l'activité du surfactant in vivo.

Par conséquent, la présente invention porte sur les surfactants reconstitués comprenant des mélanges consistant essentiellement de phosphatidylcholine dipalmitoyl (PCDP) et de phosphatidylglycerole oleyle palmitoyl (PGOP) ou un mélange des deux avec phosphatidylglycholine oleyle palmitoyl (PCOP) dans le ratio de poids de 80 :20 à 60 :40 et des analogues de peptides artificiels de protéines de surfactants naturels SP-C et/ou SP-B. Le surfactant de l'invention est dépourvu d'acide palmique.

Le ratio poids entre PCPD et PGOP s'établit de préférence entre 75 :25 et 65 :35 il est plus préférablement de 68 :31. Dans le cas de mélanges PCPD :PGOP :PCOP, les phospholipides sont de préférence utilisés dans un ration de poids de 60 :20 :20 ou 68 :15 :16.

Tout analogue de peptide artificiel de protéines de surfactant naturel SP-C et/ou SP-B peut être avantageusement utilisé comme ceux révélés par les WO 89/06657, WO 92/22315 et le WO 95/32992. Il est préférable d'utiliser les analogues SP-C possédant généralement la formule suivante (I), l'acides étant représenté avec un code d'une lettre :



Vu que :

X est un acide aminé sélectionné d'un groupe consistant en I, L, nL (norleucine)

B est un acide aminé sélectionné d'un groupe consistant en K, W, F, Y ornithine

Z est un S optionnellement substitué par un groupe acyle contenant des atomes de carbone de 12-22 reliés à une chaîne latérale par un ester ou respectivement par un lien thio-ester.

Ω est un acide aminé sélectionné d'un groupe consistant en M, I, L, nL

a est un nombre entier de 1 à 19

b est un nombre entier de 1 à 19

c a est un nombre entier de 1 à 21.

d a 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

Avec les stipulations suivantes :

- $n+m > 0$
- $f \geq e$
- $(\text{X}_a\text{B})_n(\text{X}_b\text{B})(\text{X}_c\text{B})_m\text{X}_d$  est une séquence avec un maximum de 22 acides aminés de préférence entre 10 et 22.

Il est même préférable d'utiliser les peptides de la formule (II)



Vu que :

Ω est un acide aminé sélectionné d'un groupe consistant en M, I, L, nL et vu que la sérine peut être optionnellement acylatée à l'aide par exemple de palmitoyl.

Le peptide reporté ci-après (SP-C33), dans une forme non-acylatée, est le mieux pour l'invention en question.

IPSSPVHLKRLKLLLLLLLLLILLIILGALLΩGL (SP-C33)

Les peptides de la formule (I) peuvent être préparés par le moyen de synthèses de peptides conventionnels ou des techniques de recombinaison comme mentionné dans le WO 00/47623. Les peptides acylatés sont synthétisés de préférence en faisant réagir les peptides à un chlorure acyle dans un acide trifluoroacétique pur durant 10 heures dans une température de chambre suivie par un refroidissement à l'éthanol aqueux à 80%.

L'activité des surfactants reconstitués de l'invention dans la réduction de la surface de tension a été évaluée et in vitro et in vivo. Les résultats in vivo révèlent clairement que les surfactants reconstitués de la présente invention sont à même d'augmenter le volume de marée – qui est à son tour un indice de la capacité d'expansion pulmonaire – dans une étendue significativement plus élevée que les surfactants obtenus avec les mélanges de PCDP, PG et PA, communément utilisés dans l'état antérieur de la technique.

Les surfactants reconstitués de l'invention peuvent comprendre SP-B ou les polymixins notamment la polimixin B tel que les analogues SP-B.

Le surfactant peut être préparé par le mélange de solutions ou de suspensions de peptides et phospholipides et ensuite par assèchement du mélange. Le mélange asséché peut le cas échéant, être re-suspendu, dispersé ou administré aux sujets qui nécessitent un traitement pour une déficience de surfactant.

En cas d'administration par aérosol, il sera nécessaire de combiner les particules de surfactant fins avec un propulseur inerte convenable. Les autres formes d'administration comme la vaporisation ou nébulisation de solutions/suspensions de surfactant stable, sont couvertes par la présente invention.

Les exemples suivants illustrent en détail la présente invention.

#### EXEMPLES :

##### Section expérimentale :

1,2-Dipalmitoyle-sn-glycero-3-phosphocholine (PCPD), 1-palmitoyle-2-oleoyle-sn-glycero-3-phosphocholine (PCOP), 1-palmitoyle-2-oleoyle-sn-glycero-3-phosphoglycerole (PGOP), egg phosphatidylglycérole (PG), acide palmitique (AP) et sulfate polymyxine B(PxB) sont utilisés pour préparer les mélanges de lipides suivants et les ratios de poids : PCDP/PG/PA, 68 :22 :9, PCPD/PGOP/AP, 68 :22 :9, PCPD/PCOP/PGOP, 60 :20 :20, PCPD/PGOP/PCOP/AP, 57 :19 :19 :5, PCPD/PCOP/PGOP, 68 :16 :15 et PCPD/PGOP, 68 :31.

