

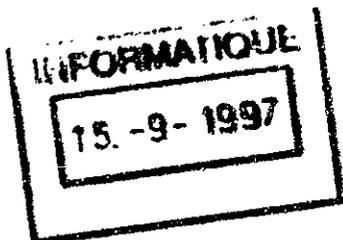
Brussels Airport
Business Park

ME 200001

Diegem, le 11 septembre 1997

GEVERS Patents
Hofdaystraat 5

B-1831 Diegem
TEL +32 2 715 39 00
FAX +32 2 720 50 70



MIN DES AFFAIRES ECONOMIQUES
Off. de la Prop. Industrielle
boulevard Emile Jacqmain 154
1000 BRUXELLES

652894

Antwerpen

GEVERS Patents
Frankrijklei 53-55 bus 5
B-2000 Antwerpen
TEL +32 3 206 99 88
FAX +32 3 206 99 51

N/Ref. EPBE 816758 302462

Messieurs,

Dépôt d'une traduction d'un brevet européen.

Nous vous remettons en annexe un exemplaire de la traduction du texte du brevet européen dont les données sont reprises ci-dessous :

Date de dépôt : 30 juin 1993

Date de délivrance : 3 septembre 1997

Numéro de publication : 0652894

Titulaire(s) : MERRELL PHARMACEUTICALS INC.

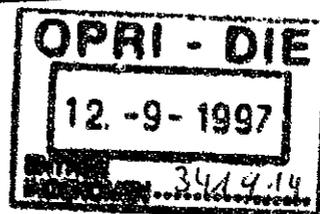
Nous joignons également une photocopie du pouvoir général.

Nous vous serions obligés de bien vouloir accuser réception de la présente en nous retournant la copie ci-jointe munie de votre cachet.

Nous vous prions d'agréer, Messieurs, nos salutations distinguées.

Ph. VOSSWINKEL

Annexes :
GR 816758



**POUVOIR GENERAL
GENERAL POWER OF ATTORNEY**

Demandes de brevet
Brevets

Patent Applications
Patents

La soussignée
Le(s) soussigné(s)
The undersigned

MERELL PHARMACEUTICALS INC.
2110 East Galbraith Road
Cincinnati, Ohio 45215
United States of America

désigne(nt) comme mandataires les personnes suivantes :
appoints (appoint) the following persons as agents :

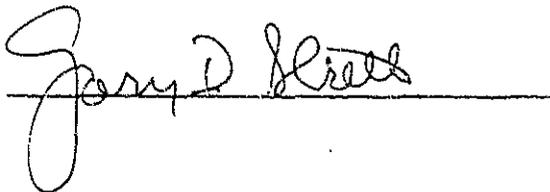
Callewaert Jean, Claeys Pierre, Gevers Florent, Gevers Jacques, Pieraerts Jacques, Quintelier Claude, Schmitz Yvon, Van der Stock Guy, Van Reet Joseph ou Vosswinkel Philippe
c/o GEVERS Patents S.A., Holidaystraat 5, 1831 Diegem

pour la/le(s) représenter auprès de l'Office belge de la Propriété Industrielle concernant
to represent the undersigned before the Office belge de la Propriété Industrielle in connection with

- toute demande de brevet belge ou tout brevet belge
any and all Belgian patents or patent applications
- tout brevet européen ayant effet en Belgique
any and all European patent being effective in Belgium

et pour faire ou recevoir tout paiement en son/leur nom
and to make or receive any and all payments on behalf of the undersigned

Signature(s) :



Nom du signataire : **GARY D. STREET**
Name of the person signing :

Fonction du signataire : **General Patent Counsel and Assistant Secretary**
Capacity in which the person signs :

Date : *15 December 1995*

TRADUCTION DE BREVET EUROPEEN

11. Numéro de publication européen : 0 652 894
21. Numéro de dépôt de la demande : 93 916 889.4
5 45. Mention de la délivrance : Bulletin européen n° 97/36 du 03.09.1997
73. Titulaire : MERRELL PHARMACEUTICALS INC.
54. Titre : "Tensioactifs pulmonaires synthétiques à peptides, possédant des antioxydants liés de manière covalente"

10

15 Cette invention se rapporte à la synthèse d'une série de polypeptides contenant 3 à 4 acides aminés, avec des antioxydants liés par covalence au peptide, soit directement, soit par l'intermédiaire d'une région lieuse. Ces peptides modifiés peuvent être utilisés comme surfactants pulmonaires synthétiques, comportant des antioxydants utiles, faisant partie
20 de la structure du peptide. On décrit également la préparation de mélange de ces polypeptides avec des lipides, leur procédé de production, et des compositions pharmaceutiques efficaces pour traiter les syndromes de détresse respiratoire aiguë des mammifères.

25

ARRIERE PLAN DE L'INVENTION

Les poumons dépendent d'un équilibre délicat entre les oxydants toxiques et les activités protectrices des systèmes de défense antioxydants. Un déséquilibre de ce système, dû à
30 l'augmentation de la quantité d'oxydants ou au dysfonctionnement des systèmes de défense antioxydants protecteurs, peut produire des événements pathophysiologiques dans le poumon, provoquant un dysfonctionnement du poumon. Un type de dysfonctionnement pulmonaire auquel peut
35 contribuer une augmentation de la quantité d'oxydants est le

syndrome de détresse respiratoire aigu (RDS pour Respiratory Distress Syndrome).

5 Le syndrome de détresse respiratoire du nourrisson est une cause majeure de décès dans les 28 premiers jours de la vie. Le RDS du nourrisson frappe un bébé sur 100 dans le monde et environ 10 pour cent d'entre eux meurent. Le syndrome est relativement rare en terme de nourrissons, mais est généralement associé avec l'immaturation et le faible poids à la naissance (moins de 2 kg). La RDS de l'adulte montre des caractéristiques cliniques et une pathophysiologie similaires à celles de la maladie infantile, et est généralement prise en charge dans une unité de soins intensifs. La maladie adulte a diverses étiologies, et peut résulter d'agressions pulmonaires, tels que des infections diffuses, l'aspiration du contenu de l'estomac, l'inhalation de produits irritants et de toxines, et un oedème pulmonaire ayant pour origine, par exemple, une overdose de narcotiques.

10 La RDS est corrélée à l'absence ou au dysfonctionnement du surfactant pulmonaire qui recouvre les alvéoles des poumons où se produisent les échanges gazeux, et on l'a associée aux radicaux libres à centre oxygène dans le poumon ou la cavité pulmonaire, que l'on appelle les oxydants, tels que les radicaux superoxyde, les radicaux hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène qui peut produire des radicaux hydroxyle, et les peroxydes lipidiques, qui sont impliqués dans les lésions cellulaires (Heffner, et al., Am. Rev. Respir. Dis. 104: 531-554 1989) ; (Halliwell, FASEB J. 1: 358-364 1987).

20 On a décrit un surfactant pulmonaire synthétique formé de polypeptides plus grands ayant des fragments antioxydants dans de demande de brevet en série no. 07/789 918 publiée le 4 novembre 1991, incorporée ici en référence. Cependant, la présente invention fournit un surfactant pulmonaire synthétique efficace ayant des propriétés antioxydantes qui sont des peptides raccourcis de 3 à 4 acides aminés, ayant la capacité d'inhiber l'oxydation de composés sensibles en

35

oxydants. Les surfactants pulmonaires raccourcis permettent de produire des agents thérapeutiques de façon plus efficace et plus économique. L'originalité de l'invention se situe dans sa capacité à réduire de façon efficace le peptide à 3-4 acides aminés tout en conservant les propriétés de surfactant et d'administrer de façon efficace le peptide fixé à un antioxydant lié par covalence.

On a ajouté des agents thérapeutiques tels que la vitamine E à des préparations de surfactants pulmonaires synthétiques sous forme de composant séparé (Brevet U.S. No. 4 765 987; Publication PCT No. WO 90/11768 ; Publication PCT No. WO 90/07469). Cependant, dans la présente invention, les antioxydants ne constituent pas un composant séparé, mais sont réellement incorporés dans un polypeptide. Un avantage de l'incorporation de l'antioxydant dans le polypeptide est qu'au lieu d'avoir un mélange à trois composants (lipide, polypeptide et antioxydant), on dispose d'un mélange à deux composants. Ceci peut présenter un avantage significatif lors des tests de l'efficacité d'un produit pharmaceutique commercialisable, lorsqu'on doit tester divers dosages et formulations pour chacun des composants. En outre, une formulation à deux composants est plus facile à préparer.

On peut utiliser les polypeptides de la présente invention simplement en mélange avec un lipide ou en combinaison dans des mélanges de lipides dans lesquels le polypeptide constitue un composant mineur du mélange surfactant. On peut préparer la composition de la présente invention avec une pureté élevée et par un procédé standardisé, car il s'agit d'un mélange défini de composants synthétiques. En outre, les composants ne proviennent pas de sources animales, ce qui réduit le risque de contamination par des virus et des bactéries.

On utilise une représentation en roue hélicoïdale d'un peptide α -hélicoïdal amphipathique à dix résidus (pour une description du peptide α -hélicoïdal amphipathique, voir McLean, L.R. et al. *Biochem.*, 1991, 30, 31) pour mettre au point

un modèle de peptide à trois et quatre résidus. Lorsqu'on regarde le corps de l' α -hélice vers le bas, les chaînes latérales des résidus présentent une face hydrophobe et une face hydrophile sur l'hélice. Un peptide à quatre résidus correspond à une seule révolution de cet α -hélice avec les faces hydrophobe et hydrophile requises présentes. Un peptide à trois résidus correspond une révolution resserrée de l' α -hélice, les faces hydrophobe et hydrophile étant toujours présentes.

10 RESUME DE L'INVENTION

La présente invention comprend des surfactants pulmonaires synthétiques constitués d'un complexe d'un polypeptide et de lipides, le polypeptide correspondant à la formule I suivante :



ou l'un de ses isomères optiquement actifs ou l'un de ses sels actifs du point de vue pharmaceutique, dans lequel

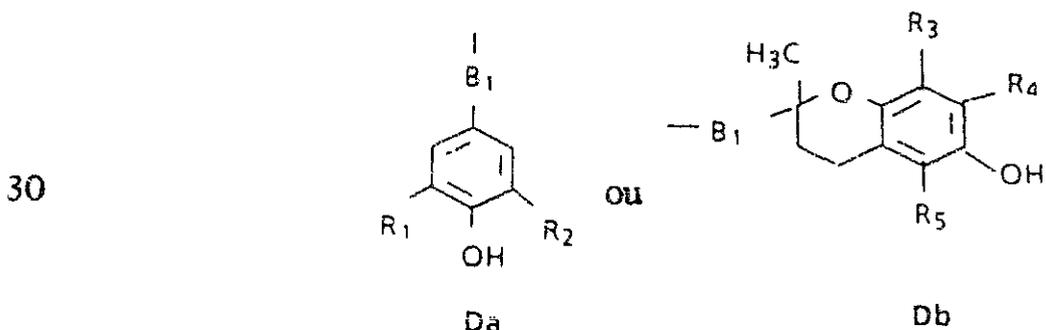
A_1 représente une liaison ou un acide aminé de charge négative choisi parmi Glu et Asp ;

20 A_2 représente un acide aminé hydrophobe choisi parmi Trp, Tyr, Phe, His, Val, Leu, ou Ile ;

A_3 représente Aib, Glu, Gln, Leu, Ala, Orn ou une liaison ; et

A_4 représente un acide aminé de charge positive choisi parmi Lys, Arg, ou His ;

25 X a pour formule Da ou Db :

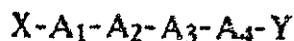


35 dans lesquelles B_1 représente B, $-C(O)-$, $-B-C(O)-$, $-C(O)-NH-B-$, $C(O)-$; et B représente une liaison, un groupe alkylène en C_{1-16}

ou un groupe alcénylène en C₂₋₁₆, et dans lesquelles chacun des R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ et R₇ représentent indépendamment un groupe alkyle en C₁₋₆ ;

Y représente un substituant carboxyle de A₄ choisi parmi les groupes hydroxy, amino, alkylamino et alcoxy ; et
5 dans lequel, lorsque A₃ représente une liaison, on peut échanger A₁ et A₂.

