



31
32

Clarke, Modet & Co.

COLOMBIA

E-MAIL: clarkemo@colomsat.net.co
SANTAFÉ DE BOGOTÁ

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion: 00009307 00000001

Folios: 70

Fecha (AMD): 2000-04-28 17:15:28

Tramite: 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 329 COMPLET

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SEÑORES

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E.

S.

D.

COD:08

Ref.: SOLICITUD DE PATENTE EN COLOMBIA

SOLICITUD N° 00009307

FECHA SOLICITUD: FEBRERO 11, 2000

PATENTE: PEPTIDOS SINTETICOS QUE TIENEN ACTIVIDAD SUPERFICIAL
Y EL USO DE LOS MISMOS EN LA PREPARACIÓN DE UN TENSIOACTIVO
ARTIFICIAL

SOLICITANTE: CHIESI FARMACEUTICI S.p.A.

ASUNTO: PRESENTACION PRIORIDAD

DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, en mi condición de apoderada de la sociedad
solicitante, en esta oportunidad por el presente escrito me permito presentar:

1. Copia certificada de la prioridad Italiana reivindicada N° MI 99A000275 de
Febrero 12 de 1999.
- Traducción al Español de la mencionada prioridad

Esta prioridad está siendo presentada dentro del término de 3 meses que
exige el Convenio de Paris, toda vez que la solicitud fué radicada el 11 de
febrero de 2000.

Ruego a usted continuar con el presente trámite.

Señor Jefe,

DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

CCR/srr

P- 299



MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per INV. IND.

N. MI99 A 000275

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito inoltre verbale dell'Upica di Milano n. MIR000275 del 02/04/1999 (pag. 1) e Atto di Designazione degli Inventori (pag. 1).

Roma, li 10 FEB. 2000

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

Ing. DI CARLO

[Handwritten signature]

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A



34

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **CHIESI FARMACEUTICI S.p.A.** codice **01513360345**
Residenza **Parma**
2) Denominazione _____
Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome **Bianchetti Giuseppe ed altri** cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza **Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l.**
via **Rossini** n. **8** città **Milano** cap **20122** (prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/scl) **C07K** gruppo/sottogruppo **7/00**

"Peptidi sintetici aventi la capacità di diminuire la tensione superficiale e loro impiego nella preparazione di un surfattante artificiale"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) _____ 3) _____
2) _____ 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

1) _____
2) _____

SCIoglimento RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI



DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) **2** **PROV** n. pag. **28** riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)....
Doc. 2) **2** **PROV** n. tav. **03** disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3) **0** **XIS** lettera d'incarico, procura **XXXXXXXXXXXX**
Doc. 4) **0** **XIS** designazione inventore
Doc. 5) **0** **RIS** documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6) **0** **RIS** autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7) **0** nominativo completo del richiedente

SCIoglimento RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

8) attestati di versamento, totale lire **Cinquecentosessantacinquemila#** obbligatorio

COMPILATO IL **12/02/1999**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Banfi Paolo

CONTINUA SI/NO **NO**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO **SI**

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI **MILANO**

codice **15**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI99A 000275

Reg. A.

L'anno millenovecento

NOVANTANOVE

, il giorno

DODICI

, del mese di

FEBBRAIO

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n.

00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

Biglia Michele
IL DEPOSITANTE

timbro
dell'Ufficio

CORTONESI MAURIZIO
L'UFFICIALE ROGANTE

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

M.99A000275

REG. A

DATA DI DEPOSITO

12/02/1999

DATA DI RILASCIO

/ /

NUMERO BREVETTO

D. TITOLO

"Peptidi sintetici aventi la capacità di diminuire la tensione superficiale e loro impiego nella preparazione di un surfattante artificiale"

L. RIASSUNTO

Vengono descritti peptidi artificiali con proprietà tensioattive, analoghi della proteina SP-C del surfattante polmonare, e il loro uso nel trattamento della sindrome da distress respiratorio (RDS) e di altre malattie associate a disfunzioni del surfattante polmonare.

M. DISEGNO



36
35

5658 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

PB/as "PEPTIDI SINTETICI AVENTI LA CAPACITA' DI DIMINUIRE LA TENSIONE SUPERFICIALE E LORO IMPIEGO NELLA PREPARAZIONE DI UN SURFATTANTE ARTIFICIALE"

a nome : CHIESI FARMACEUTICI S.p.A. MI 99 A 000275

con sede in: Parma

12 FEB. 1999

* *

La presente invenzione si riferisce a nuovi peptidi artificiali con proprietà tensioattive. In particolare, l'invenzione si riferisce ad analoghi della proteina SP-C del surfattante che, una volta combinati con opportuni lipidi, sono particolarmente efficaci nel ridurre la tensione superficiale all'interfaccia aria-liquido.

Pertanto, i peptidi dell'invenzione possono essere usati in combinazione con lipidi, ed eventualmente in combinazione con la proteina SP-B o con SP-B analoghi o con polimixine, per la preparazione di surfattanti artificiali utili nel trattamento della sindrome da distress respiratorio (RDS) e di altre malattie associate a disfunzioni del surfattante polmonare.

Background dell'invenzione

Il surfattante polmonare riduce la tensione superficiale all'interfaccia aria-liquido della parete interna degli alveoli, prevenendo così il collasso dei polmoni al termine dell'espirazione. La carenza di surfattante è una disfunzione comune nei neonati prematuri ed è l'origine di una patologia chiamata RDS, che può essere efficacemente trattata con surfattanti naturali estratti dai polmoni animali (1). I principali costituenti di queste preparazioni di surfattante sono fosfolipidi come 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerolo-3-fosfocolina

(DPPC), fosfatidilglicerolo (PG) e le proteine idrofobiche del surfattante B e C (SP-B e SP-C). Le proteine idrofile del surfattante SP-A e SP-D, che sono lectine collagene di tipo C (Ca^{2+} -dipendenti) e che si pensa agiscano principalmente nel sistema di difesa dell'organismo, non sono normalmente contenute nelle preparazioni di surfattante in conseguenza delle procedure di estrazione con solvente organico impiegate.

SP-B e SP-C costituiscono solo circa l'1-2% in peso del surfattante, ma sono in grado di migliorare notevolmente le proprietà tensioattive, rispetto a preparazioni lipidiche pure (2,3). Le strutture primaria e secondaria di SP-B e SP-C e una struttura terziaria di SP-C in soluzione sono note (4). SP-B è costituita da due catene polipeptidiche identiche di 79 amminoacidi, connesse da un ponte disolfuro intermolecolare (5,6). Ciascuna catena monomerica possiede tre ponti disolfuro intramolecolari e si avvolge a formare almeno quattro eliche anfipatiche con una superficie polare e una non polare attraverso le quali SP-B può interagire con due doppi strati lipidici in modo da portarli in stretta vicinanza (7). SP-C è una lipoproteina composta da 35 residui amminoacidici con un dominio ad α -elica tra i residui 9-34 (8). L'elica è costituita principalmente da residui di valina e viene incorporata in un doppio strato lipidico orientata parallelamente alle catene aciliche lipidiche (9). Due gruppi palmitoilici sono legati covalentemente ai residui di cisteina in posizione 5 e 6 nella parte N-terminale del peptide (5). I due residui di arginina e lisina, nelle posizioni 11 e 12, carichi positivamente, verosimilmente interagiscono con i gruppi di testa carichi negativamente della membrana lipidica, aumentando così la sua rigidità. La rigidità dell'interazione lipide-peptide può diminuire verso l'estremità C-terminale, dove sono presenti

387
37

solo residui piccoli o non polari, rendendo questa parte potenzialmente più mobile in un doppio strato fosfolipidico. Si pensa che SP-C possa influenzare lo spessore e la fluidità dei lipidi circostanti attraverso l'elica estremamente stabile di polivalina (4).

Stato dell'arte

Poiché le preparazioni di surfattante ottenute da tessuto animale presentano alcuni svantaggi, come la loro limitata disponibilità, l'eventuale presenza di agenti infettivi e la possibilità di induzione di reazioni immunitarie, sono stati fatti dei tentativi di preparare surfattanti artificiali (4, 10), solitamente a partire da lipidi sintetici e proteine idrofobiche.

Studi precedenti hanno dimostrato che la SP-C sintetica difficilmente si 'ripiega' nella conformazione ad α -elica necessaria per avere proprietà tensioattive ottimali (11).

Di conseguenza, SP-C sintetici e analoghi di SP-C non si ripiegano come il peptide nativo, e non interagiscono propriamente con i lipidi del surfattante. Per ovviare a questo problema, sono stati intrapresi diversi tentativi per modificare la sequenza, per esempio sostituendo tutti i residui di Val dell'elica nella SP-C nativa con Leu, che favorisce notevolmente la conformazione ad α -elica. Il corrispondente analogo "transmembranoso", SP-C(Leu), ha mostrato un'eccellente diffusione all'interfaccia aria-liquido quando combinato con DPPC:PG:acido palmitico(PA) in rapporti 68:22:9 p/p/p. Tuttavia, il valore di $\gamma_{\max}$ (tensione massima superficiale durante compressione ciclica della superficie) era significativamente più alto di quello del surfattante naturale. Non è stato inoltre possibile preparare miscele lipide-peptide a concentrazioni superiori a circa 20 mg/ml, probabilmente a causa

39 X
30

della formazione di oligomeri peptidici (12). Altri autori hanno sintetizzato analoghi bioattivi di SP-C costituiti da polileucine di varia lunghezza. In questi studi non sono stati riportati né oligomerizzazione né problemi nell'allestimento di preparazioni con elevata concentrazione di lipidi.