SP-C33 a été synthétisé et purifié comme décrit dans le WO 00/47623.

##### Préparation de surfactants synthétiques :

SP-C33 et lipides dans les ratios de lipide/peptide de 0.02 :1 ont été mélangés dans du chloroforme/méthanol 98 :2 (v/v), les solvants ont été évaporés et les films de lipide/peptide conséquents ont été ensuite hydratés dans 150 Mm NaCl par une sonication répétée à une concentration de lipide de 80 ou 35 mg/ml. L'échantillon de surfactant utilisé pour les analyses dans le surfactomètre de bulle vibrante a été dilué dans la saline jusqu'à concurrence des concentrations de travail (surfactant 10mg/ml). Dans quelques expériences PxB a été ajouté jusqu'à une concentration finale de 2% (w/w) de la concentration du lipide. Le surfactant qui contient SP-C33 dans DPPC/PG/PA (68 :22 :9) était muni de plusieurs suspensions visqueuses à 80 mg/ml et présentait des difficultés lors de l'administration aux animaux expérimentaux.

Deux surfactants naturels modifiés bien connus, Curosurf (chiesi farmaceutici) et Survanta (Abbott) ont été administrés conformément aux instructions du fabricant. Curosurf a été suspendu à un corps de poids de 80mg/ml et 2.5 ml/kg et administré; Survanta a été suspendu à un corps de poids de 25 mg/ml et 4ml/kg et administré.

#### Expériences de bulle vibrante :

Les propriétés de surface dynamique de surfactants SP-C33 avec ou sans 2% (w x w) PxB ont été évaluées par un surfactomètre de bulle vibrante. Pour ces expériences, le surfactant a été suspendu dans de la saline à un degré de concentration de 10mg/ml et analysé à 37°C. La sensibilité à l'égard de l'inhibition a été testée par l'ajout de 40mg/ml d'albumine de suspension de surfactant. Une bulle communiquant avec l'air ambiant a été créée dans une chambre de teste en plastique contenant approximativement 20µl du fluide de l'échantillon. Le radius de la bulle est oscillé un taux de 40 cycles/min d'un maximum de 0.55 à un minimum de 0.44 mm, correspondant jusqu'à un minimum de 0.40mm, correspondant à une compression de surface cyclique de 50%. Les valeurs de tension de surface au dimension minimale et maximale de la bulle ( $\gamma_{\min}$   $\gamma_{\max}$ ) ont été enregistrées au delà de 5 min. pulsations.

#### Expériences in vivo :

Les mélanges de surfactant ont été essayés sur des lapins nouveaux-nés prématurés, obtenus par hystérectomie à l'âge de gestation de 27 jours (terme : 31 jours). Les animaux ont été trachéotomisés à la naissance, maintenus dans des boxes de plethysmographie à 37°, ventilés en parallèle avec 100% d'oxygène à une fréquence de 40 souffles par minutes et un temps d'inspiration de 50%. Les animaux traités reçoivent 2.5ml/kg ou 4ml/kg de la préparation de surfactant ci-dessus à travers la trachée. Les Littermates qui n'ont reçu aucune préparation de surfactant ont été utilisés comme contrôle. Après avoir instillé le surfactant, la pression maximale a été augmentée à 35 cmH<sub>2</sub>O par minute afin de faciliter la répartition de surfactant dans les poumons puis diminuée à 25 cmH<sub>2</sub>O. Les animaux ont alors ventilé avec une pression maximale de 25 cmH<sub>2</sub>O durant 15 minutes puis la pression a été diminuée dans un premier temps à 20 cmH<sub>2</sub>O durant 5 minutes et dans un deuxième temps à 15 cmH<sub>2</sub>O durant 5 minutes avant d'être augmentée une autre fois à 25 cmH<sub>2</sub>O durant 5 minutes. Les volumes de marée ont été mesurés à 5 minutes d'intervalles à l'aide d'un pneumographe connecté à chacun des box plethysmographe.

A la fin de la période de ventilation établie, les animaux ont été sacrifiés par une injection lidocain intracérébrale. Leur abdomen a été ouvert et la position du diaphragme a été inspectée pour des preuves pneumotoraxique.