En outre, la présente invention comprend des surfactants pulmonaires synthétiques constitués d'un complexe d'un polypeptide et de lipides, dans lequel le polypeptide répond à la
10 formule 2 suivante :



ou l'un de ses isomères optiquement actifs ou l'un de ses sels actifs du point de vue pharmaceutique, dans lequel

15 A₁ représente une liaison ou Glu ;

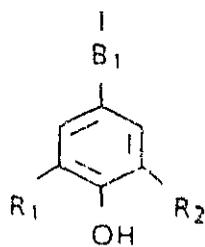
A₂ représente Trp ou Glu ;

A₃ représente Aib, Glu, Gln, Leu, Ala ou Orn ; et

A₄ représente Lys ;

X a pour formule Da ou Db :

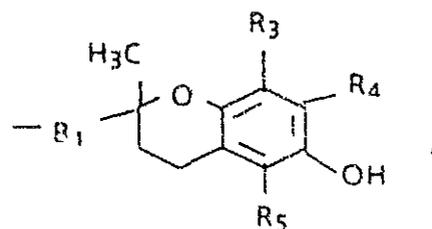
20



25

Da

ou



Db

30 dans lesquelles B₁ représente B, -C(O)-, -B-C(O)-, -C(O)-NH-B-C(O)- et B représente une liaison, un groupe alkylène en C₁₋₁₆ ou un groupe alcénylène en C₂₋₁₆, et dans lesquelles chacun des R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ et R₇ représentent indépendamment un groupe alkyle en C₁₋₆ ;

Y représente un substituant carboxyle de A₄ choisi parmi les groupes hydroxy, amino, alkylamino et alcoxy.

En outre, les peptides de cette invention peuvent être associés avec un lipide, constitué d'un ou plusieurs de ceux du type associé avec un surfactant pulmonaire naturel.

5 Ces complexes polypeptide-lipides et leurs compositions pharmaceutiques peuvent être utilisés dans le traitement du syndrome de détresse respiratoire aigu de mammifère.

BREVE DESCRIPTION DES SCHEMAS

10 La figure 1 est une représentation sous forme de roue hélicoïdale d'un surfactant peptidique à dix résidus utilisés pour mettre au point un modèle pour les peptides courts. La vue est orientée vers le bas du corps de l'hélice et les chaînes latérales des résidus sont indiquées dans leur position par rapport à l'axe de l'hélice. La phase hydrophobe comprend les résidus, vers la droite dans le dessin, Trp⁸, Leu¹, Leu⁵, Leu⁹, Leu² et Leu⁶. La face hydrophile comprend les résidus chargés Lys⁴, Glu⁷, Glu³ et Lys¹⁰.

20 La figure 2 est un exemple d'un antioxydant térapeptidique conçu à partir d'une seule révolution de la projection en roue hélicoïdale du peptide à dix résidus présentée dans la figure 1. La face hydrophobe du peptide de la figure 1 a été remplacée par Trp², Ala³, HBB-Aoc qui présentent une face hydrophobe suffisante pour ancrer le peptide au lipide. La face chargée hydrophile a été remplacée par Glu¹ et Lys⁴.

BREVE DESCRIPTION DES TABLEAUX

Le tableau I présente les résultats de l'analyse des acides aminés des peptides synthétisés.

30 Le tableau II présente les résultats d'expérience pression-volume démontrant l'efficacité des composés dans le modèle de poumons de rats adultes.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

On a utilisé les abréviations courantes suivantes des acides aminés naturels dans toute cette description :

- Ala ou A - alanine
- 5 Val ou V - valine
- Leu ou L - leucine
- Ile ou I - isoleucine
- Phe ou F - phénylalanine
- Trp ou W - tryptophane
- 10 Met ou M - méthionine
- Ser ou S - serine
- Tyr ou Y - tyrosine
- Asp ou D - acide aspartique
- Glu ou E - acide glutamique
- 15 Gln ou Q - glutamine
- Thr ou T - thréonine
- Gly ou G - glycine
- Lys ou K - lysine
- Arg ou R - arginine
- 20 Asn ou N - asparagine
- Nle - norleucine
- Orn - ornithine
- hArg- homoarginine
- Nva - norvaline
- 25 Aib - acide amino-isobutyrique

Les acides aminés naturels, à l'exception de la glycine, contiennent un atome de carbone chiral. En l'absence d'indications contraires, les acides aminés optiquement actifs, énumérés ici, ont la configuration L. Une fois que l'on a ajouté le
30 fragment antioxydant de la présente invention au peptide, des stéréoisomères peuvent se former. La présente invention comprend des mélanges de ces stéréoisomères, ainsi que le stéréoisomère isolé. Comme d'habitude, par écrit, la structure des peptides est ici telle que l'extrémité amino-terminale se

trouve sur le côté gauche de la chaîne et l'extrémité carboxy-terminale se trouve sur le côté droit de la chaîne.

5 Lorsque deux acides aminés se combinent pour former un peptide par l'intermédiaire d'une liaison amide typique, une molécule d'eau est libérée, et on appelle ce qui reste de chacun
des acides aminés un "résidu". La liaison amide peut également se faire lorsque X est lié à l'acide aminé suivant ou à un isostère de liaison amide. Un résidu est par conséquent un acide aminé auquel manque un atome d'hydrogène du groupe amino-
10 terminal, et auquel manque le groupe hydroxyle du groupe carboxyl-terminal. En utilisant la terminologie acceptée, un tiret (-) devant (indiquant une perte d'eau) le code à trois lettres d'un acide aminé ou d'un dérivé d'acide aminé indique la liaison amine d'un résidu.

15 "Groupe alkyle" utilisé ici indique un radical hydrocarboné à chaîne linéaire ou ramifiée tel que les groupes méthyle, éthyle, propyle, butyle, isopropyle, tertio-butyle, sec-butyle, isopentyle, 1-méthylbutyle, etc, en fonction du nombre d'atomes de carbone spécifiés. "Groupe acyle" utilisé ici indique
20 un radical formé à partir d'un acide organique par l'élimination d'un groupe hydroxyle ; la formule générale est RCO-, dans laquelle R peut représenter un hydrocarbure aliphatique, alicyclique, aromatique ou un atome d'hydrogène (groupe formyle). Le groupe R peut porter un substituant. Un exemple
25 d'un groupe acyle est le groupe succinyle.

Utilisé ici, le terme "acide aminé hydrophobe" indique un résidu non polaire avec une chaîne latérale hydrocarbonée aliphatique, tel que Val, Leu ou Ile ; ou un résidu non polaire avec un groupe aromatique tel que Phe, Tyr, Trp ou His.

30 Utilisé ici, le terme "acide aminé à charge négative" indique un résidu polaire avec une chaîne latérale hydrophile acide telle que Glu ou Asp.

Utilisé ici, le terme "acide aminé à charge positive" indique un résidu polaire avec une chaîne latérale hydrophile basique
35 telle que Lys, Arg ou His.

On peut synthétiser les peptides dans lesquels X n'a pas été modifié du point de vue fonctionnel par l'antioxydant désigné, par tout procédé approprié tel qu'un protocole séquentiel en phase solide, décrit ci-après. Les groupes Markush préférés sont
5 tels que R₁, R₂, R₆ et R₇ représentent chacun un groupe tertio-butyle, et R₃, R₄ et R₅ représente chacun un groupe méthyle. On préfère Da à Db, et B représente de préférence -C(O)-NH-B-C(O)-, dans lequel B représente un alcane en C₈.

On appelle X un "fragment antioxydant", car on pense que X
10 est la portion qui confère les propriétés antioxydantes au polypeptide. Cependant, il est à noter que X peut comprendre des lieurs pour le lier au polypeptide, tels que, lorsque les fragments antioxydant attachés au polypeptide sont décrits, ils comprennent également les lieurs appropriés par exemple, B,
15 -C(O)-, B-C(O)-, C(O)-NH-B-C(O)-, etc.

Il existe de nombreuses manières de former X. Par exemple, on peut acyler des dérivés d'acide aminé par un agent acylant formé à partir de composés antioxydant. Pour être un agent acylant, les composés antioxydants peuvent, par exemple,
20 former un anhydride symétrique ou un ester actif, par exemple, l'ester de N-hydroxybenzotriazole (ester d'HOBt). On expose ensuite l'agent acylant à un agent nucléophile fonctionnel non protégé pour que la réaction se produise. On effectue ceci de préférence dans une synthèse de peptide en phase solide, alors
25 que l'acide aminé destiné à recevoir le fragment antioxydant fait partie du peptide attaché à la résine.

On peut également modifier des acides aminés individuels avant leur incorporation dans le peptide, par exemple, par estérification, alkylation réductrice, etc. D'autres modifications
30 des acides aminés et des dérivés d'acide aminés contenant des groupes fonctionnels sont bien connues des hommes de métier.

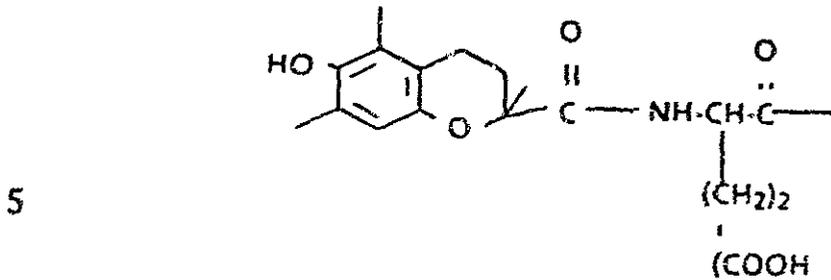
Les exemples préférés de composés antioxydants qui se sont révélés utiles dans des réactions avec des acides aminés ou des dérivés d'acides aminés dans la présente invention sont les
35 suivants :

- 1) HBB = acide 3,5-di-t-butyl-4-hydroxybenzoïque
- 2) HBP = acide 3-(3',5'-di-tert-butyl-4-hydroxyphényl)-propionique
- 3) HBC = acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxycinnamique
- 5 4) HBA = acide 2-(3',5'-di-t-butyl-4-hydroxyphényl)acétique
- 5) di-HBA = acide 2,2-di-(3',5'-di-t-butyl-4-hydroxyphényl)-acétique
- 6) TrI = acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-
- 10 2-carboxylique, également appelé Trolox.

On utilise de préférence HBB, HBP, HBC, HBA, di-HBA, et TrI lorsque le groupe fonctionnel est un groupe alcool ou un groupe amino. Dans l'ensemble des surfactants liés, on peut choisir un groupement préféré pour former un groupe que l'on préfère
15 davantage, tel que HBB et TrI.

Les composés antioxydant précédents sont disponibles dans le commerce ou leur synthèse est connue dans le domaine, par exemple, l'acide 3,5-di-t-butyl-4-hydroxyphénylacétique est décrit dans Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim., 358 1965 et le
20 3,5-di-t-butyl-4-hydroxy-benzaldéhyde est décrit dans J. Org. Chem., 22, 1333 1957. Généralement, on peut utiliser tout composé antioxydant dans la présente invention, si celui-ci (1) peut être attaché au polypeptide de la présente invention, (2) présente une activité antioxydante lorsqu'il est attaché au
25 polypeptide, et (3) permet au polypeptide de se comporter comme décrit ci-dessus.

TrI-Glu- indique une molécule avec une liaison peptidique formée entre le trolox et le résidu glutamyle, dans lequel le trolox est attaché au groupe α -amino du résidu acide
30 glutamique comme présenté ci-dessous :



10 Comme le montre l'exemple Tri-Glu, le fragment antioxydant, dans ce cas lorsque X = Db et B = une liaison, avec un groupe carbonyle (C(O)-), peut être attaché à l'extrémité α -amino-terminale du polypeptide pour former Db-C(O)-A₁-A₂-A₃-A₄-Y.