In varie pubblicazioni viene affrontato il problema di sintetizzare analoghi peptidici dei peptidi del surfattante naturale, e vengono fornite diverse soluzioni. Tra queste pubblicazioni, WO93/21225, EP 0 733 645, WO96/17872, a nome Tokyo Tanabe, descrivono analoghi peptidici della SP-C naturale, che in generale differiscono dal peptide naturale per la sequenza N-terminale.

Le domande di brevetto a nome Scripps Research Institute WO89/06657 e WO92/22315 descrivono analoghi della SP-B con residui amminoacidici idrofobici e idrofilici alternati.

Clercx A. et al., Eur. J. Biochem. 229, 465-72, 1995, descrivono peptidi di varie lunghezze corrispondenti alla sequenza N-terminale della SP-C del maiale e un peptide ibrido derivato dalla SP-C suina e da batteriorodopsina.

Johansson J. Et al., Biochem. J. 307, 535:41, 1995, descrivono peptidi sintetici che differiscono dalla SP-C suina naturale per sostituzione di alcuni amminoacidi.

WO89/04326 a nome California Biotechnology - Byk Gulden, e WO91/18015 a nome California Biotechnology Scios Nova, descrivono analoghi della SP-C contenenti una sequenza N-terminale iniziale in cui le due Cys di SP-C naturale vengono sostituite da due Ser.

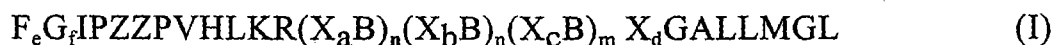
Descrizione dell'invenzione

E' stato ora trovato che sostituendo residui di amminoacidi neutri con



residui polari o ingombranti, residui di Val con altri residui neutri e idrofobici, residui di Cys con Ser, si ottiene un analogo di SP-C con proprietà particolarmente favorevoli di riduzione della tensione superficiale.

L'invenzione fornisce analoghi della SP-C che hanno la seguente formula generale (I), usando per gli amminoacidi il codice ad una lettera:



in cui:

X è un amminoacido scelto dal gruppo comprendente V, I, L, Nle (norleucina);

B è un amminoacido scelto dal gruppo comprendente Ornitina, K, I, W, F, Y, Q, N;

Z è un amminoacido scelto dal gruppo comprendente S, C, F o residui di S o C sostituiti con gruppi acilici contenenti 12-22 atomi di carbonio legati alla catena laterale rispettivamente attraverso legami estere o tioestere;

a è un numero intero da 1 a 19;

b è un numero intero da 1 a 19;

c è un numero intero da 1 a 21;

d è un numero intero da 0 a 20;

e è 0 o 1;

f è 0 o 1;

n è 0 o 1;

m è 0 o 1,

con le condizioni:

- $n+m > 0$;

41 10
40

- $f \geq e$;
- $(X_a B)_n (X_b B)_n (X_c B)_m X_d$ è una sequenza avente in totale 22 amminoacidi, preferibilmente da 10 a 22.

Peptidi preferiti di formula (I) hanno le seguenti sequenze:

(Ia) FGIPSSPVHLKRX₄BX₄BX₄BXGALLMGL

(Ib) FGIPSSPVHLKRX₅BX₅BX₄GALLMGL

(Ic) FGIPSSPVHLKRX₄BX₁₁GALLMGL

(Id) FGIPSSPVHLKRX₈BX₇GALLMGL

(Ie) FGIPSSPVHLKRX₁₁BX₄GALLMGL

in cui la serina può essere eventualmente acilata, ad esempio con palmitoile.

Tra le sequenze (Ia)-(Ie), quelle con B = K o F e X = L, I o Nle sono preferite.

Secondo le realizzazioni preferite dell'invenzione, i peptidi di formula (Ia)-(Ie) hanno rispettivamente le seguenti sequenze:

FGIPSSPVHLKRLILKLLLLKILLKLGALLMGL [SP-C (LKS)]

FGIPSSPVHLKRLILKLLLLIKLLILGALLMGL [SP-C (LKS)1]

FGIPSSPVHLKRLILKLLLLLILLILGALLMGL [SP-C (LKS)2]

FGIPSSPVHLKRLILLLLLLKLILLILGALLMGL [SP-C (LKS)3]

FGIPSSPVHLKRLILLLLLLLIKLLILGALLMGL [SP-C (LKS)4]

in cui la serina può essere eventualmente acilata, ad esempio con palmitoile.

I peptidi di formula (I) possono essere preparati usando tecniche convenzionali di sintesi peptidica.

Tali tecniche sono descritte per esempio in Schroeder et al., "The peptides", vol. 1, Academic Press, 1965; Bodanszky et al., "Peptide synthesis", Interscience Publisher, 1996; Baramy & Merrifield, "The peptides; Analysis,

42 K
41

Synthesis, Biology", vol. 2, cap. 1, Academic Press, 1980, e comprendono la sintesi peptidica in fase solida, in soluzione, metodi di sintesi di chimica organica, o qualsiasi loro combinazione.

I peptidi acilati sono preferibilmente sintetizzati per trattamento dei peptidi con un cloruro acilico in acido trifluoroacetico puro per 10 min a temperatura ambiente, dopodiché la reazione viene fermata per aggiunta di etanolo acquoso all'80% (E. Salakdeh-Yousefi, J. Johansson and R. Strömberg, in corso di pubblicazione).

I peptidi dell'invenzione possono essere vantaggiosamente preparati anche con tecniche di biotecnologia.

Dopo sintesi e purificazione, i peptidi sintetici vengono caratterizzati dal punto di vista biochimico e biofisico, come riportato nel seguito.

L'attività dei peptidi dell'invenzione nel ridurre la tensione superficiale è stata valutata in combinazione con lipidi, fosfolipidi, SP-B, analoghi di SP-B o polimixine. In particolare i peptidi sono stati combinati con DPPC/PG/PA con o senza SP-B, analoghi di SP-B o polimixine.

I risultati delle misure di attività tensioattiva con il surfattometro a bolla-pulsante chiaramente mostrano che i peptidi sintetici della presente invenzione sono in grado di diminuire considerevolmente la tensione superficiale minima e massima ($\gamma_{\min}$, $\gamma_{\max}$) durante la compressione ciclica della superficie fino a valori comparabili a quelli ottenuti usando surfattanti di origine naturale.

L'aggiunta di SP-B o polimixina B alla miscela peptide/lipidi e/o fosfolipidi ha fornito risultati particolarmente favorevoli.

Un secondo aspetto dell'invenzione riguarda l'uso in un surfattante

artificiale di polimixine, in particolare polimixina B, in qualità di analoghi della SP-B, insieme a uno o più peptidi di formula (I), lipidi e/o fosfolipidi. Lipidi/fosfolipidi adatti possono essere scelti dal gruppo che comprende DPPC, altre fosfatidilcoline, PG, PA, triacilgliceroli e sfingomielina.

Il surfattante può essere preparato miscelando soluzioni o sospensioni di peptidi e lipidi e per successivo essiccamento della miscela. All'occorrenza la miscela essiccata può essere risospesa, dispersa o somministrata come tale in soggetti che necessitano di un trattamento per carenza di surfattante.

Se la somministrazione è in forma di aerosol, sarà necessario combinare piccole particelle di surfattante con propellente inerte idoneo. Altre forme di somministrazione come la vaporizzazione o la nebulizzazione di soluzioni/sospensioni stabili di surfattante sono pure comprese nell'ambito dell'invenzione.

Secondo un ulteriore aspetto l'invenzione riguarda l'uso dei peptidi descritti e/o delle polimixine B nella preparazione di un surfattante da utilizzarsi in terapia in tutti i casi di carenza di surfattante o disfunzioni correlate. Tipicamente il surfattante verrà usato nel trattamento di RDS che colpisce frequentemente i neonati prematuri.

Esempi

I seguenti esempi illustrano l'invenzione in maggior dettaglio.

Esempio 1

Sintesi e purificazione del peptide

Un analogo di SP-C, SP-C(LKS) (Fig. 1) è stato sintetizzato a partire dai corrispondenti *tert*butilossicarbonilderivati (13) utilizzando la tecnologia in fase solida in un'apparecchiatura Applied Biosystems 430A. La scissione del



legame resina-peptide e la deprotezione delle catene laterali sono state condotte con acido fluoridrico anidro/ metossibenzene/dimetilsolfuro 10:1:1 (v/v/v) per 1,5 ore a 0°C. I gruppi protettori e gli "scavengers" (basi per neutralizzare l'acido fluoridrico) sono stati rimossi per estrazione ripetuta con dietiletere e il peptide è stato successivamente rimosso dalla resina con diclorometano/acido trifluoroacetico (TFA) 3:1 (v/v) seguito da evaporazione s.v. al rotavapor. L'estratto peptidico grezzo è stato ridisciolti ad una concentrazione di 100 mg/ml in cloroformio/metanolo 1:1 (v/v) contenente il 5% di acqua. Un'aliquota di 10 mg è stata caricata su una colonna Sephadex LH-60 (40 x 1 cm) nello stesso solvente (2). Sono state raccolte frazioni di 2,5 ml e si sono misurate le assorbanze a 214 e 280 nm. L'identificazione e la determinazione quantitativa sono state effettuate *via* analisi amminoacidica.