#### Exemple 1- activité superficielle in vitro de SP-C33 dans différents mélanges lipidiques.

Les propriétés de surface dynamique de SP-C33 (w/w) de 2% dans PCDP/PG/PA (68 :22 :9), PCDP/PCDO/PGPO (60 :20 :20), PCDP/PCPO/PGPO (68 :16 :15) et PCDP/PGPO (68 :31), ont été évaluées à l'aide d'un surfactomètre de bulle vibrante avec  $\gamma_{\min} < 2\text{mN/m}$  après 5 minutes de pulsation pour tous les mélanges et  $\gamma_{\max} < 40\text{mN/m}$  pour tous les mélanges exception faite de SP-C33 dans PCDP/PG/PA (68 :22 :9), dont  $\gamma_{\max}$  a été de 48 mN/m.

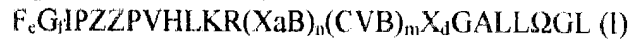
#### Exemple 2- effets optimal in vivo sans PA

Afin d'évaluer le rapport de la composition lipidique, nous avons comparé les effets in vivo de SP-C33 dans les mélanges PCDP/PG/PA (68 :22 :9), PCDP/PGPO/PA (68 :22 :9) et PCDP/ PGPO (68 :31). SP-C33 dans PCDP/PGPO (68 :31) a montré une haut effet que celui de deux autres mélanges. Les informations montrées une augmentation marquée des volumes de marrées après le traitement à SP-C33 in PCDP/PGPO (68 :31). Elles montrent également

que si le contenu de PCDP et de l'acide lipidiques est constant, la pression de PA réduit l'effet du traitement. Un effet négatif de PA de l'activité in vivo du surfactant de base SP-C33 est de davantage confirmé par l'effet ( $V_T - 12$  a  $15$  min. e  $V_T - 14$  a  $25$  min) de SP-C33 dans PCDP/PCPO/PGPO/PA (57 :19 :19 :5) qui est légèrement plus bas que celui de SP-C33 dans PCDP/PCPO/PGPO (60 :20 :20).

Revendications :

1. Un surfactant reconstitué comprenant un lékange phospholipide consistant en un phosphatidylcholine dipalmitoyle et phosphatidylglycerole (PGPO) ou un mélange d'eux avec du phosphatidylcholine oleyle palmitoyle dans un ratio de poids compris entre 80 :20 et 60 :40 et avec un analogue de peptide artificiel de SP-C et/ou protéines de SP-B.
2. un surfactant reconstitué conformément à la réclamation 1 tant que le peptide artificiel a la formulation générale suivante (I)



Vu que :

X est un acide aminé sélectionné d'un groupe consistant en I, L, nL.

B est un acide aminé sélectionné d'un groupe consistant en ornithine K, W, F, Y.

Z est un S optionnellement substitué par un groupe acyle contenant des atomes de carbone de 12-22 reliés à une chaîne latérale par un ester ou respectivement par un lien thio-ester.

Ω est un acide aminé sélectionné d'un groupe consistant en M, I, L, nL.

a est un nombre entier de 1 à 19.

b est un nombre entier de 1 à 19.

c a est un nombre entier de 1 à 21.

d a 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

Avec les stipulations suivantes :

- $n+m > 0$
  - $f \geq e$
  - $(X_a B)_n (X_b B)_n (X_c B)_m X_d$  est une séquence avec un maximum de 22 acides aminés.
3. Un surfactant reconstitué conformément à la réclamation 2 étant donné que le peptide artificiel de la formulation (I)  $(X_a B)_n (X_b B)_n (X_c B)_m X_d$  est une séquence ayant de 10 à 22 acides aminés.
  4. Un surfactant reconstitué conformément à la réclamation 1, étant donné que le peptide artificiel possède la formulation suivante (II)



Vu que :

Ω est un acide aminé sélectionné d'un groupe consistant en M, I, L, nL et vu que la sérine peut être optionnellement acylatée.



5. un surfactant reconstitué conformément à la réclamation 4, étant donnée que dans le peptide artificiel de formulation II, la sérine est acylatée avec du palmitoyle.
6. un surfactant reconstitué conformément à la réclamation 4, étant donné que le peptide est SP-C33.
7. un surfactant reconstitué conformément aux réclamations 1-6, étant donné que le mélange de phospholipide est un mélange de PCDP et PGPO est dans un ratio de 68 :31 ou un mélange de PCDP, PGPO et PCPO est dans un ratio de poids de 68 :15 :16.
8. un surfactant reconstitué conformément aux réclamations 1-7, comprenant SP-B ou son analogue actif ou un polimixine.
9. un surfactant reconstitué conformément à la réclamation 8, étant donné que le polimixin est un poliximin B.
10. un surfactant reconstitué conformément à la réclamation 1-9, sous forme de solution, dispersion, suspension ou poudre sèche.
11. utilisation d'un surfactant reconstitué conformément aux réclamations 1-10 pour le traitement de maladies d'insuffisance ou de dysfonctionnement de surfactant pulmonaire.