15 On peut préparer les polypeptides de cette invention par divers protocoles aisément disponibles pour les hommes de métier, tels qu'un procédé chimique en phase liquide. On préfère le procédé consistant à suivre un protocole séquentiel en phase solide, qui peut employer des appareils automatiques tels que le synthétiseur de peptides ABI. Dans le protocole séquentiel en phase solide, on suit les étapes suivantes : (1) on lie un premier acide aminé, dont le groupe α -amino est protégé, à un support de résine ; (2) on active le groupe carboxylique d'un second acide aminé dont le groupe α -amino est protégé ; (3) on déprotège le premier acide aminé avec un réactif qui permet au premier acide aminé de rester attaché à la résine ; et (4) on effectue le couplage entre le groupe α -amino du premier acide aminé et le groupe carboxylique activé du second acide aminé. On répète ces étapes avec les autres résidus aminoacides, ce qui permet de former le peptide. Lorsque le peptide de longueur désiré a été formé, on peut modifier le peptide avec un fragment antioxydant couplé de façon appropriée, avant de le couper de la résine, de le déprotéger et de l'isoler. En variante, on peut retirer de façon sélective le peptide protégé de la résine, et coupler le fragment antioxydant au peptide avant de retirer les groupes protecteurs et de l'isoler.

20

25

30

35

Le support de résine employé peut être toute résine appropriée conventionnellement employée dans le domaine de la préparation en phase solide de polypeptides, telle qu'un polystyrène ayant été réticulé avec 0,5 à environ 3% de divinylbenzène, que l'on a chlorométhylé ou hydroxyméthylé pour fournir des sites de formation d'esters avec l'acide aminé à groupe α -amino protégé initialement introduit. D'autres supports de résines appropriées sont les pMHBA (Peptide International, Louisville, Ky), RINK (Calbiochem, LaJolla, CA) et Sasrin (Blochem, Philadelphie, Pa). La résine Sasrin nécessite un cycle en ABI particulier pour charger le premier acide amino, qui est décrit dans le manuel d'utilisation du synthétiseur de peptide ABI. On attache le premier acide aminé, dont le groupe α -amino est protégé, à la résine comme décrit dans le manuel de l'utilisateur du synthétiseur de peptide Applied Biosystems Model 430A incorporé ici dans sa totalité.

Les procédés préférés d'activation de chacun des acides aminés à la chaîne peptidique lié comprennent la formation d'un anhydride symétrique ou d'un ester actif de chacun des groupes α -amino ajoutés, ayant été protégés de façon appropriée. Par exemple, on peut faire réagir un acide aminé à groupe α -amino protégé avec du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) en présence de dichlorométhane (DCM) pour former l'anhydride symétrique. En variante, on peut former l'ester actif d'HOBt en dissolvant l'acide aminé-BOC (acide aminé-tert-butylloxycarbonyle) et du HOBt dans du DCC et en refroidissant, en ajoutant un supplément de DCC et en réchauffant la solution à température ambiante. On ajoute ensuite cette solution à la résine liée à l'acide aminé. Ce procédé d'activation permettant de former des agents d'acylation peut également être utilisé pour les composés antioxydants.

Si d'autres groupes fonctionnels sont présents en plus du groupe α -amino, il faudra généralement protéger ces groupes. Généralement, on peut protéger le groupe α -amino et chacun des groupes fonctionnels de chaîne latérale par des groupes

protecteurs différents, de telle sorte qu'un groupe protecteur soit retiré sans retrait des autres groupes protecteurs.

Parmi les catégories de groupes protecteurs de groupe α -amino considérés pour une utilisation avec la présente invention, on trouve (1) les groupes protecteurs de type acyle tel que les groupes formyle, trifluoroacétyle, phtalyle, 5 toluènesulfonyle (tosyle), benzènesulfonyle, nitrophénylsulfényle, tritylsulfényle, o-nitrophénoxyacétyle et γ -chlorobutyryle ; (2) les groupes protecteurs de type uréthane 10 aromatique tels que les groupes benzyloxycarbonyles et benzyloxycarbonyles substitués, tels que les groupes p-chlorobenzyloxycarbonyle, p-nitrobenzyloxycarbonyle, p-bromobenzyloxycarbonyle, p-méthoxybenzyloxycarbonyle, 1-(p-biphényle)-1-méthyléthoxycarbonyle, α,α -diméthyl-3,5- 15 diméthoxybenzyloxycarbonyle et benzylhydrioxycarbonyle ; (3) les groupes protecteurs de type uréthane aliphatique, tels que les groupes tert-butyloxycarbonyle (Boc), diisopropylméthoxycarbonyle, isopropyloxycarbonyle, éthoxycarbonyle et allyloxycarbonyle ; (4) les groupes 20 protecteurs de type uréthane cycloalkylique tels que les groupes cyclopentylloxycarbonyle ou 9-fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) ; (6) les groupes protecteurs de type alkyle, tels que les groupes triphénylméthyle (trityle) et benzyle ; (7) les groupes trialkylsilane tels que le groupe 25 triméthylsilane.

Le choix du groupe protecteur du groupe α -amino dépend cependant de la résine utilisée, du groupe fonctionnel du site cible, des autres groupes fonctionnels présents dans le polypeptide, et de la capacité du X dérivé d'un acide aminé de 30 supporter la coupure de la résine par le réactif de coupure. Par exemple, pour préparer HBB-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys-NH₂, (SEQ ID NO : 1), on utilise une résine pMBHA, qui produit un groupe amino C-terminal, et on construit le peptide en utilisant une chimie du t-Boc standard sur un synthétiseur de peptide 35 ABI430A. On peut introduire le fragment HBB sous forme d'un

ester actif d'HOBt afin d'attacher HBB sur le groupe N- α -amino du site cible de l'acide glutamique. On peut utiliser de l'acide fluorhydrique (HF) anhydre pour couper simultanément le peptide de la résine et pour retirer les groupes protecteurs restants.

5 Le choix de la combinaison appropriée de groupes protecteurs et de réactifs permettant d'éliminer sélectivement les groupes protecteurs est bien connu dans le domaine. Par exemple, voir M. Bodanszky, PEPTIDE CHEMISTRY, A
10 PRACTICAL TEXTBOOK, Springer-Verlag (1988) ; J. Stewart et al., SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, 2nd ed., Pierce Chemical Co. (1984).

On introduit chacun des acides aminés protégés ou séquences d'acides aminés protégées dans le réacteur en phase
15 solide en un excès d'environ quatre fois et on effectue le couplage en présence d'un agent de couplage, tel qu'un milieu diméthylformamide/chlorure de méthylène (1/1) ou dans du diméthylformamide seul ou dans du chlorure de méthylène seul. Lorsque le couplage est incomplet, on répète le protocole
20 de couplage avant de retirer les groupes protecteurs de groupe α -amino, avant le couplage de l'acide aminé suivant dans le réacteur en phase solide. La réussite de la réaction de couplage à chacune des étapes de la synthèse est contrôlée par la réaction à la ninhydrine décrite par E. Kaiser, et al., Analyt.
25 Biochem. 34, 595 (1970).

Après obtention de la séquence d'acides aminés désirée, on retire le peptide de la résine en utilisant tout réactif approprié qui ne nuira pas au polypeptide. Par exemple, on peut utiliser
30 du HF anhydre contenant 5% d'anisole et 5% d'acétonitrile dans de l'acide trifluoroacétique 0,1% pour couper le peptide d'une résine pMBHA.

Les polypeptides de formule 1 peuvent former des sels acceptables du point de vue pharmaceutique avec tout acide non toxique, organique ou minéral. Des exemples d'acides
35 minéraux qui forment des sels appropriés comprennent les

acides chlorhydrique, bromhydrique, sulfurique, et phosphorique et les sels de métaux acides tels que le monohydrogéoorthophosphate de sodium et l'hydrogénosulfate de potassium. Des exemples d'acides
5 organiques qui forment des sels appropriés comprennent les acides mono, di et tricarboxyliques. Des exemples de ces acides sont, par exemple, les acides acétique, glycolique, lactique, pyruvique, malonique, succinique, glutarique, fumarique, malique, tartrique, citrique, ascorbique, maléique,
10 hydroxymaléique, benzoïque, hydroxybenzoïque, phénylacétique, cinnamique, salicylique, 2-phénoxybenzoïque, et les acides sulfoniques tels que l'acide méthanesulfonique et l'acide 2-hydroxyéthanesulfonique. Des sels du fragment aminoacide carboxy-terminal comprennent les sels d'acide
15 carboxylique non toxiques formés avec toute base minérale ou organique appropriée, par exemple, ces sels comprennent les sels de métaux alcalins, tels que par exemple, le sodium et le potassium, de métaux alcalino-terreux, tels que le calcium et le magnésium, de métaux légers du groupe IIIA, en particulier
20 l'aluminium ; et les amines primaires, secondaires, tertiaires, telles que par exemple, les trialkylamines, en particulier le triéthylamine, la procaine, la dibenzylamine, la 1-éthénamine, la N,N'-dibenzyléthylénédiamine, la dihydroabiétylamine, la N-(alkyle inférieur)pipéridine, et tout autre amine appropriée.
25 Les phospholipides des complexes protéine-phospholipide de cette invention peuvent être des phospholipides quelconques, et ce terme, utilisé ici, comprend les phosphoglycérides et les sphingolipides. Les phosphoglycérides sont les esters d'acide di-gras de glycérol dans lesquels le
30 groupe hydroxy restant, un groupe hydroxy-terminal du fragment glycérol, forme un ester avec l'acide phosphorique. Généralement, le fragment acide phosphorique des phosphoglycérides forme un second ester avec un alcool, par exemple éthanolamine, sérine, choline, ou glycérol. Les
35 sphingolipides sont les esters d'acides gras et digras de

sphingosine ou dihydrosphingosine, dans lesquels le groupe hydroxy en position 1 forme un ester avec l'ester de choline de l'acide phosphorique. Les lipides préférés des complexes protéine-phospholipide de cette invention comprennent la
5 dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), les molécules de phosphatidylcholine contenant des chaînes acyliques de longueurs différentes et de degrés de saturation différents (PC), la cardiolipine (CL), les phosphatidylglycérols (PG), les phosphatidylsérines (PS), les acides gras (AG), et les
10 triacylglycérols (TG). Le DPPC constitue le composant majeur du mélange surfactant pulmonaire, tandis que les PC, CL, PG, PS, AG, et TG constituent les composants mineurs. Des acides gras appropriés à une utilisation dans les phospholipides de cette invention sont les acides carboxyliques à longue chaîne
15 (comportant généralement huit atomes de carbones ou plus), généralement non ramifiés. Les acides gras peuvent être saturés ou insaturés. Des exemples d'acides gras sont les acides laurique, myristique, palmitique, et oléique.