Per l'acilazione, il peptide purificato (di solito circa 5 mg) viene essiccato, sciolto in TFA distillato (100 µl) e addizionato di un cloruro acilico (10-20 equivalenti rispetto al peptide). Dopo 10 minuti la reazione viene bloccata con etanolo acquoso all'80% (1,9 ml). I peptidi acilati vengono purificati per cromatografia su Lipidex 5000 eluendo con cloruro di etilene/metanolo 1:4 (v/v) seguita da purificazione su una colonna HPLC in fase inversa C18 usando un gradiente lineare a partire da una miscela di 2-propanolo/0,1% TFA fino ad una miscela di metanolo (acq.) 60% / TFA 0,1% o etanolo (acq.) 75% / TFA 0,1%.

Esempio 2

Caratterizzazione biochimica

La purezza del peptide è stata controllata *via* elettroforesi in gel di poliacrilammide e sodio dodecilsolfato (SDS) (PAGE) (Phast-system,

64
45
44

Pharmacia, Svezia) e *via* HPLC in fase inversa usando una colonna C18 e un gradiente lineare da metanolo acquoso 60% / TFA a 0,1% e isopropanolo/TFA 0,1% (16).

Il peso molecolare è stato determinato *via* spettrometria di massa utilizzando uno strumento "matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight (MALDI-TOF)" (Lasermat 2000, Finnigan MAT). Per la calibrazione è stato utilizzato un peptide intestinale vasoattivo di peso molecolare 3326.8.

La struttura secondaria del peptide è stata indagata *via* dicroismo circolare (CD) utilizzando uno spettropolarimetro Jasco-720 (Jasco, Giappone). Dopo solubilizzazione con trifluoroetanolo (TFE) gli spettri sono stati registrati da 260 a 184 nm con una velocità di scansione di 20 nm/min e una risoluzione di 2 punti/nm. La ellitticità molare residua è stata calcolata ed espressa in kdeg x cm²/dmol. Le ellitticità molarie a 208 e 222 nm sono state utilizzate per stimare il contenuto di struttura a elica (17).

Le indagini di struttura secondaria di SP-C(LKS) *via* spettroscopia CD hanno mostrato uno spettro tipico di peptidi ad α -elica e un contenuto di α -elica di circa 75%, stimato dai minimi a 208 nm e 222 nm. La struttura secondaria rimane stabile in seguito a graduali diluizioni con acqua fino al 12% di TFE a condizione che il peptide venga solubilizzato con TFE puro.

L'SDS-PAGE di SP-C(LKS) presenta una singola banda simile alla SP-C nativa mentre SP-C(Leu), a cui manca Lys nella parte elicoidale dà origine ad oligomeri. Contrariamente all'esperienza precedente con miscele di SP-C(Leu)/lipidi, che sono difficili da solubilizzare in concentrazioni maggiori di 20 mg/ml (12), è stato possibile fare una miscela SP-C(LKS)/lipide ad una concentrazione di lipide di 80 mg/ml e un rapporto polipeptide/lipide di 0,03.

Esempio 3

Preparazione di miscele peptide/lipide

DPPC, PG e PA sono stati acquistati da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). I lipidi, disciolti in cloroformio/metanolo 98:2 (v/v), sono stati miscelati nelle proporzioni DPPC:PG:PA 68:22:9 (p/p/p) o DPPC/PG 7:3 (p/p). Le preparazioni di surfattante sono state allestite aggiungendo a ciascuna delle miscele lipidiche, SP-C(LKS) da solo o SP-C(LKS) e SP-B, in rapporti in peso totali di polipeptide/lipide di 0-0,05. Le miscele sono state evaporate sotto azoto e risospese in NaCl 150 mmol/l o in tampone Hepes 10 mmol/l a pH 6,9 contenente NaCl 140 mmol/l e CaCl_2 2,0 mmol/l, in modo da avere una concentrazione di lipide di 10-80 mg/ml. Le sospensioni sono state ripetutamente congelate e sonicate (50 W, 48 kHz) fino ad omogeneità. In alcuni casi le sospensioni finali sono state incubate a 45°C per un'ora.

Le preparazioni di surfattante sospese in NaCl 150 mmol/l hanno un pH di 3.5-5.5. In preparazioni contenenti SP-B, sono stati osservati valori di pH inferiori, pari a 3.5-4.5. Dato che la SP-B naturale viene purificata usando solventi organici acidificati (2) piccole quantità di acido possono rimanere nelle preparazioni. Si è ottenuto un pH quasi fisiologico sospendendo la preparazione di surfattante in tampone Hepes a pH 6.9, contenente NaCl 140 mmol/l e CaCl_2 2 mmol/l. Rispetto alle corrispondenti preparazioni in soluzione fisiologica non tamponata non ci sono stati cambiamenti di $\gamma_{\max}$ o $\gamma_{\min}$ quando è stata usata la miscela di lipidi DPPC/PG 7:3 (p/p). Tuttavia quando è stato incluso PA nella miscela lipidica, a valori di pH più elevati (preparazioni in tampone) si è osservato un aumento sia di $\gamma_{\max}$ che di $\gamma_{\min}$ (Tabelle 1 e 2).

**Tabella 1 - Proprietà tensioattive di preparazioni di surfattante artificiale
in soluzione fisiologica.**

Le misure sono state effettuate direttamente dopo la preparazione dei campioni o dopo un'ora di incubazione a 45° C ad una concentrazione di 10 mg/ml di fosfolipidi in NaCl 150 mmol/l.

Le registrazioni sono state ottenute a tempi diversi con un surfattometro a bolla pulsante a 37°C e 50% di compressione superficiale ad una frequenza di 40 cicli per minuto. I valori sono la media (in parentesi la deviazione standard SD) di 3-5 misurazioni. Le abbreviazioni sono definite nel testo.



Tabella 1

Preparazioni di surfattante			Tensione superficiale (mN/m)						
SP-C (LKS) (% in peso)	SP-B (% in peso)	Fosfolipidi	Incubazione	7,5 s		1 min		5 min	
				$\gamma_{\min}$	$\gamma_{\max}$	$\gamma_{\min}$	$\gamma_{\max}$	$\gamma_{\min}$	$\gamma_{\max}$
3	-	DPPC/PG/PA	-	<1	41(1)	<1	41(1)	<1	41(0)
3	-	DPPC/PG/PA	45°C	<1	41(1)	<1	41(1)	<1	41(1)
3	2	DPPC/PG/PA	-	<1	33(2)	<1	33(2)	<1	33(2)
3	2	DPPC/PG/PA	45°C	<1	34(1)	<1	34(2)	<1	25(2)
3	-	DPPC/PG	-	12	39(5)	14(4)	42(4)	9(5)	42(2)
3	-	DPPC/PG	45°C	8(3)	35(5)	9(3)	39(5)	6(4)	42(3)
3	2	DPPC/PG	-	2(1)	31(1)	2(1)	31(3)	2(1)	33(1)
3	2	DPPC/PG	45°C	3(3)	29(3)	1(1)	33(2)	1(0)	36(1)
3	1	DPPC/PG	-	<1	24(4)	1(2)	26(4)	<1	31(1)
3	0.5	DPPC/PG	45°C	4(2)	29(1)	4(3)	29(2)	3(1)	34(2)

49
48
42

Tabella 2 - Proprietà tensioattive di preparazioni di surfattante artificiale in tampone.

Le preparazioni sono state esaminate alla concentrazione di 10 mg/ml di fosfolipidi in 10 mmol/l di tampone Hepes (pH 6.9) contenente NaCl 140 mmol/l e CaCl_2 2.0 mmol/l. Le registrazioni sono state ottenute con un surfattometro a bolla pulsante a 37°C e con una compressione della superficie del 50%, ad una frequenza di 40 cicli per minuto. I valori sono la media (in parentesi la deviazione standard SD) di 3-5 misurazioni.

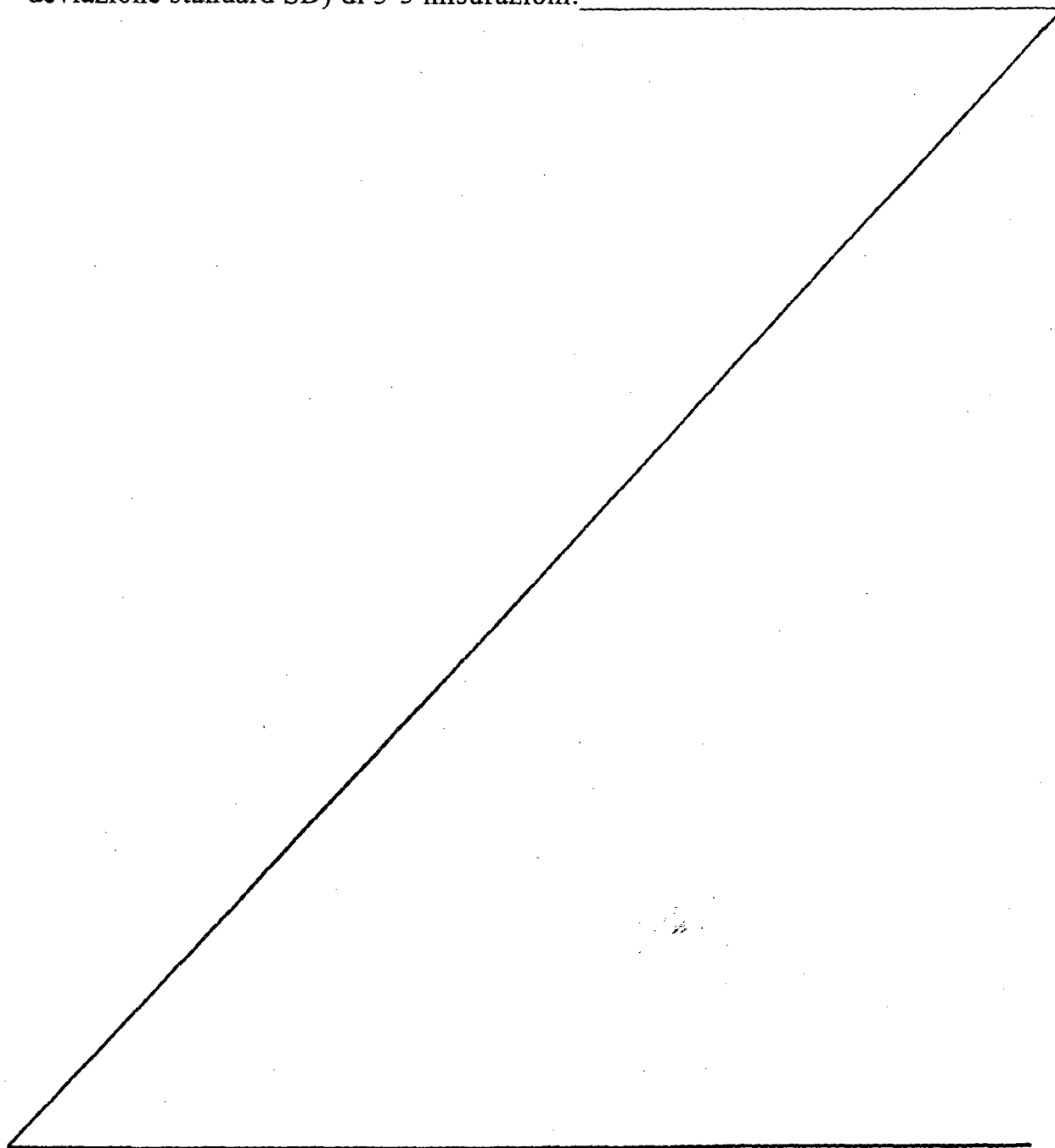


Tabella 2

Preparazioni di surfattante		Tensione superficiale (mN/m)			
SP-C (LKS) (% in peso)	SP-B (% in peso)	Fosfolipidi	7,5 s ----- $\gamma_{\min}$ $\gamma_{\max}$	1 min ----- $\gamma_{\min}$ $\gamma_{\max}$	5 min ----- $\gamma_{\min}$ $\gamma_{\max}$
3	-	DPPC/PG/PA	4(1) 44(2) $\gamma_{\min}$ $\gamma_{\max}$	5(2) 47(2) $\gamma_{\min}$ $\gamma_{\max}$	7(2) 50(1) $\gamma_{\min}$ $\gamma_{\max}$
3	2	DPPC/PG/PA	3(3) 38(3) $\gamma_{\min}$ $\gamma_{\max}$	4(4) 40(2) $\gamma_{\min}$ $\gamma_{\max}$	3(3) 44(2) $\gamma_{\min}$ $\gamma_{\max}$
3	-	DPPC/PG	15(3) 39(4) $\gamma_{\min}$ $\gamma_{\max}$	16(2) 42(3) $\gamma_{\min}$ $\gamma_{\max}$	13(3) 44(3) $\gamma_{\min}$ $\gamma_{\max}$
3	2	DPPC/PG	2(2) 26(3) $\gamma_{\min}$ $\gamma_{\max}$	1(1) 29(3) $\gamma_{\min}$ $\gamma_{\max}$	<1 35(1) $\gamma_{\min}$ $\gamma_{\max}$

St

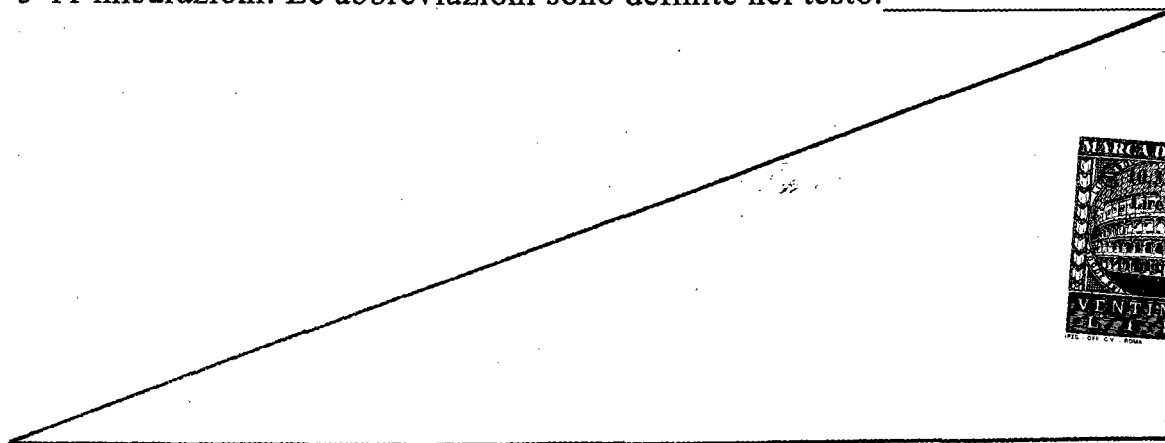
50

Esempio 4**Preparazione di miscele di fosfolipidi con SP-C(LKS) e polimixina B**

DPPC e PG sono stati acquistati da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). I fosfolipidi, sciolti in cloroformio/metanolo 98:2 (v/v) sono stati miscelati nelle proporzioni DPPC/PG 7:3 (p/p). SP-C(LKS) è stato aggiunto alle miscele di fosfolipidi in modo da avere un rapporto totale in peso polipeptide/fosfolipide di 0,03. Le miscele sono state evaporate sotto azoto e risospese a temperatura ambiente in tampone Hepes 10 mmol/l, a pH 6,9, contenente NaCl 140 mmol/l e CaCl₂ 2,0 mmol/l o nello stesso tampone contenente 0,01% di polimixina B (PxB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Le sospensioni sono state ripetutamente congelate e sonicate (50 W, 48 kHz) fino ad omogeneità. La concentrazione fosfolipidica finale per entrambe le preparazioni è stata di 10 mg/ml. L'aggiunta di PxB diminuisce $\gamma_{\max}$ e $\gamma_{\min}$ fino a che si ottiene un'attività di superficie ottimale (Tabella 3).

Tabella 3 - Proprietà tensioattive di miscele di fosfolipidi con SP-C (LKS) e polimixina B

Le registrazioni sono state ottenute a tempi diversi con un surfattometro a bolla pulsante a 37°C e 50% di compressione di superficie, ad una frequenza di 40 cicli per minuto. I valori sono la media (+ deviazione standard SD) di 5-11 misurazioni. Le abbreviazioni sono definite nel testo.



52 21
51

Tabella 3

Preparazioni di surfattante			Tensione superficiale mN/m			
SP-C (LKS) (% in peso)	PxB (% in peso)	Fosfolipidi	7,5 s		1 min	
			$\gamma_{\min}$	$\gamma_{\max}$	$\gamma_{\min}$	$\gamma_{\max}$
3	-	DPPE/PG	15(3)	39(4)	16(2)	42(3)
3	1	DPPE/PG	3(2)	29(3)	2(2)	31(4)
					13(3)	44(3)
					1(1)	34(2)

Handwritten signatures and initials

52

Esempio 5

Caratterizzazione biofisica

Le cinetiche di diffusione superficiale sono state misurate a circa 34°C con una bilancia di Wilhelmy (Biegler, Vienna, Austria). La tensione superficiale è stata monitorata per 10 minuti usando una lamina di platino connessa a un estensimetro e inserita 1 mm in un'ipofase di 20 ml di NaCl 150 mmol/l in un vassoio di teflon. Le sospensioni sono state aggiunte a gocce, in totale 1 mg di lipidi, sull'ipofase, a 4 cm dalla lamina di platino.

Le misure di cinetica di SP-C(LKS) 3% in peso in DPPC/PG, 7:3 (p/p), usando la bilancia di Wilhelmy, hanno mostrato una rapida diffusione con una tensione superficiale di 28 mN/m dopo 3 s (Fig. 2). La diffusione è stata sensibilmente più lenta usando 1% in peso di SP-C(LKS) nella stessa miscela lipidica. L'aggiunta di SP-B 2% in peso non ha cambiato significativamente la velocità di diffusione o la tensione superficiale di equilibrio (Fig. 2). Non si sono osservati miglioramenti dopo incubazione della miscela per 1 ora a 45°C. Risultati simili sono stati ottenuti utilizzando una miscela di DPPC:PG:PA, 68:22:9 (p/p/p).