On peut préparer des préparations pharmaceutiques du
20 polypeptide ou des complexes protéine-phospholipide de cette invention sous forme de mélange sec ou en suspension aqueuse, contenant dans certains cas de petites quantités de solvants organiques, tels que, par exemple, l'éthanol ou le trifluoroéthanol, de détergents, par exemple, le dodécylsulfate
25 de sodium ou le désoxycholate de sodium, de sels, tels que le chlorure de calcium ou le chlorure de sodium, des glucides, tels que le glucose, le dextrose ou le mannitol, et des acides aminés, tels que la glycine et l'alanine. Lorsque la composition pharmaceutique est préparée sous forme liquide, on peut
30 ajouter au liquide des agents stabilisants, des conservateurs, des régulateurs de la pression osmotique, des agents tampon et des agents de suspension. Si souhaité, on peut également ajouter des germicides appropriés. Le pH de la suspension aqueuse peut varier entre 2 et 10, et on peut l'ajuster avec des
35 acides et des bases, tels que, par exemple, l'acide chlorhydrique,

le phosphate de sodium, ou l'hydroxyde de sodium. On peut reconstituer le mélange sec en solution aqueuse contenant des sels acceptables du point de vue pharmaceutique, des solvants organiques et des détergents. On peut dialyser la préparation aqueuse, la filtrer ou la chromatographier pour échanger le milieu de suspension avec un milieu acceptable du point de vue pharmaceutique avant utilisation. On peut administrer la préparation sous forme de poudre sèche, de suspension aqueuse, ou d'un aérosol directement dans les poumons du sujet souffrant. On peut placer la composition pharmaceutique de la présente invention dans des récipients hermétiquement fermés, tels que des flacons et des ampoules et les conserver de façon stérile. On peut stocker la composition dans un flacon ou une ampoule séparément d'un flacon ou d'une ampoule contenant le tampon de suspension et on peut mélanger la composition sèche ou hydratée avec le tampon de suspension avant utilisation.

Les lipides constituent entre 50 et 99,9% de la préparation de surfactant. Des lipides appropriés comprennent les DPPC, PC, CL, PG, PS, AG, et TG. Le DPPC constitue l'espèce lipidique majeure et est présent en concentration comprise entre 60 et 100% du poids total de lipides. Les lipides restants sont présents en concentrations mineures. Les PC, CL, PG et PS peuvent constituer jusqu'à 30% des lipides, et les AG et TG peuvent constituer jusqu'à 10% du poids de lipides. Les chaînes acyliques grasses des composants lipides mineurs peuvent être saturées ou insaturées et leur longueur est quelconque. On préfère que les chaînes soient longues de 12 à 16 atomes de carbone et qu'il y ait jusqu'à 2 liaisons insaturées. La composition lipidique préférée est la suivante : 85-100% de DPPC plus 0-15% de PG. On préfère encore davantage du DPCC pur.

Les composants lipidiques du surfactant pulmonaire synthétique se trouvent couramment dans le surfactant pulmonaire des mammifères et sont disponibles à partir de sources industrielles avec une pureté élevée. On prépare les

composants polypeptidiques par synthèse de peptides en phase solide par des procédés connus des hommes de métier. Les mélanges de lipides de l'invention avec des protéines isolées de lavage de poumons de mammifères se sont montrés efficaces dans le traitement de RDS néonatale. Cependant, des mélanges de ces lipides avec des peptides synthétiques dans des préparations de surfactant pulmonaire n'ont été que récemment décrits (McLean, et al.).

On met des lipides en suspension sous forme de liposome par des procédés connus des hommes de métier, c'est à dire, que l'on mélange tout d'abord les lipides dans un solvant organique ou un mélange de solvants organiques volatiles, tel que des mélanges de chloroforme et de méthanol ou de trifluoroéthanol. On élimine le solvant organique par évaporation sous azote ou argon, ou sous vide. On ajoute une solution aqueuse qui peut contenir des acides, des bases, et des sels organiques et minéraux, et des saccharides tels que le dextrose au mélange de lipides sec pour obtenir une concentration finale de 0,1 à 100 mg de DPPC par ml. En général, il est préférable, mais pas indispensable, de réchauffer le mélange à 35-50°C, de l'agiter vigoureusement, et de l'incuber jusqu'à 2 heures à 25-50°C. Ensuite, on ajoute le peptide ou un mélange de peptide sous forme de poudre sèche, ou en suspension dans une solution aqueuse, contenant dans certains cas un solvant organique approprié, tel que l'éthanol ou du trifluoroéthanol, ou un agent dénaturant, tel que le chlorhydrate de guanidinium ou l'urée, qui améliorent la solubilité du peptide dans la suspension aqueuse. On peut favoriser l'association du peptide et du lipide à un pH particulier, et le pH de la solution aqueuse peut donc varier entre 2 et 10. Le procédé préféré de mélange du peptide et du lipide est d'ajouter le peptide sec au lipide dans de l'eau à 45-50°C et de mélanger par ultrasonication en bain à 45-50°C pendant 30-90 minutes, puis de cryodessécher et de stocker à -20°C.

On peut éventuellement mélanger des lipides avec un détergent approprié tel que l'octylglucosyle ou le désoxycholate de sodium selon un rapport molaire compris entre 1 et 20 parties de détergent par partie de DPPC dans de l'eau, un
5 tampon aqueux ou une solution saline à des concentrations comprises entre 1 et 100 mg de DPPC/ml. Ensuite, on ajoute le peptide sous forme d'une poudre sèche, ou en suspension en solution aqueuse, avec ou sans solvant organique, agent dénaturant ou détergent. On dialyse ensuite le mélange, on le
10 filtre, on le centrifuge ou on le soumet à une chromatographie pour éliminer le détergent.

On mélange de préférence les lipides et les peptides dans un solvant organique volatil avec ou sans une petite quantité d'eau. On évapore le solvant volatil sous un flux d'azote ou
15 d'argon, dans un four à vide, ou par évaporation rotative avant ou après l'addition d'un solvant aqueux.

On incube le mélange de lipides et de peptides préparés par un des procédés ci-dessus pendant une durée allant jusqu'à 2 heures, de préférence à 35-50°C avec irradiation sonique. On
20 peut ensuite dialyser le mélange, le filtrer, ou le soumettre à une chromatographie pour remplacer le milieu aqueux par un milieu acceptable du point de vue pharmaceutique, bien que cela ne soit pas nécessaire. Dans certains cas, on améliore l'efficacité en séparant le lipide ou le peptide n'ayant pas réagi
25 de l'association lipide-peptide par ultracentrifugation, filtration ou chromatographie. On peut ensuite lyophiliser ou aérosoliser le mélange.

Lorsqu'on utilise les complexes polypeptide-phospholipide de cette invention dans le traitement de syndrome de détresse
30 respiratoire du nouveau-né, un état physiologique qui résulte de l'incapacité des poumons des nourrissons prématurés à produire un surfactant pulmonaire, les complexes agissent comme un antioxydant et des surfactants pulmonaires synthétiques, et remplacent le surfactant naturel manquant ou
35 bien pallient à la défaillance du surfactant naturel. On poursuit

le traitement jusqu'à ce que les poumons du nourrisson produisent une quantité suffisante de surfactant pulmonaire naturel, telle que le traitement devienne inutile.

5 Les préparations conviennent de préférence à une administration endotrachéale, c'est à dire sous forme de suspension liquide, de poudre sèche ou d'aérosol. Pour une suspension liquide, on mélange le mélange sec ou le mélange en suspension aqueuse avec des agents appropriés tels que l'eau, des solutions salines, du dextrose et du glycérol pour produire
10 une composition efficace du point de vue pharmaceutique. Les suspensions liquides préférées contiendront entre 0,8 et 1,0 pour cent en poids de chlorure de sodium et contiendront 1 à 20 mM d'ions calcium. On filtre ensuite la préparation pour la stériliser. En général, la préparation comprend 1 à 100 mg de
15 DPPC par ml et est administrée à une dose de 0,2 à 5 ml/kg. Pour préparer un mélange sec, on lyophilise la suspension aqueuse. On prépare l'aérosol à partir d'une poudre sèche finement divisée mise en suspension dans un pulseur, tel que des alcanes et des alcanes fluorés inférieurs, tels que le fréon.
20 On stocke l'aérosol dans un récipient pressurisé.

Par exemple, on administre le surfactant (polypeptide de la présente invention et complexe lipidique) d'une manière appropriée à la forme posologique, par sonde endotrachéale, par administration par aérosol, ou par nébulisation de la suspension
25 ou du mélange sec dans le gaz inspiré. On administre le surfactant en une ou plusieurs doses de 10 à 200 mg/kg. Le procédé préféré d'administration se fait sous forme d'une suspension du lipide et du peptide dans une solution saline physiologique à une concentration de 5-10 mg de surfactant par ml à l'aide d'une sonde endotrachéale, en administrant une dose
30 de 5-100 mg/kg.

On administre le polypeptide de la présente invention pour traiter un sujet. "Sujet" indique un mammifère, par exemple, sans s'y limiter, un être humain.

Les exemples suivants présentent certains procédés de préparation du polypeptide, du complexe polypeptide/liquide et des matériaux de départ de la présente invention. La présente invention ne se limite pas aux exemples suivants ni à ces procédés de préparation.

Les abréviations non préalablement définies utilisées dans les exemples sont les suivantes :

TBDMS	tétrabutyl-diméthylsilyle
SEt	éthylthio
10 Suc	Succinyle
TFA	Acide trifluoroacétique
Bzl	Benzyle
Ot-Bu	Ether t-butylque ;

qui accompagnent la chimie Boc standard et la chimie Fmoc standard : les réactions chimiques utilisées avec le synthétiseur de peptide ABI, respectivement pour les cycles Boc et les cycles Fmoc.

PROTOCOLES CHIMIQUES EXPERIMENTAUX

20 Exemple 1

Synthèse de peptides et autres produits chimiques. On synthétise les peptides à l'échelle de 0,5 mmol par des procédés en phase solide sur un synthétiseur de peptides Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA) modèle 430-A. On a utilisé une

25 résine p-méthylbenzoxyhydrylamine (pMBHA) pour obtenir des extrémités C-terminal amides après coupure. On a effectué un double couplage des acides N α -t-Boc(t-butyloxycarbonyl)-aminés avec une protection de chaîne latérale de Cys (éthylthio), Glu (benzyle) et Lys (2-chlorobenzoyloxycarbonyl)

30 d'après Peptides International par l'intermédiaire de leurs anhydrides symétriques préformés. On a couplé le groupe antioxydant par activation de l'acide de l'antioxydant pour former l'anhydride symétrique. On a placé des antioxydants tels que HBB (acide 3,5,di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque) à

35 l'extrémité amino-terminale du peptide en préactivant l'acide

HBB pour former l'anhydride symétrique correspondant. Généralement, on a couplé l'antioxydant en double ou en triple pour assurer la réaction complète. Par exemple, HBB nécessite trois couplages pour obtenir une incorporation complète. On a effectué des couplages supplémentaires en fonction des résultats de tests à la nihydrine. On a retiré les groupes Na-t-Boc avec de l'acide trifluoracétique (TFA) 50% dans du chlorure de méthylène, et on les a neutralisés par de la diisopropyléthylamine (DEA) 10% dans du diméthylformamide.

5

10 On a coupé les peptides de la résine et on les a déprotégés dans du HF anhydre contenant 5% d'anisol et 5% de sulfure de diméthyle à -5°C pendant 45 min. On a éliminé le HF sous vide et on a extrait le peptide de la résine avec une solution aqueuse d'acétonitrile à 50%. On a congelé les extraits combinés et on les a lyophilisés, puis purifiés par CLHP préparative en phase inverse sur une colonne Rainin Dynamax (21,4 x 250 mm) C₁₈ à 40 ml/min avec un gradient d'acétonitrile dans une solution aqueuse de TFA à 0,1% (pH 2) avec un contrôle à 214 nm. On a recueilli le pic principal et on l'a lyophilisé. On a confirmé la pureté (> 97%) et l'identité des peptides synthétiques par l'obtention d'un pic unique en chromatographie liquide à haute performance (CLHP) analytique, électrophorèse de zone capillaire, spectroscopie de masse par bombardement atomique rapide (SM-FAB) sur un VG Analytical ZAB2-SE qui a donné des ions moléculaires uniques correspondant aux séquences correctes, et les analyses d'acides aminés qui étaient dans les 10% des valeurs prédites pour chacun des résultats. La L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) (pureté > 99%) provenait d'Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL). En utilisant ces protocoles, on a synthétisé les peptides suivants ; leurs propriétés analytiques sont présentées dans le tableau I.

15

20

25

30

1(A). PREPARATION DU POLYPEPTIDE : HBB-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 1) (HBB-Aoc = N^α-hydroxy-di-t-butyl-benzoyl-amino-octanoyl-)

On a tout d'abord préparé Aoc-Glu(OBzl)-Trp-Aib-Lys(N^ε-2ClZ)-pMBHA en utilisant une résine Lys(N^ε-2ClZ)-pMBHA placée dans un synthétiseur de peptide ABI430A, et on l'a synthétisé en utilisant la chimie t-Boc standard. Pour synthétiser le peptide 1A, on a combiné l'acide N^α-hydroxy-di-t-butyl-benzoïque (HBB) (501 mg), du diméthylformamide (4 ml) et du chlorure de méthylène (4 ml) et on a ajouté une solution de dicyclohexylcarbodiimide (8 ml d'une solution à 0,5 M dans du chlorure de méthylène) et on a agité pendant 5 minutes pour obtenir l'anhydride symétrique de HBB, que l'on a ensuite couplé à Aoc-Glu(OBzl)-Trp-Aib-Lys(N^ε-2ClZ)-pMBHA en un excès de 10 fois pour chacun des deux couplages. On a coupé le peptide protégé HBB-Aoc-Glu(OBzl)-Trp-Aib-Lys(N^ε-2ClZ)-pMBHA de la résine et on a retiré les groupes protecteurs de chaîne latérale en traitant le HBB-peptide-résine dans du HF anhydre contenant 5% d'anisole et 5% de sulfure de diméthyle à -5°C pendant 1 heure. On a ensuite extrait le peptide de la résine avec de l'acétonitrile à 50% dans de l'acide trifluoroacétique à 0,1%, on l'a congelé et on l'a lyophilisé. On a ensuite purifié le peptide par CLHP en phase inverse pour obtenir le composé titre.

25

1(B) PREPARATION DE COMPLEXE DPCC AVEC LE POLYPEPTIDE DECRIE DANS L'EXEMPLE 1(A)

On prépare le peptide (1)A comme décrit ci-dessus. On sèche du DPCC (25 mg) dans 1 ml de chloroforme sous un flux d'azote et on le sèche sous vide pour éliminer les traces de solvant organique. On ajoute au mélange lipidique sec 3 ml d'eau. On incube la préparation pendant 1 heure à 45°C. Ensuite, on ajoute 0,5 mg du peptide 1(A) à la préparation aqueuse. On sonique la préparation dans un ultrasonicateur en bain à 45°C

30

pendant 2 heures. On lyophilise le mélange lipide-peptide résultant et on le stocke à 4°C pendant une durée allant jusqu'à un mois. Avant le test, on ajoute 9 ml de NaCl 0,9%, tampon HEPES 20 mm, pH 7,40. On incube la préparation pendant une
5 heure à 45°C avec agitation périodique.

EXEMPLE 2

2(A). PREPARATION DU POLYPEPTIDE : HBB-Aoc-Glu-Trp-Glu-Lys-NH₂ (SEQ ID NO : 2) (HBB-Aoc = N^α-hydroxy-di-t-butyl-benzoyl-amino-octanoyl-)
10

On a préparé Aoc-Glu(OBzl)-Trp-Glu(OBzl)-Lys(N^ε-2ClZ)-pMBHA en utilisant une résine Lys(N^ε-2ClZ)-pMBHA placée dans un synthétiseur de peptide ABI430A, et on l'a synthétisé en utilisant la chimie t-Boc standard. Pour synthétiser le
15 peptide 2A, on a combiné l'acide N^α-hydroxy-di-t-butyl-benzoïque (HBB) (501 mg), du diméthylformamide (4 ml) et du chlorure de méthylène (4 ml) et on a ajouté une solution de dicyclohexylcarbodiimide (8 ml d'une solution à 0,5 M dans du chlorure de méthylène) et on a agité pendant 5 minutes pour
20 obtenir l'anhydride symétrique de HBB, que l'on a ensuite couplé à Aoc-Glu(OBzl)-Trp-Glu(OBzl)-Lys(N^ε-2ClZ)-pMBHA en un excès de 4 X pour chacun des deux couplages. On a coupé le peptide protégé HBB-Aoc-Glu(OBzl)-Trp-Glu(OBzl)-Lys(N^ε-2ClZ)-pMBHA de la résine et on a retiré les groupes protecteurs de
25 chaîne latérale en traitant le HBB-peptide-résine dans du HF anhydre contenant 5% d'anisole et 5% de sulfure de diméthyle à -5°C pendant 1 heure. On a ensuite extrait le peptide de la résine avec de l'acétonitrile à 50% dans de l'acide trifluoroacétique à 0,1%, on l'a congelé et on l'a lyophilisé. On a
30 ensuite purifié le peptide par CLHP en phase inverse pour obtenir le composé titre.

2(B) PREPARATION DE COMPLEXE DPPC AVEC LE POLYPEPTIDE
DECRIE DANS L'EXEMPLE 1(A)

On a mélangé le peptide 2(A) avec du DPPC pratiquement
comme décrit dans l'exemple 1.

5

EXEMPLE 3

3(A). PREPARATION DU POLYPEPTIDE : Tri-Aoc-Glu-Trp-Aib-
Lys-NH₂ (Tri-Aoc = Na-hydroxy-di-t-butyl-benzoyl-
aminooctanoyl-) (SEQ ID NO : 3)

10 On a préparé Aoc-Glu(OBzl)-Aib-Lys(N^e-2CIZ)-pMBHA en
utilisant une résine Lys(N^e-2CIZ)-pMBHA placée dans un
synthétiseur de peptide ABI430A, et on l'a synthétisé en
utilisant la chimie t-Boc standard.

15 Pour synthétiser le peptide 3A, on a combiné l'acide 6-
hydroxytétraméthylchroman-2-carboxylique (Trolox) (501 mg),
du diméthylformamide (4 ml) et du chlorure de méthylène
(2,5 ml) et on a ajouté une solution de
dicyclohexylcarbodiimide (8 ml d'une solution à 0,5 M dans du
20 chlorure de méthylène) et on a agité pendant 5 minutes pour
obtenir l'anhydride symétrique de HBB, que l'on a ensuite
couplé à Aoc-Glu(OBzl)-Trp-Aib-Lys(N^e-2CIZ)-pMBHA en un
excès de 10 X pour chacun des deux couplages.

25 Pour couper le peptide protégé Tri-Aoc-Glu(OBzl)-Trp-Aib-
Lys(N^e-2CIZ)-pMBHA de la résine et retirer les groupes
protecteurs de chaîne latérale on a traité le peptide avec du HF
anhydre contenant 5% d'anisole et 5% de sulfure de diméthyle à
-5°C pendant 1 heure. On a ensuite extrait le Tri-peptide de la
résine avec de l'acétonitrile à 50% dans de l'acide
trifluoroacétique à 0,1%, on l'a congelé et on l'a lyophilisé. On a
30 ensuite purifié le peptide par CLHP en phase inverse pour
obtenir le composé titre.

3(B) PREPARATION DE COMPLEXE DPPC AVEC LE POLYPEPTIDE
DECRIE DANS L'EXEMPLE 3(A)

On a préparé le peptide 3(A) avec du DPPC pratiquement
comme décrit dans l'exemple 1(B).

5

EXEMPLE 4

4(A). PREPARATION DU POLYPEPTIDE : HBB-Glu-Trp-Aib-Lys-
NH₂ (SEQ ID NO : 4) (HBB = N α -hydroxy-di-t-butyl-benzoyl)

On prépare le peptide 4(A) d'une manière pratiquement
10 analogue à la préparation du peptide 1(A).

4(B) PREPARATION DE COMPLEXE DPPC AVEC LE POLYPEPTIDE
DECRIE DANS L'EXEMPLE 4(A)

On mélange le peptide 4(A) avec du DPPC pratiquement
15 comme décrit dans l'exemple 1.

EXEMPLE 5

5(A).PREPARATION DU POLYPEPTIDE : HBB-Aoc-Glu-Trp-Ala-
Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 5) (HBB-Aoc = N α -hydroxy-di-t-butyl-
20 benzoyl-amino-octanoyl-)

On prépare le peptide 5(A) d'une manière pratiquement
analogue à la préparation du peptide 1(A).

5(B) PREPARATION DE COMPLEXE DPPC AVEC LE POLYPEPTIDE
25 DECRIE DANS L'EXEMPLE 5(A)

On mélange le peptide 5(A) avec du DPPC pratiquement
comme décrit dans l'exemple 1.

TABLEAU 1
PROPRIETES ANALYTIQUES DES PEPTIDES SYNTHETISEES
ANALYSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE FAB/MS DES
PEPTIDES 1-7

5

SEQ ID No:	PEPTIDE	FAB MS	AAA
1	HBB-Aoc-Glu-Aib-Lys-NH ₂	[M + H] ⁺ =920,6	@85%
2	HBB-Aoc-Glu-Aib-Glu-NH ₂	[M + H] ⁺ =963,6	@62%
3	Trl-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys-NH ₂	[M + H] ⁺ =920,6	@89%
4	HBB-Glu-Trp-Aib-Lys-NH ₂	[M + H] ⁺ =778,97	@78%
5	HBB-Aoc-Glu-Trp-Ala-Lys-NH ₂	[M + H] ⁺ =904	@76%

PREPARATION DES FRAGMENTS ANTIOXYDANTS

10 On peut utiliser les matériaux de départ antioxydants suivants comme décrit dans les exemples précédents.

Exemple 6

PREPARATION DE COMPOSE ANTIOXYDANT MATERIAU DE
DEPART : acide 3-t-butyl-5-méthyl-4-hydroxybenzoïque

15 Remplir un récipient de réaction d'une suspension d'hydrure de sodium (4,74 g, 0,198 mol) dans de l'éther diméthylque d'éthylèneglycol anhydre (150 ml). Ajouter goutte à goutte une solution de 2-t-butyl-6-méthylphénol (0,1 mol) dans de l'éther diméthylque d'éthylèneglycol (150 ml).
20 Chauffer à 50-60°C pendant 1,5 heure, puis introduire du dioxyde de carbone à l'aide d'un tube d'arrivée de gaz placé sous la surface du mélange réactionnel, pendant 20 heures. Refroidir à 5°C et détruire soigneusement l'hydrure de sodium en excès avec de l'alcool méthylique (30 ml). Après arrêt du
25 dégagement d'hydrogène, ajuster le pH du mélange réactionnel à 2 avec de l'acide chlorhydrique 1N. Diluer avec de l'eau (1,6 l) et recueillir le composé titre par filtration.

Exemple 7

PREPARATION DE COMPOSE ANTIOXYDANT MATERIAU DE
DEPART : acide (6-hydroxy-7-t-butyl-5-isopropyl-8-
propylchroman-2-yl)acétique

- 5 Mélangier des copeaux de magnésium (45 mg, 1,85 mmol) et du 1-chloro-2,2-diméthylpropane (74,6 mg, 0,7 mmol) dans de l'éther anhydre (9 ml). Chauffer et agiter vigoureusement, puis ajouter goutte à goutte le 1,2-dibromoéthane (156 mg, 0,839 mmol) dans de l'éther anhydre (1,5 ml). Chauffer au
- 10 reflux pendant 12 heures, placer sous une atmosphère d'argon et refroidir à 0-5°C. Ajouter goutte à goutte une solution de chlorure d'isobutyryle (0,533 mmol) dans de l'éther diéthylique anhydre (1,5 ml). Agiter à 0-5°C pendant 5 heures, verser dans un mélange de glace et d'acide chlorhydrique concentré
- 15 (0,15 ml) et séparer la phase organique. Laver avec de l'acétate d'éthyle, une solution aqueuse de carbonate de sodium 5% et de la saumure. Sécher (MgSO₄) et évaporer le solvant sous vide pour obtenir de la 2,2-6-triméthyl-4-heptanone.
- 20 Dissoudre du chlorure de vinylmagnésium (0,7 mmol) dans de l'éther diéthylique anhydre (1 ml) piacer sous une atmosphère d'argon et refroidir à 1-5°C. Ajouter goutte à goutte une solution de chlorure de butyryle (0,533 mmol) dans de l'éther diéthylique anhydre (1,5 ml). Agiter à 0-5 °C pendant 1,5 heure, verser dans un mélange de glace et d'acide
- 25 chlorhydrique concentré (0,15 ml) et séparer la phase organique. Laver avec de l'eau, une solution aqueuse de carbonate de sodium à 5% et de la saumure. Sécher (MgSO₄) et évaporer le solvant sous vide pour obtenir de la propylvinylcétone.
- 30 Dissoudre de la 2,2-6-triméthyl-4-heptanone (0,4 mol) dans du méthanol (10 ml) et ajouter du 4-butoxyde de potassium (12 g, 0,1 mol). Ajouter goutte à goutte une solution de propylvinylcétone (0,2 mol) dans du méthanol (10 ml). Agiter pendant 10 minutes et séparer entre de l'éther éthylique
- 35 et de la saumure. Séparer la phase organique et laver avec de la

saumure jusqu'à obtenir la neutralité. Sécher (Na_2SO_4) et évaporer le solvant sous vide pour obtenir de la 2-propyl-3-t-butyl-5-isopropylbenzoquinone.