La tensione superficiale dinamica è stata registrata usando un surfattometro a bolla pulsante (Surfactometer International, Toronto, Canada) a 37°C durante compressione ciclica del 50% della superficie di bolla e a una frequenza di 40 cicli per minuto. Tutte le misure sono state effettuate sino a 5 min a una concentrazione lipidica di 10 mg/ml. Le pressioni sono state misurate a intervalli di tempo determinati e usate per calcolare le tensioni superficiali a grandezza di bolla minima ($\gamma_{\min}$) e massima ($\gamma_{\max}$).

Nel surfattometro a bolla pulsante, dopo 1 minuto, SP-C(LKS) 3% in

peso in DPPC:PG:PA, 68:22:9 (p/p/p) ha fornito un valore di $\gamma_{\min}$ di meno di 1 mN/m mentre con SP-C(LKS) 3% in peso in DPPC:PG, 7:3 (p/p) si è osservato un $\gamma_{\min}$ di 9-14 mN/m (Tabella 1).

La tensione superficiale al raggio di bolla massimo ($\gamma_{\max}$) era di circa 40 mN/m in entrambi i casi. L'aggiunta SP-B 2% in peso ha fornito valori di $\gamma_{\max}$ di 33-31 mN/m e $\gamma_{\min}$ di 0-2 mN/m per entrambe le preparazioni lipidiche. Questi valori sono molto simili a quelli ottenuti con preparazioni surfattanti di origine naturale (19).

L'incubazione delle preparazioni a 45°C per un'ora non aveva effetto significativo sull'attività di superficie (Tabella 1). Diminuendo la quantità di SP-B a 0,5% in peso in SP-C(LKS) 3% in peso in DPPC:PG 7:3 (p/p), $\gamma_{\min}$ tendeva a aumentare anche se i risultati non raggiungevano la significatività statistica (Tabella 1). Contrariamente a SP-B, l'aggiunta del peptide KL₄, descritto in precedenza come analogo di SP-B (14) 2% in peso a SP-C(LKS) 3% in peso in DPPC:PG:PA 68:22:9 (p/p/p) non riduceva $\gamma_{\max}$ che rimaneva relativamente elevata (41-42 mN/m).

Esempio 6

L'effetto della terapia con surfattante sulle proprietà meccaniche di polmoni immaturi è stato valutato in 5 conigli neonati prematuri con un'età gestazionale di 27 giorni. Gli animali sono stati tracheotomizzati alla nascita e due di loro hanno ricevuto, attraverso la cannula tracheale, 2,5 ml/kg di surfattante artificiale contenente DPPC, PG e SP-C(LKS) con o senza polimixina B nelle proporzioni definite in precedenza. La concentrazione fosfolipidica totale del materiale surfattante esogeno era di 40 mg/ml. Un animale che serviva come controllo positivo è stato trattato con la stessa dose

di surfattante naturale modificato disponibile in commercio (Curosurf®), diluito a 40 mg/ml. Un animale è stato trattato con una miscela di DPPC e PG in soluzione fisiologica (stesse concentrazioni) a una dose di 2,5 ml/kg. Un animale è stato mantenuto senza trattamento e serviva come controllo. Tutti gli animali sono stati mantenuti in box pletismografico termoregolato a 37°C e ventilati in parallelo per 60 min con ossigeno al 100% ad una frequenza di 40 atti respiratori/min e con tempo di inspirazione del 50% [Servo Ventilator 900B (Siemens-Elema, Solna, Svezia)]. I volumi tidalici sono stati misurati con un pneumotacografo collegato a ciascuna scatola pletismografica. Gli animali sono stati ventilati con una sequenza standardizzata di pressioni di insufflazione di picco (PIP): 35, 25 e 20 cm H₂O (modificato da Berggren et al. 1985), con o senza una pressione di espirazione terminale positiva (PEEP) di 3 cm H₂O. La compliance toraco-polmonare è stata calcolata come rapporto tra il volume tidalico e la differenza tra la pressione di insufflazione e quella di espirazione [PIP - PEEP] ed espressa come ml/cm H₂O.kg.



In confronto all'animale di controllo non trattato la compliance toraco-polmonare era significativamente aumentata negli animali trattati con il surfattante artificiale, specialmente nell'animale che aveva ricevuto surfattante contenente polimixina B, anche se il miglioramento risultava inferiore a quello ottenuto dopo trattamento con una dose simile di surfattante naturale modificato. Il trattamento con fosfolipidi da soli non aveva effetto sulla compliance (Figura 3).

Breve descrizione delle figure

Fig. 1. Sequenze amminoacidiche e rappresentazione a "ruota elicoidale" di SP-C e suoi analoghi.

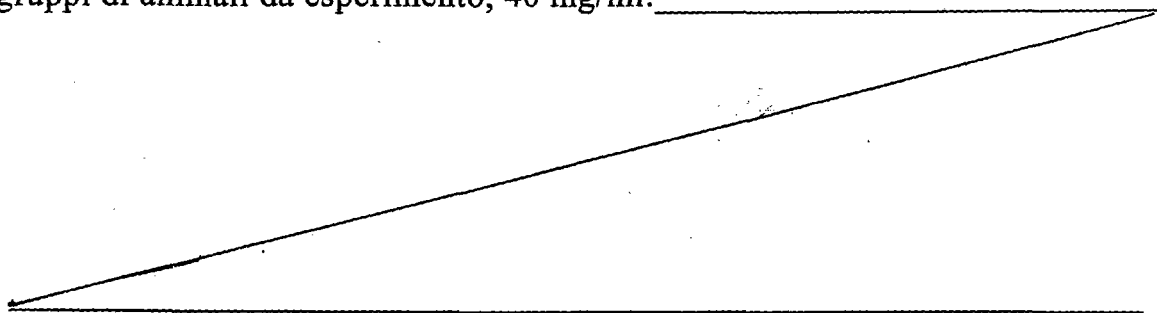
La sequenza di SP-C umana è tratta da (18) e quella di SP-C(Leu) da (12). SP-C(LKS) è basata sulla struttura primaria di SP-C ma tutti i residui Val alle posizioni 16-28 eccetto la posizione 17 vengono sostituiti da residui di Leu; residui di Lys sono stati introdotti alle posizioni 17, 22 e 27; Cys palmitoilate alle posizioni 5 e 6 sono state sostituite con Ser.

Fig. 2. Diffusione superficiale di preparazioni surfattanti sintetiche.

Cinetiche di diffusione dell'SP-C(LKS) 3% in peso (quadri ripieni, linea a puntini), e di 3% in peso SP-C(LKS) con aggiunta di SP-B 2% in peso (triangoli vuoti, linea tratteggiata). Tutte le preparazioni sono state esaminate ad una concentrazione di 10 mg/ml di DPPC/PG, 7:3 (p/p) in NaCl 150 mmol/l. Le registrazioni sono state ottenute con una bilancia di Wilhelmy e ciascun dato è la media di tre registrazioni diverse.

Fig. 3.

Compliance toraco-polmonare in 5 conigli neonati prematuri (età gestazionale di 27 giorni) ventilati con una pressione di insufflazione di picco di 25 cm H₂O. La compliance è significativamente migliorata nell'animale trattato con surfattante naturale modificato (Curosurf) e moderatamente migliorata nei due animali che hanno ricevuto il surfattante artificiale basato su SP-C(LKS). L'aggiunta di polimixina B (PxB) appare aumentare l'effetto del surfattante artificiale. La concentrazione di fosfolipidi è la stessa in tutti i gruppi di animali da esperimento, 40 mg/ml.



RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Fujiwara, T. e Robertson B. (1992) *In*: Robertson, B., van Golde, L.M.G. and Batenburg, B. (eds) *Pulmonary Surfactant: From Molecular Biology to Clinical Practice* Amsterdam, Elsevier, pp. 561-592.
2. Curstedt, T., Jörnvall, H., Robertson, B., Bergman, T. & Berggren, P. (1987) *Eur. J. Biochem.* **168**, 255-262.
3. Takahashi, A., Nemoto, T. e Fujiwara, T. (1994) *Acta Paediatr. Jap.* **36**, 613-618.
4. Johansson, J. e Curstedt, T. (1997) *Eur. J. Biochem.* **244**, 675-693.
5. Curstedt, T., Johansson, J., Persson, P., Eklund, A., Robertson, B., Löwenadler, B. e Jörnvall, H. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 2985-2989.
6. Johansson, J., Curstedt, T. e Jörnvall, H. (1991) *Biochemistry* **30**, 6917-6921.
7. Andersson, M., Curstedt, T., Jörnvall, H. e Johansson, J. (1995) *FEBS Lett.* **362**, 328-332.
8. Johansson, J., Szyperski, T., Curstedt, T. e Wüthrich, K. (1994) *Biochemistry* **33**, 6015-6023.
9. Vandenbussche, G., Clercx, A., Curstedt, T., Johansson, J., Jörnvall, H. e Ruysschaert, J.M. (1992) *Eur. J. Biochem.* **203**, 201-209.
10. Johansson, J., Curstedt, T. e Robertson, B. (1996) *Acta Paediatr.* **85**, 642-646.
11. Johansson, J., Nilsson, G., Strömberg, R., Robertson, B., Jörnvall, H. e Curstedt, T. (1995) *Biochem. J.* **307**, 535-541.
12. Nilsson, G., Gustafsson, M., Vandenbussche, G., Veldhuizen, E.,

58 27
H

Griffiths, W. J., Sjövall, J., Haagsman, H.P., Ruysschaert, J-M., Robertson, B.,
Curstedt, T. e Johansson, J. (1998) Eur. J. Biochem. **255**, 116-124.