5 Dissoudre de la 2-propyl-3-t-butyl-5-isopropylbenzoquinone (10 mmol), du 1,1,3,3-tétraméthylidisiloxane (1,79 ml, 10 mmol) et de l'iode (0,05 g) dans du chlorure de méthylène (30 ml). Agiter au reflux pendant 30 minutes et extraire avec de l'hydroxyde de sodium 1N (30 ml). Acidifier la phase aqueuse avec de l'acide
10 chlorhydrique concentré et l'extraire dans de l'acétate d'éthyle (4 x 10 ml), sécher (Na_2SO_4) et évaporer le solvant sous vide pour obtenir du 2-propyl-3-t-butyl-4-hydroxy-5-isopropylphénol.

15 Dissoudre de la 2-propyl-3-t-butyl-4-hydroxy-5-isopropylphénol (2,0 mol) et de l'orthoformate de triméthyle (0,3 l) dans du méthanol (1,2 l) et dégazer. Placer sous une atmosphère d'azote et refroidir à 3°C et ajouter de l'acide sulfurique concentré (5 ml). Ajouter, par addition goutte à goutte, de la méthylvinylcétone (340 ml, 4,0 mol) et agiter sous
20 refroidissement pendant 44 heures. Verser dans une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium et extraire dans de l'éther éthylique. Sécher (MgSO_4) et évaporer le solvant sous vide pour obtenir du 2-méthoxy-2-méthyl-7-t-butyl-5-isopropyl-8-propyl-chroman-6-ol.

25 Dissoudre du 2-méthoxy-2-méthyl-7-t-butyl-5-isopropyl-8-propyl-chroman-6-ol (2 mol) dans de la pyridine (600 ml) et ajouter de l'anhydride acétique (900 ml). Dégazer et agiter sous une atmosphère d'azote pendant 18 heures. Verser dans de la glace/eau et agiter pendant 3 heures. Extraire dans de l'éther
30 éthylique, sécher (MgSO_4), évaporer le solvant sous vide et purifier par chromatographie pour obtenir du 2-méthoxy-2-méthyl-7-t-butyl-5-isopropyl-8-propyl-chroman-6-yl-acétate.

35 Dissoudre du 2-méthoxy-2-méthyl-7-t-butyl-5-isopropyl-8-propyl-chroman-6-yl-acétate (2 mol) dans de l'acétone (2,5 l) et ajouter de l'eau (2 l) puis de l'acide chlorhydrique concentré

(16,6 ml). Éliminer le solvant par distillation du mélange agité jusqu'à ce que la température atteigne 90°C. Refroidir la suspension, la diluer avec de l'éther éthylique et la laver avec une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium. Sécher (MgSO₄), évaporer le solvant sous vide et purifier par chromatographie pour obtenir du 2-hydroxy-2-méthyl-7-t-butyl-5-isopropyl-8-propyl-chroman-6-yl-acétate.

5
10
15
20
25
30
35

Mettre en suspension de l'hydrure de sodium (47,2 g à 56% dans de l'huile minérale, 1,10 mol) dans du tétrahydrofurane anhydre (1 l). Placer sous une atmosphère d'azote et ajouter goutte à goutte du phosphonoacétate de triméthyle (209,4 g, 1,15 mol). Agiter 25 minutes et ajouter une solution de 2-hydroxy-2-méthyl-7-t-butyl-5-isopropyl-8-propyl-chroman-6-yl-acétate (0,5 mol) dans du tétrahydrofurane (1 l). Agiter à température ambiante pendant 18 heures, puis chauffer au reflux pendant 4 heures. Refroidir, évaporer le solvant sous vide et purifier par chromatographie pour obtenir le composé titre.

PROCEDES BIOLOGIQUES

Les procédés de test d'efficacité des préparations de surfactant synthétique sont bien connus dans le domaine. Par exemple, on peut tester des préparations de surfactant synthétique de la présente invention de toute manière appropriée, par exemple dans un modèle de poumon de rat adulte (Ikegami, et al., (1979) Pediatr. Res. 13, 777-780).

Les caractéristiques pression-volume des poumons de rat dépourvus de surfactant sont similaires à celles des poumons de nourrissons atteints de maladies à membranes hyalines, et le rétablissement des relations pression-volume du poumon vers la normale est corrélée à la quantité de surfactant instillé de manière dose-dépendante. (Bermel, M. S., et al., Lavage excised rat lungs as a model of surfactant deficiency, Lung 162: 99-113 (1984)).

Exemple 8

Modèle de poumon lavé isolé de rat

Les protocoles expérimentaux de préparation des animaux, d'enregistrement de la courbe pression-volume et de lavage de poumon sont adaptés de ceux décrits par Ikegami et al., *Pediatr. Res.* 11 : 178-182 (1977) et *Pediatr. Res.* 13: 777-780 (1979, et Bermel et al, *Lung* 162: 99-113 (1984). On anesthésie des rats Sprague Dawley mâles (200-250 g) avec du pentobarbital de sodium et on les exsanguine. On canule la trachée et on retire les organes thoraciques en bloc. Après élimination des tissus adventifs, on met la trachée et les poumons (environ 2 g) en suspension dans une solution saline (0,9 %), on les place dans une chambre à vide, et on les dégaze selon le protocole de Stengel et al. On met en suspension les poumons dégazés dans une solution saline dans un réservoir à chemise à 37°C et on connecte la canule trachéale à un manomètre à eau et à une seringue en verre par un tube en T. On place la seringue en verre dans une pompe à injection/prélèvement. On gonfle rapidement les poumons avec de l'air à une pression de 30 cm de H₂O à la vitesse de 10 ml/min pour réduire le piégeage de l'air, et on les maintient à cette pression pendant 10 min en ajoutant par intermittence de l'air aux poumons. On enregistre le volume total d'air injecté comme capacité pulmonaire totale (CPT), qui est généralement de 14-15 ml. On dégonfle ensuite les poumons à une vitesse de 2,5 ml/min jusqu'à atteindre la pression 0. Pendant le dégonflement, on relève la pression sur le manomètre à eau à intervalles de 1 cm et on l'enregistre. On utilise ces données pour construire une courbe pression/volume (P-V) ou une courbe de compliance quasi-statique après correction tenant compte de la courbe P-V de l'appareil. Après dégazage et équilibration, on rend les poumons déficients en surfactant par des lavages répétés avec 5 ml/g de tampon de lavage (NaCl 0,9%, HEPES 10 mM, Ph 7,4). On répète les protocoles de dégazage, d'équilibration et de lavage (15-20 fois) jusqu'à ce que la courbe pression-volume prenne une forme

nettement sigmoïdale et que le volume d'air restant dans les poumons à une pression de 5 cm de H₂O soit inférieure ou égale à 3 ml. A ce point, on considère les poumons comme déficient en surfactant. Pour le test, on ajoute 2 ml de NaCl 0,9%, tampon

5 HEPES 10 mm, pH 7,4, au surfactant pulmonaire sec (25 mg de phospholipide, 100-125 mg/kg) et on vortexe le mélange, on le purge avec de l'azote et on l'incube à 45°C pendant 1 h. On vortexe ensuite à nouveau le mélange, on le dégaze s'il est

10 mousseux, et on introduit 2 ml du mélange à tester dedans et on le retire des poumons quatre fois par la seringue. Lorsqu'on réintroduit le mélange à tester dans les poumons pour la cinquième fois, on l'y laisse. On a adopté ce protocole pour favoriser une distribution uniforme du matériau dans le

15 poumon. On dégaze les poumons, on les laisse s'équilibrer à 37°C pendant 7 min, et on effectue une mesure de P-V. On étudie les poumons dans une solution saline à 37°C plutôt qu'à température ambiante car les caractéristiques physiques des surfactants peuvent dépendre de la température. On administre

20 du surfactant pulmonaire canin d'une manière similaire, sauf que l'on ne chauffe le surfactant que pendant 5 min. Les données sont présentées en terme de %CPT. Les parties correspondant au dégonflement des courbes pression-volume (P-V) pour des poumons de rat adulte sont analysées en calculant les capacités pulmonaires totales (% CPT) à des

25 pressions de 5 et 10 cm de H₂O (PC₅ et PC₁₀). Les comparaisons s'effectuent par rapport au pourcentage de rétablissement = $(PC_{5(\text{suffisant})} - PC_{5(\text{test})} \times 100 / PC_{5(\text{suffisant})} - PC_{5(\text{déficient})}$ et sont effectuées par analyse de variance une voie en utilisant le

30 protocole général des modèles linéaires avec des contrastes spécifiques des moyennes (SAS Institute Inc., Cary, NC). Le lavage et le traitement par des mélanges à tester n'a pas produit de variation supérieure à 6% du CPT absolu.

Résultats

Les préparations administrées au rat avaient une apparence translucide. La partie correspondant au dégonflement de la courbe pression-volume (P-V) dans les poumons de rat adulte à été analysée par calcul du pourcentage de la capacité pulmonaire totale (CPT) à une pression de 5 cm H₂O (PC₅) et de la CPT à 10 cm de H₂O (PC₁₀). Le rétablissement par rapport aux valeurs PC₅ a été utilisé pour comparer les mélanges à tester. Le DPPC seul n'a pas eu d'effet significatif sur les courbes pression-volume (P-V) du poumon lavé. Les activités des mélanges peptide-DPPC sont indiquées dans le tableau 2.

TABLEAU 2

Efficacité des surfactants synthétiques dans le modèle de poumons lavé de rat adulte.

Mélange	n	PC ₅ (%CPT)	PC ₁₀ (%CPT)	RESTAURATION %
Suffisant	50	68±1	87±1	100
Déficient	50	17±1	45±1	0
DPPC	4	13±1	31±2	11±8
SEQ ID No : 1 HBB-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys-NH ₂	2	48±5	73±3	65±5
SEQ ID No : 2 HBB-Aoc-Glu-Trp-Glu-Lys-NH ₂	3	52±2	75±2	83±5
SEQ ID No : 3 Trl-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys-NH ₂	2	33±2	59±2	43±6
SEQ ID No : 5 HBB-Aoc-Glu-Trp-Ala-Lys-NH ₂	3	55±4	77±2	81±7

LISTING DE SEQUENCE

(1) INFORMATIONS GENERALES :

5 (i) DEMANDEURS : McLean, Larry R
Edwards, Judson V

(ii) TITRE DE L'INVENTION : Surfactants pulmonaires à
peptide synthétique possédant des antioxydants liés par
10 covalence

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES : 5

(iv) ADRESSE DE CORRESPONDANCE

(A) NOM : Marion Merrell Dow Inc.
15 (B) RUE : 2110 East Galbraith Rd.
(C) VILLE : Cincinnati P.O. Box 156300
(D) ETAT : Ohio
(E) PAYS : USA
(F) CODE POSTAL (ZIP) : 45215-6300

20

(v) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR :

(A) TYPE DE SUPPORT : disque souple
(B) ORDINATEUR : compatible IBM PC
(C) SYSTEME D'EXPLOITATION : PC-DOS/MS-DOS
25 (D) LOGICIEL : Patent In Release # 1,0, Version # 1,25

(vi) DONNEES SUR LA DEMANDE EN COURS

(A) NUMERO DE LA DEMANDE : US
(B) DATE DE DEPOT :
30 (C) CLASSIFICATION :

(vii) DONNEES SUR LA DEMANDE PRECEDENTE

(A) NUMERO DE LA DEMANDE : US 07/923 092
35 (B) DATE DE DEPOT : 31 JUILLET 1992

(viii) INFORMATION SUR LE MANDATAIRE/AGENT :

- (A) NOM : Collier, Kenneth J
- (B) NUMERO DE DEPOT : 34 982
- (C) NUMERO DE REFERENCE/REGISTRE : M01598 US

5

(ix) INFORMATIONS SUR LES TELECOMMUNICATIONS :

- (A) TELEPHONE : (513) 948-7834
- (B) TELECOPIE : (513) 948-7961
- (C) TELEX : 214320

10

(2) INFORMATIONS POUR SEQ ID NO: 1 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 4 acides aminés
- (B) TYPE : acide aminé
- (D) TOPOLOGIE : linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(ix) CARACTERISATION :

- (A) NOM/CLE : Site modifié
- (B) POSITION : 1
- (D) AUTRE INFORMATION : /note ="Xaa= acide N-alpha-[N-(8-hydroxy-di-t-butyl-benzoyl)amino octanoïque]-glutamique (HBB-Aoc-Glu)"

25

(ix) CARACTERISATION :

- (A) NOM/CLE : Site modifié
- (B) POSITION : 3
- (D) AUTRE INFORMATION : /note ="Xaa= acide 2-amino-isobutyrique (Aib)"

30

(ix) CARACTERISATION :

- (A) NOM/CLE : Site modifié
- (B) POSITION : 4

35

(D) AUTRE INFORMATION : /note ="Xaa=lysin-1-amide"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO: 1:

Xaa Trp Xaa Xaa

5 1

(2) INFORMATIONS POUR SEQ ID NO: 2 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

10

(A) LONGUEUR : 4 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé

(D) TOPOLOGIE : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

15

(ix) CARACTERISATION :

(A) NOM/CLE : Site modifié

(B) POSITION : 1

20 (D) AUTRE INFORMATION : /note ="Xaa= acide N-alpha-[N-(8-hydroxy-di-t-butyl-benzoyl)amino octanoïque]-glutamique (HBB-Aoc-Glu)"

(ix) CARACTERISATION :

(A) NOM/CLE : Site modifié

25

(B) POSITION : 4

(D) AUTRE INFORMATION : /note "Xaa = lysin-1-amide"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO: 2:

Xaa Trp Glu Xaa

30 1

(2) INFORMATIONS POUR SEQ ID NO: 3 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

35

(A) LONGUEUR : 5 acides aminés

(B) TYPE : acide aminé
(D) TOPOLOGIE : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

5

(ix) CHARACTERISATION :

(A) NOM/CLE : Site modifié

(B) POSITION : 1

10 (D) AUTRE INFORMATION : /note = "Xaa= acide N-alpha-
[N-(acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-chroman-2-
carboxylique)-amino octanoïque]"

(ix) CHARACTERISATION :

(A) NOM/CLE : Site modifié

15 (B) POSITION : 1

(D) AUTRE INFORMATION : /note ="(suite) -glutamique
(Trl-Aoc-Glu)"

(ix) CHARACTERISATION :

20 (A) NOM/CLE : Site modifié

(B) POSITION : 4

(D) AUTRE INFORMATION : /note ="acide 2-amino-
isobutyrique (Aib)"

25 (ix) CHARACTERISATION :

(A) NOM/CLE : Site modifié

(B) POSITION : 5

(D) AUTRE INFORMATION : /note ="Xaa=lysine-1-amide"

30 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO: 3:

Xaa Glu Trp Xaa Xaa

1

5

(2) INFORMATIONS POUR SEQ ID NO: 4 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- 5 (A) LONGUEUR : 4 acides aminés
(B) TYPE : acide aminé
(D) TOPOLOGIE : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

10 (ix) CARACTERISATION :

- (A) NOM/CLE : Site modifié
(B) POSITION : 1
(D) AUTRE INFORMATION : /note ="Xaa= acide N-alpha-[N-(8-hydroxy-di-t-butyl-benzoyl)-glutamique (HBB-G..."

15

(ix) CARACTERISATION :

- (A) NOM/CLE : Site modifié
(B) POSITION : 3
(D) AUTRE INFORMATION : /note ="Xaa = acide 2-amino-
20 isobutyrique (A'ib)"

(ix) CARACTERISATION :

- (A) NOM/CLE : Site modifié
(B) POSITION : 4
25 (D) AUTRE INFORMATION : /note ="Xaa=lysin-1-amide"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO: 4:

Xaa Trp Xaa Xaa

1

30

(2) INFORMATIONS POUR SEQ ID NO: 5 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- 35 (A) LONGUEUR : 4 acides aminés
(B) TYPE : acide aminé

(D) TOPOLOGIE : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

5 (ix) CARACTERISATION :

(A) NOM/CLE : Site modifié

(B) POSITION : 1

(D) AUTRE INFORMATION : /note ="Xaa= acide N-alpha-[N-
10 (8-hydroxy-di-t-butyl-benzoyl)amino octanoïque]-glutamique
(HBB-Aoc-Glu)"

(ix) CARACTERISATION :

(A) NOM/CLE : Site modifié

(B) POSITION : 4

15 (D) AUTRE INFORMATION : /note ="Xaa=lysin-1-amide"

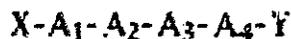
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO: 5 :

Xaa Trp Ala Xaa

1

REVENDICATIONS

1. Polypeptide de formule :



ou l'un de ses isomères optiquement actifs ou l'un de ses sels actifs du point de vue pharmaceutique, dans lequel

5

A_1 représente une liaison ou un acide aminé de charge négative choisi parmi Glu et Asp ;

A_2 représente un acide aminé hydrophobe choisi parmi Trp, Tyr, Phe, His, Val, Leu, ou Ile ;

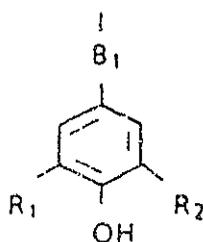
10

A_3 représente Aib, Glu, Gln, Leu, Ala, Orn ou une liaison ; et

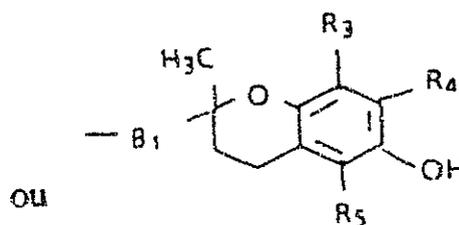
A_4 représente un acide aminé de charge positive choisi parmi Lys, Arg, ou His ;

X a pour formule Da ou Db :

15



Da



ou

Db

20

dans lesquelles B_1 représente B, $-C(O)-$, $-B-C(O)-$, $-C(O)-NH-B-C(O)-$; et B représente une liaison, un groupe alkylène en C_{1-16} ou un groupe alcénylène en C_{2-16} , et dans lesquelles chacun des

25

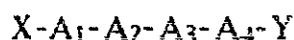
R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 et R_7 représentent indépendamment un groupe alkyle en C_{1-6} ;

Y représente un substituant carboxyle de A_4 choisi parmi les groupes hydroxy, amino, alkylamino et alcoxy ; et

30

dans lequel, lorsque A_3 représente une liaison, on peut échanger A_1 et A_2 .

2. Polypeptide de formule :



ou l'un de ses isomères optiquement actifs ou l'un de ses sels actifs du point de vue pharmaceutique, dans lequel

A_1 représente une liaison ou un acide aminé de charge négative choisi parmi Glu et Asp ;

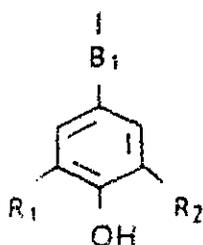
A_2 représente un acide aminé hydrophobe choisi parmi Trp, Tyr, Phe, His, Val, Leu, ou Ile ;

5 A_3 représente Aib, Glu, Gln, Leu, Ala, Orn ou une liaison ; et

A_4 représente un acide aminé de charge positive choisi parmi Lys, Arg, ou His ;

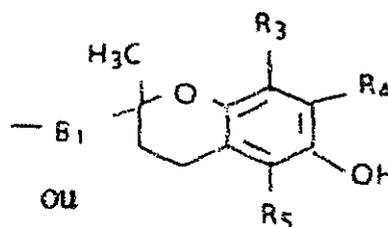
X a pour formule Da ou Db :

10



15

Da



Db

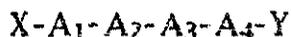
dans lesquelles B_1 représente B, $-C(O)-$, $-B-C(O)-$, $-C(O)-NH-B-C(O)-$; et B représente une liaison, un groupe alkylène en C_{1-16} ou un groupe alcénylène en C_{2-16} , et dans lesquelles chacun des

20 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 et R_7 représentent indépendamment un groupe alkyle en C_{1-6} ;

Y représente un substituant carboxyle de A_4 choisi parmi les groupes hydroxy, amino, alkylamino et alcoxy.

3. Polypeptide de formule :

25



ou l'un de ses isomères optiquement actifs ou l'un de ses sels actifs du point de vue pharmaceutique, dans lequel

A_1 représente une liaison ou Glu ;

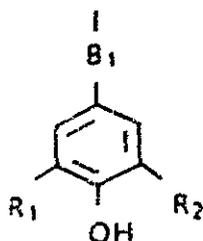
A_2 représente Trp ou Glu ;

30 A_3 représente Aib, Glu, Gln, Leu, Ala ou Orn ; et

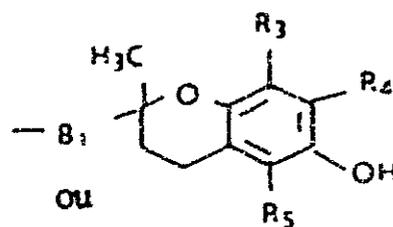
A_4 représente Lys ;

X a pour formule Da ou Db :

5



Da



Db

- dans lesquelles B_1 représente B, $-C(O)-$, $-B-C(O)-$, $-C(O)-NH-B-$,
 10 $C(O)-$; et B représente une liaison, un groupe alkylène en C_{1-16}
 ou un groupe alcénylène en C_{2-16} , et dans lesquelles chacun des
 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 et R_7 représentent indépendamment un
 groupe alkyle en C_{1-6} ; et
 Y représente un substituant carboxyle de A_4 choisi parmi les
 15 groupes hydroxy, amino, alkylamino et alcoxy.
4. Polypeptide conforme à l'une des revendications 1 à 3,
 dans lequel A_1 représente Glu.
5. Polypeptide conforme à l'une des revendications 1 à 3,
 dans lequel A_2 représente Trp.
- 20 6. Polypeptide conforme à l'une des revendications 1 à 3,
 dans lequel A_3 représente Aib.
7. Polypeptide conforme à l'une des revendications 1 à 3,
 dans lequel A_3 représente Ala.
8. Polypeptide conforme à la revendication 1 ou à la
 25 revendication 2, dans lequel A_4 représente Lys.
9. Polypeptide conforme à l'une des revendications 1 à 3,
 dans lequel X représente Da.
10. Polypeptide conforme à la revendication 17 ou à la
 revendication 18, dans lequel R_1 et R_2 représentent chacun un
 30 groupe tertio-butyle
11. Polypeptide conforme à l'une des revendications 1 à 10,
 dans lequel Y représente un groupe amino.
12. Polypeptide conforme à l'une des revendications 1 à 3, qui
 est HBB-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys-NH₂. (SEQ ID NO : 1).