13. Kent, S.B.H. (1988) Annu. Rev. Biochem. **57**, 957-989.

14. Cochrane, C.G. e Revak, S.D. (1991) Science **254**, 566-568.

15. Gustafsson, M., Vandenbussche, G., Curstedt, T., Ruysschaert, J.M. e
Johansson, J. (1996) FEBS Lett. **384**, 185-188.

16. Gustafsson, M., Curstedt, T., Jörnvall, H. e Johansson, J. (1997)
Biochem. J. **326**, 799-806.

17. Barrow, C.J., Yasuda, A., Kenny, P.T.M. e Zagorski, M. G. (1992) J.
Mol. Biol. **225**, 1075-1093.

18. Johansson, J., Jörnvall, H., Eklund, A., Christensen, N., Robertson, B. e
Curstedt, T. (1988) FEBS Lett. **232**, 61-64.

19. Robertson, B., Curstedt, T., Johansson, J., Jörnvall, H. e Kobayashi, T.
(1990) Prog. Respir. Res. **25**, 237-246.

20. Robertson, B e Schürch, S (1998) In: Uhlig, S. and Taylor, A.E. (eds)
Methods in Pulmonary Research, Basel, Birkhäuser, pp. 349-383.

21. Takei, T., Hashimoto, Y., Ohtsubo, E., Sakai, K. e Ohkawa, H. (1996)
Biol. Pharm. Bull. **19**, 1550-1555.

22. Revak, S.D., Merritt, T.A., Cochrane, C.G., Heldt, G.P., Alberts, M.S.,
Anderson, D.W. e Kheiter, A. (1996) Pediatr. Res. **39**, 715-724.

23. Schürch, S., Qanbar, R., Bachofen, H. & Possmayer, F. (1995) Biol.
Neonate **67**, 61-76.

24. Leipnisch, E., Andersson, M., Ruysschaert, J-M. e Otting, G. (1997)
Nature Struct. Biol. **4**, 793-795.

25. Tanaka, Y., Takei, T., Aiba, T., Masuda, K., Kiuchi, A. e Fujiwara, T.

28
59

(1986) J. Lipid Res. 27, 475-485.

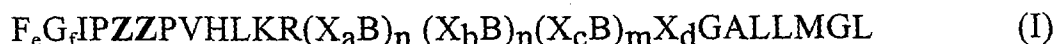
26. Berggren P., Curstedt T., Grossmann G., Nilsson R., Robertson B:
Physiological activity of pulmonary surfactant with low protein content; effect
of enrichment with synthetic phospholipids. Exp. Lung Res 8:29-51, 1985.



876
29
59
60

RIVENDICAZIONI

1. Analoghi di SP-C di formula generale (I), secondo il codice amminoacidico ad una lettera:



in cui:

X è un amminoacido scelto dal gruppo comprendente V, I, L, Nle (norleucina);

B è un amminoacido scelto dal gruppo comprendente Ornitina, K, I, W, F, Y, Q, N;

Z è un amminoacido scelto dal gruppo comprendente S, C, F o residui di S o C sostituiti con gruppi acilici contenenti 12-22 atomi di carbonio legati alla catena laterale rispettivamente attraverso legami estere o tio-estere;

a è un numero intero da 1 a 19;

b è un numero intero da 1 a 19;

c è un numero intero da 1 a 21;

d è un numero intero da 0 a 20;

e è 0 o 1;

f è 0 o 1;

n è 0 o 1;

m è 0 o 1,

con le condizioni:

- $n+m > 0$;

- $f \geq e$;

- $(X_a B)_n (X_b B)_n (X_c B)_m X_d$ è una sequenza avente in totale 22 amminoacidi,

60
30
61

preferibilmente da 10 a 22.

2. Analoghi di SP-C secondo la rivendicazione 1, di formula (Ia):

(Ia) FGIPSSPVHLKRX₄BX₄BX₄BXGALLMGL.

3. Analoghi di SP-C secondo la rivendicazione 1, di formula (Ib):

(Ib) FGIPSSPVHLKRX₅BX₅BX₄GALLMGL.

4. Analoghi di SP-C secondo la rivendicazione 1, di formula (Ic):

(Ic) FGIPSSPVHLKRX₄BX₁₁GALLMGL.

5. Analoghi di SP-C secondo la rivendicazione 1, di formula (Id):

(Id) FGIPSSPVHLKRX₈BX₇GALLMGL.

6. Analoghi di SP-C secondo la rivendicazione 1, di formula (Ie):

(Ie) FGIPSSPVHLKRX₁₁BX₄GALLMGL.

7. Analoghi di SP-C secondo le rivendicazioni 1-6 in cui la serina è acilata, preferibilmente con palmitoile.

8. Analoghi di SP-C secondo le rivendicazioni 1-7, in cui B è lisina e X è leucina, isoleucina o norleucina.

9. Analoghi di SP-C secondo la rivendicazione 8, scelti dal gruppo che comprende:

FGIPSSPVHLKRLILKLLLLKILLKLGALLMGL [SP-C (LKS)]

FGIPSSPVHLKRLILKLLLLIKLLILGALLMGL [SP-C (LKS)1]

FGIPSSPVHLKRLILKLLLLILLLILGALLMGL [SP-C (LKS)2]

FGIPSSPVHLKRLILLLLLKLILLILGALLMGL [SP-C (LKS)3]

FGIPSSPVHLKRLILLLLLLIKLLILGALLMGL [SP-C (LKS)4]

in cui S è eventualmente acilata, preferibilmente con palmitoile.

10. Surfattante sintetico che comprende almeno un analogo di SP-C di formula (I) in miscela con lipidi e fosfolipidi.

61 81 62

11. Sulfattante sintetico secondo la rivendicazione 10, in cui la miscela lipidi/fosfolipidi comprende DPPC, PG, PA.

12. Sulfattante sintetico secondo le rivendicazioni 10-11, che inoltre comprende SP-B o un suo analogo attivo, o una polimixina.

13. Sulfattante sintetico secondo le rivendicazioni 10-12, in forma di soluzione, dispersione, sospensione o polvere essiccata.

14. Uso di analoghi di SP-C delle rivendicazioni 1-7 per la preparazione di un surfattante artificiale da impiegare in terapia in tutti i casi di carenza o disfunzione del surfattante polmonare.

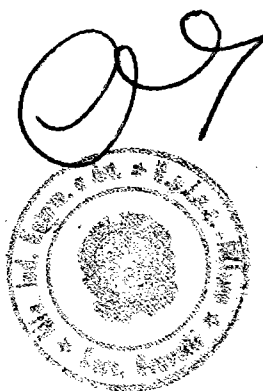
15. Uso di una polimixina e preferibilmente polimixina B per la preparazione di un surfattante artificiale come rivendicato nelle rivendicazioni 10-13, da impiegare in terapia in tutti i casi di carenza o disfunzione del surfattante polmonare.

16. Uso secondo le rivendicazioni 14 e 15, nella sindrome da distress respiratorio.

Milano, 12 febbraio 1999

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.

Paolo Banfi

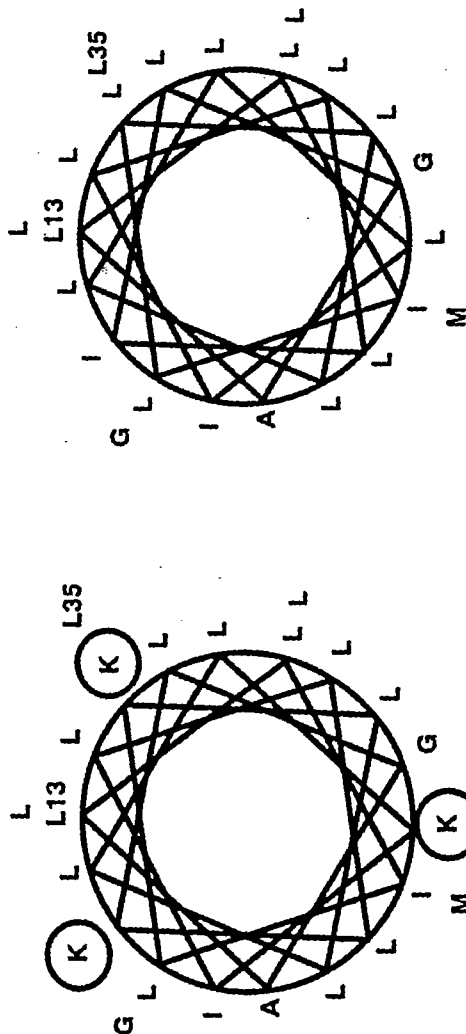


63
12 BT

Figura 1

MI 99 A 000275

SP-C umano
 FGIPCCPVHLKRLLIIVVVVLIIVVIVGALLMGL
 SP-C (Leu)
 ---SS--△---LLLLL---LLL-L---
 SP-C (LKS)
 ---SS---LKL₁LLK₂---LLLKL---



SP-C (Leu)

SP-C (LKS)