13. Polypeptide conforme à l'une des revendications 1 à 3, qui est HBB-Aoc-Glu-Trp-Glu-Lys-NH₂. (SEQ ID NO : 2).

14. Polypeptide conforme à l'une des revendications 1 à 3, qui est Trl-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys-NH₂. (SEQ ID NO : 3).

5 15. Polypeptide conforme à l'une des revendications 1 à 3, qui est HBB-Glu-Trp-Aib-Lys-NH₂. (SEQ ID NO : 4).

16. Polypeptide conforme à l'une des revendications 1 à 3, qui est HBB-Aoc-Glu-Trp-Ala-Lys-NH₂. (SEQ ID NO : 5).

17. Complexe d'un polypeptide de formule :

10 $X-A_1-A_2-A_3-A_4-Y$

ou d'un de ses isomères optiquement actifs ou d'un de ses sels actifs du point de vue pharmaceutique, dans lequel

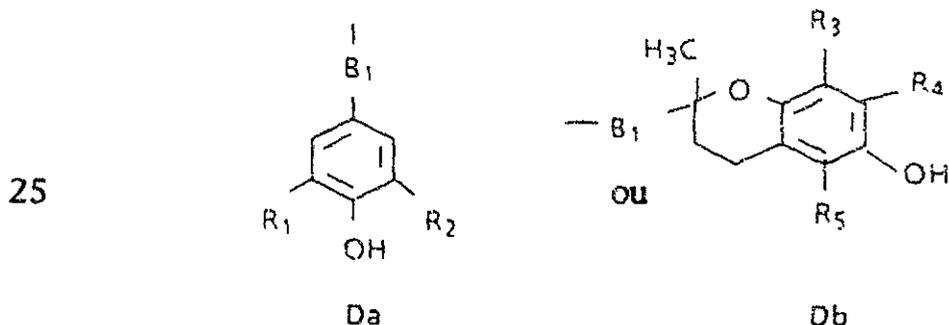
A₁ représente une liaison ou un acide aminé de charge négative choisi parmi Glu et Asp ;

15 A₂ représente un acide aminé hydrophobe choisi parmi Trp, Tyr, Phe, His, Val, Leu, ou Ile ;

A₃ représente Aib, Glu, Gln, Leu, Ala, Orn ou une liaison ; et

A₄ représente un acide aminé de charge positive choisi parmi Lys, Arg, ou His ;

20 X a pour formule Da ou Db :



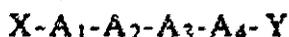
30 dans lesquelles B₁ représente B, -C(O)-, -B-C(O)-, -C(O)-NH-B-C(O)- ; et B représente une liaison, un groupe alkylène en C₁₋₁₆ ou un groupe alcénylène en C₂₋₁₆, et dans lesquelles chacun des R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ et R₇ représentent indépendamment un groupe alkyle en C₁₋₆ ;

35 Y représente un substituant carboxyle de A₄ choisi parmi les groupes hydroxy, amino, alkylamino et alcoxy ; et

dans lequel, lorsque A_3 représente une liaison, on peut échanger A_1 et A_2 ;

et d'un lipide ou d'un mélange de lipides choisi dans l'ensemble constitué de DPPC, PC, CL, PG, PS, FA et TG.

5 18. Complexe d'un polypeptide de formule :



ou d'un de ses isomères optiquement actifs ou d'un de ses sels actifs du point de vue pharmaceutique, dans lequel

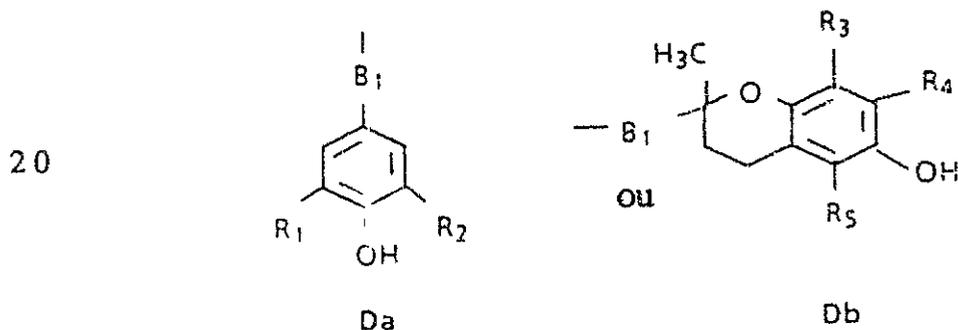
10 A_1 représente une liaison ou un acide aminé de charge négative choisi parmi Glu et Asp ;

A_2 représente un acide aminé hydrophobe choisi parmi Trp, Tyr, Phe, His, Val, Leu, ou Ile ;

A_3 représente Aib, Glu, Gln, Leu, Ala, Orn ou une liaison ; et

15 A_4 représente un acide aminé de charge positive choisi parmi Lys, Arg, ou His ;

X a pour formule Da ou Db :



25 dans lesquelles B_1 représente B, $-C(O)-$, $-B-C(O)-$, $-C(O)-NH-B-C(O)-$; et B représente une liaison, un groupe alkylène en C_{1-16} ou un groupe alcénylène en C_{2-16} , et dans lesquelles chacun des R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 et R_7 représentent indépendamment un groupe alkyle en C_{1-6} ;

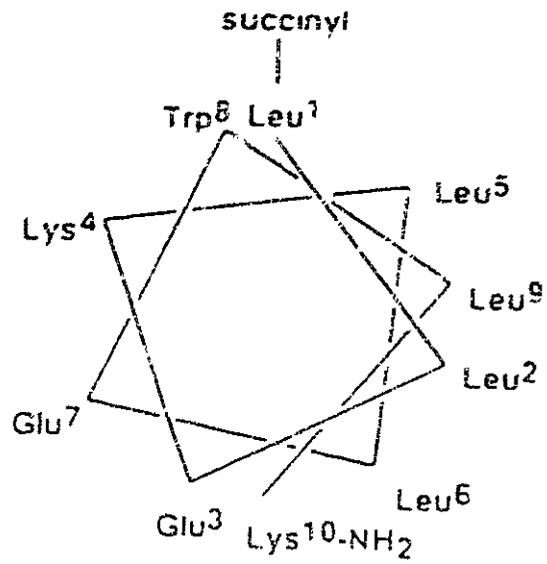
30 Y représente un substituant carboxyle de A_4 choisi parmi les groupes hydroxy, amino, alkylamino et alcoxy ;

et d'un lipide ou d'un mélange de lipides choisi dans l'ensemble constitué de DPPC, PC, CL, PG, PS, FA et TG.

19. Complexe conforme à la revendication 17 ou à la revendication 18, dans lequel le DPPC constitue le composant principal du lipide.
- 5 20. Complexe conforme à la revendication 17 ou à la revendication 18, dans lequel le lipide est un mélange de DPPC et de PG.
21. Complexe conforme à la revendication 17 ou à la revendication 18, dans lequel le lipide est constitué d'environ 85-100 % de DPPC et d'environ 0-15 % de PG.
- 10 22. Complexe conforme à la revendication 17 ou à la revendication 18, dans lequel le polypeptide est HBB-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys-NH₂. (SEQ ID NO : 1).
- 15 23. Complexe conforme à la revendication 17 ou à la revendication 18, dans lequel le polypeptide est HBB-Aoc-Glu-Trp-Glu-Lys-NH₂. (SEQ ID NO : 2).
24. Complexe conforme à la revendication 17 ou à la revendication 18, dans lequel le polypeptide est Tri-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys-NH₂. (SEQ ID NO : 3).
- 20 25. Complexe conforme à la revendication 17 ou à la revendication 18, dans lequel le polypeptide est HBB-Glu-Trp-Aib-Lys-NH₂. (SEQ ID NO : 4).
26. Complexe conforme à la revendication 17 ou à la revendication 18, dans lequel le polypeptide est HBB-Aoc-Glu-Trp-Ala-Lys-NH₂. (SEQ ID NO : 5).
- 25 27. Utilisation d'un complexe conforme à la revendication 17 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du syndrome de détresse respiratoire aiguë chez un sujet le nécessitant.
- 30 28. Utilisation d'un complexe conforme à la revendication 18 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du syndrome de détresse respiratoire aiguë chez un sujet le nécessitant.
- 35 29. Utilisation conforme à la revendication 27 ou à la revendication 28, dans laquelle le DPPC constitue le composant principal du lipide.

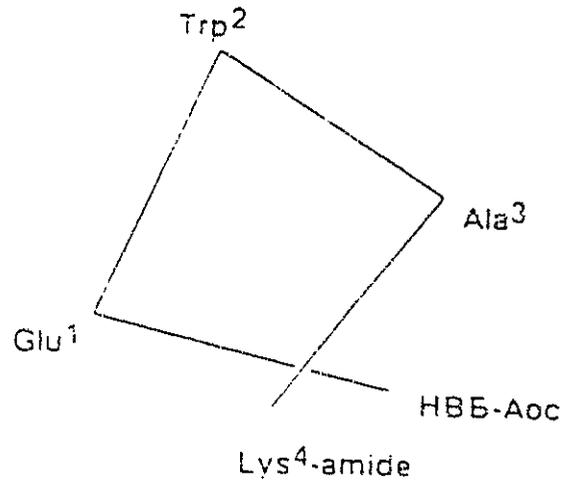
30. Utilisation conforme à la revendication 27 ou à la revendication 28, dans laquelle ledit lipide est un mélange de DPPC et de PG.
- 5 31. Utilisation conforme à la revendication 27 ou à la revendication 28, dans laquelle ledit lipide est constitué d'environ 85-100 % de DPPC et d'environ 0-15 % de PG.
32. Utilisation conforme à la revendication 27 ou à la revendication 28, dans laquelle ledit polypeptide est HBB-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys-NH₂. (SEQ ID NO : 1).
- 10 33. Utilisation conforme à la revendication 27 ou à la revendication 28, dans laquelle ledit polypeptide est HBB-Aoc-Glu-Trp-Glu-Lys-NH₂. (SEQ ID NO : 2).
34. Utilisation conforme à la revendication 27 ou à la revendication 28, dans laquelle ledit polypeptide est Tri-Aoc-Glu-Trp-Aib-Lys-NH₂. (SEQ ID NO : 3).
- 15 35. Utilisation conforme à la revendication 27 ou à la revendication 28, dans laquelle ledit polypeptide est HBB-Glu-Trp-Aib-Lys-NH₂. (SEQ ID NO : 4).
36. Utilisation conforme à la revendication 27 ou à la revendication 28, dans laquelle ledit polypeptide est HBB-Aoc-Glu-Trp-Ala-Lys-NH₂. (SEQ ID NO : 5).
- 20 37. Procédé de préparation d'un polypeptide conforme à la revendication 1, comprenant les étapes consistant à :
- (1) synthétiser un polypeptide convenablement protégé répondant à la formule A₁-A₂-A₃-A₄-Y ; puis à
- 25 (2) faire réagir une extrémité alpha-amino-terminale de A₁-A₂-A₃-A₄-Y convenablement préparée pour l'acylation en la faisant réagir avec un groupe carbonyle de B₁ de formule X, pour former un polypeptide de formule X-A₁-A₂-A₃-A₄-Y.
- 30 38. Procédé conforme à la revendication 37, dans lequel ledit polypeptide est conforme à l'une des revendications 12 à 16.

Figure 1



succinyl-Leu-Leu-Glu-Lys-Leu-Leu-Glu-Trp-Leu-Lys-NH₂

Figure 2



HBB-Aoc-Glu-Trp-Ala-Lys-NH₂