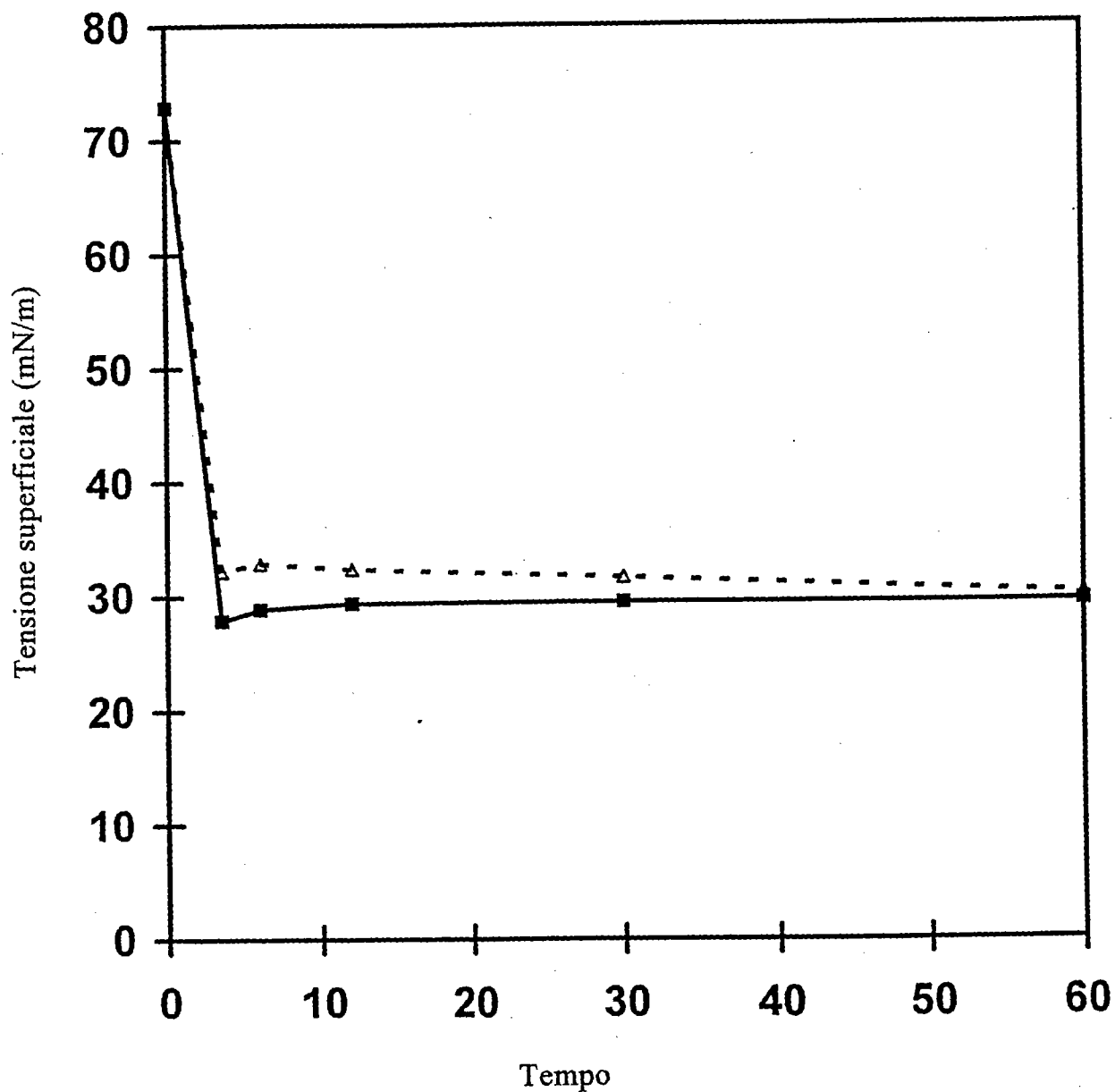
Il Mandatario
 (Banfi Paolo)
 di Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.

Handwritten signature of Paolo Banfi

64 96
83
63

MI 99 A 000275

Figura 2

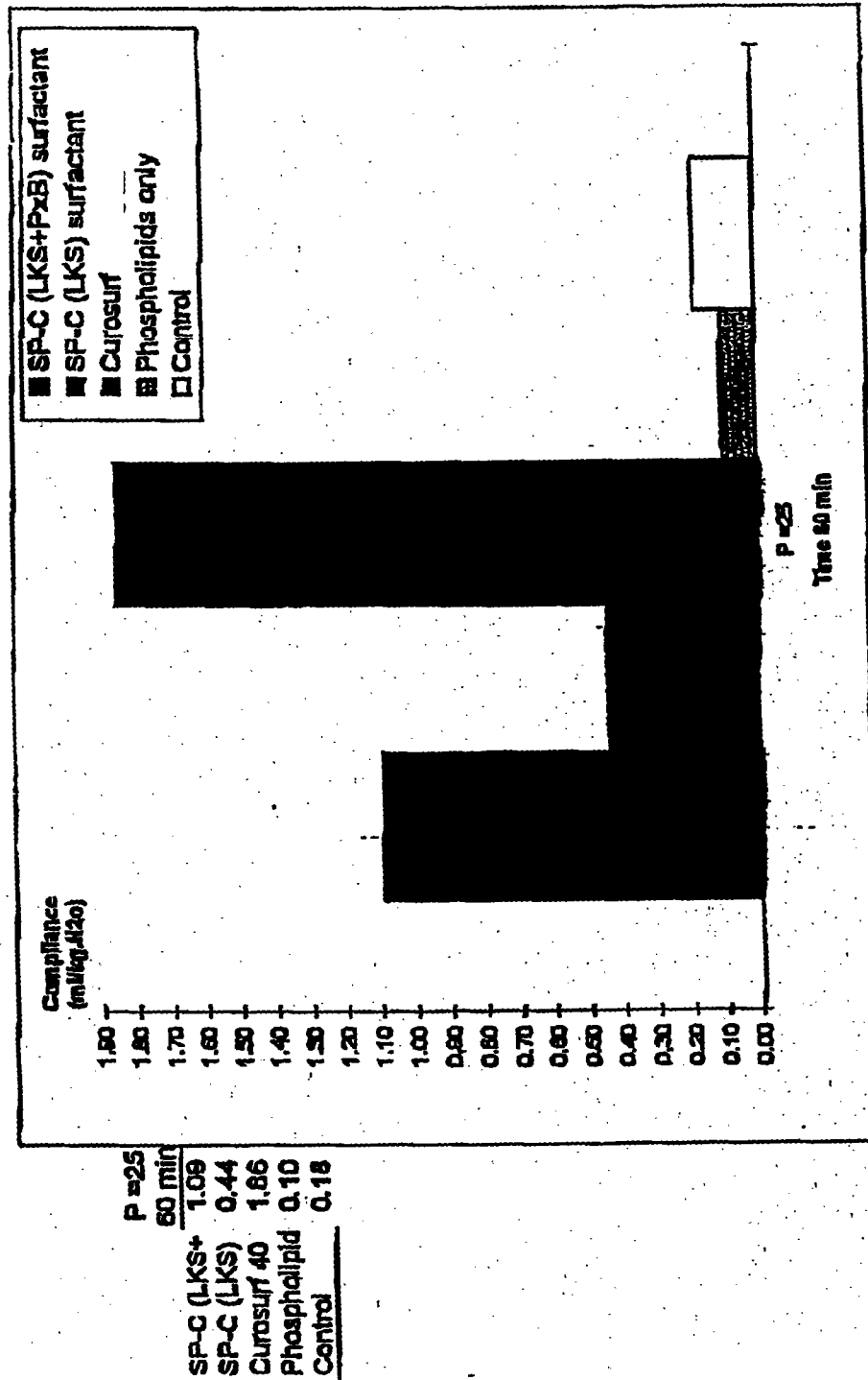


Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.

65 34
64 34

MI 99 A 000275

Figura 3



Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.

Paolo

MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
Ufficio Provinciale Industria Commercio e Artigianato di Milano
Reparto Brevetti

66 98
65 75



Documenti a seguito di riserve - Reg. R

Data Consegna	Protocollo riserva	Richiedente
2 aprile 1999	BREV. MI - R 000982	CHIESI FARMACEUTICI S.p.A. Parma
Rappresentante del Richiedente Bianchetti Giuseppe Bracco Mauro Bianchetti Marina Minoja Fabrizio Vergani Maria Fiorella Banfi Paolo Ferreccio Rinaldo		
Rif. N° domanda		data presentazione della domanda
MI99A 000275		12 febbraio 1999
invenzione: ☒		
modello: ☐		
marchio: ☐		
Oggetto del seguito		
1 Lettera Incarico;		
2 Designazione Inventore;		
3 No. 2 copie del Prospetto A;		
4 No. 2 copie dei disegni formali.		
Il depositante		L'ufficiale rogante

ATTO DI DESIGNAZIONE DEGLI INVENTORI



I sottoscritti Signori Bianchetti Giuseppe ed altri di Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l. (vedi lettera d'incarico), Via Rossini, 8 - Milano, mandatari della Società **CHIESI FARMACEUTICI S.p.A.** con sede in Parma,

dichiarano



che gli inventori della domanda di brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

"Peptidi sintetici aventi la capacità di diminuire la tensione superficiale e loro impiego nella preparazione di un surfattante artificiale"

depositata in data 12 febbraio 1999 al No. MI99A 000275

sono i Signori: 1. **Curstedt Tore**
2. **Johansson Jan**
3. **Jörnvall Hans**
4. **Robertson Bengt**
5. **Ventura Paolo**

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l.

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE: 0,47 =
YDERECHOS FONDO ROTATORIO: 0,415 =

N° 396

EL CONSULADO DE COLOMBIA
EN ROMA-ITALIA

Previa la confrontación correspondiente DA
FE de que la firma que aparece en este
documento es similar a la REGISTRADA
aquí por DI CARLO-CHA
CCIO BREUETTI E MARCHI.
ARTIGIANATO

CARLOS G. LA ROTTA LA ROTTA
CONSUL GENERAL


MINISTERIO DE INDUSTRIA, COMERCIO Y ARTESANIA

DIRECCION GENERAL DE LA PRODUCCION INDUSTRIAL

OFICINA CENTRAL DE PATENTES

Sello del Ministerio de Industria, Comercio y Artesanía
D.G.P.I. - Oficina Central de Patentes
División Patentes y Marcas - Sellos de £. 20.000.=

Autenticación de copia de documentos relativos a la solicitud de patente para **INVENCION INDUSTRIAL N. MI99 A 000275**

Se declara que la copia adjunta es conforme a los documentos originales depositados con la solicitud de patente indicada arriba, cuyos datos resultan del adjunto acta de depósito, y además: actas de Upica de Milán, n°. MIR000982 de 02/04/1999 (1 página) y Acta de Designación de Inventores (1 página).

Roma, 10 de febrero de 2000

EL SUSTITUTO
EL DIRECTOR DE LA DIVISION
Ing. DI CARLO
(firma)

Cinta blanca, roja y verde y sello del
Ministerio de Industria Comercio y
Artesanía - Oficina Central de Patentes

70 \$
68 39

AL MINISTERIO DE INDUSTRIA COMERCIO Y ARTESANIA
MODULO A
OFICINA CENTRAL DE PATENTES - ROMA

SOLICITUD DE PATENTE PARA MARCA DE EMPRESA, DEPOSITO DE RESERVAS,
ACCESIBILIDAD ADELANTADA AL PUBLICO

A. SOLICITANTE (I)

N.J. SP

1) Denominación **CHIESI FARMACEUTICI S.p.A.**

Residencia **Parma** código **01513360345**

2) Denominación

Residencia código

B. APPLICANT'S REPRESENTATIVE AT THE CENTRAL PATENT OFFICE

SURNAME, NAME: **BIANCHETTI, Giuseppe et al** FISCAL CODE:

NAME OF THE OFFICE: **BIANCHETTI BRACCO MINOJA S.r.l.**

STREET: **Rossini N. 8** TOWN: **MILAN** ZIP CODE: **20122** PROV. **MI**

C. DOMICILIO ELECTIVO DESTINATARIO

calle N. ciudad cód. post. prov.

D. TITULO clase propuesta **C07K** grupo/subgrupo **7/00**
(secc. cl/scl).

**"PEPTIDOS SINTETICOS QUE TIENEN LA CAPACIDAD DE DISMINUIR LA
TENSION SUPERFICIAL Y EL USO DE LOS MISMOS EN LA PREPARACION DE
UN TENSIOACTIVO ARTIFICIAL"**

ACCESIBILIDAD ADELANTADA AL PUBLICO SI NO X

Si hay instancia fecha N. protocolo

E. INVENTORES DESIGNADOS Apellido y nombre

1) 3)

2) 4)

F. PRIORIDAD

nación u tipo de número de fecha de anexo/
organización prioridad solicitud depósito S/R

1)

71 93
89 20

2)

DISOLUCION DE RESERVAS

Fecha N. Protocolo

Fecha N. Protocolo

G. CENTRO CAPACITADO DE RECOLECCION DE CULTIVOS Y MICROORGANISMOS, denominación

H. NOTAS ESPECIALES

Sello de £. 15.000.- y estampilla del
Ministerio de Industria, Comercio y Artesanía - D.G.P.I. - Oficina Central Patentes

DOCUMENTACION ADJUNTA

N. ej.

Doc. 1) 02 PROV. n. pag 28 resumen con dibujo principal, descripción y reivindicaciones (obligatorio 1 ejemplar, si citado en la descripción)

Doc. 2) 02 PROV. n. tab. 03 dibujo (obligatorio si mencionado en la descripción, 2 ejemplares)

Doc. 3) 1 RES. poder, xxxxxxxxxx

Doc. 4) 0 RES. designación de inventor

Doc. 5) 0 RES. documentos de prioridad con traducción al italiano

Doc. 6) 0 RES. autorización o acta de cesión

Doc. 7) 0 nombre completo del solicitante

DISOLUCION DE RESERVAS

Fecha N. protocolo

Fecha N. protocolo

Comparación prioridades individuales

8) comprobantes de pago, total liras Quinientas sesenta y cinco mil = obligatorio

CUMPLIMENTADO EL 02/12/1999

FIRMA DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S) Banfi Paolo
(firma)

CONTINUA SI/NO NO

DEL PRESENTE ACTA SE SOLICITA COPIA AUTENTICA SI/NO SI
OFICINA PROVINCIAL IND. COM. ART. DE MILAN código 15

76 94
20 XI

ACTA DE DEPOSITO NUMERO DE SOLICITUD MI99A 000275 Reg. A
El año milnovecientos NOVENTA Y NUEVE, el día DOCE del mes de.. FEBRERO

el(los) solicitante(s) arriba mencionado(s) presentó(presentaron) a mi, el abajo firmante, la presente solicitud complementada de n. 00 hojas adicionales para la concesión de la patente mencionada arriba.

I. NOTAS DEL OFICIAL OTORGANTE

EL DEPOSITADOR
Biglia Michele (firma)

EL OFICIAL OTORGANTE
M.CORTONESI (firma)

Sello del Ministerio de
Industria Comercio y
Artesanía, U.p.i.c.a.
Milán -

Serv.

Patentes

43 95
71 42

IMPRESO A

RESUMEN INVENCIÓN CON DIBUJO PRINCIPAL, DESCRIPCIÓN Y REIVINDICACIÓN

NÚMERO SOLICITUD MI99A 000275 Reg.B FECHA DEPÓSITO 12/02/1999

NÚMERO PATENTE FECHA DEPÓSITO

D. TÍTULO

“PEPTIDOS SINTÉTICOS QUE TIENEN LA CAPACIDAD DE DISMINUIR LA TENSION SUPERFICIAL Y EL USO DE LOS MISMOS EN LA PREPARACION DE UN TENSIOACTIVO ARTIFICIAL”

L. RESUMEN

Se describen péptidos artificiales que tienen actividad tensioactiva, análogos de la SP-C del surfactante pulmonar, y su uso en el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (RDS) y otras enfermedades relacionadas a deficiencia o disfunción de tensioactivo.

M. DIBUJO

Descripción de la invención industrial de título:

“PEPTIDOS SINTETICOS QUE TIENEN LA CAPACIDAD DE DISMINUIR LA TENSION SUPERFICIAL Y EL USO DE LOS MISMOS EN LA PREPARACION DE UN TENSIOACTIVO ARTIFICIAL”

en nombre: **CHIESI FARMACEUTICI S.p.A.**

con sede en: Parma

* * *

La presente invención proporciona nuevos péptidos artificiales que tienen actividad tensioactiva. En particular, la invención proporciona análogos de la proteína SP-C del tensioactivo, los cuales, una vez combinados con lípidos apropiados, son particularmente efectivos para reducir la tensión superficial en la interfase aire-líquido.

Así, los péptidos de la invención se pueden usar en combinación con lípidos, y en forma opcional en combinación con la proteína SP-B o análogos activos o con polimixinas, para preparar tensioactivos artificiales útiles en el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (RDS) y de otras enfermedades asociadas a disfunciones del tensioactivo pulmonar.

Antecedentes de la Invención

El tensioactivo pulmonar reduce la tensión superficial en la interfase aire-líquido de la pared interna de los alvéolos, previniendo que los pulmones colapsen al final de la expiración. La deficiencia de tensioactivo es un desorden común en los infantes prematuros y representa el origen de una patología llamada RDS, la cual puede ser tratada en forma efectiva con tensioactivos naturales extraídos de pulmones de animales (1). Los principales componentes de estas preparaciones son fosfolípidos tales como 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPCC), fosfatidilglicerol (PG) y las proteínas hidrofóbicas del

fosfocolina (DPCC), fosfatidilglicerol (PG) y las proteínas hidrofóbicas del tensioactivo B y C (SP-B y SP-C). Las proteínas hidrofílicas del tensioactivo SP-A y SP-D, las cuales son lectinas colagenosas tipo C (dependientes del Ca^{2+}) que se piensa que actúan en el sistema de defensa huésped, no están incluidas normalmente en las preparaciones tensioactivas debido a los procedimientos de extracción con solventes orgánicos empleados.

Las SP-B y SP-C constituyen solo aproximadamente del 1 al 2 % en peso del tensioactivo, pero aún así son capaces de ejercer una mejora dramática sobre la actividad superficial, comparada a las preparaciones con lípidos puros (2,3). Se han determinado las estructuras primaria y secundaria de las SP-B y SP-C y una estructura terciaria de la SP-C en solución (4). La SP-B está compuesta de dos cadenas de polipéptido idénticas de 79 aminoácidos, conectadas por un puente intercadenas del tipo disulfuro (5,6). Cada cadena monomérica tiene tres puentes disulfuro intracadena y por lo menos cuatro espirales anfipáticas que exhiben una cara polar y una cara no polar a través de las cuales la SP-B puede interactuar con dos bicapas lipídicas trayéndolas a una proximidad cercana (7). La SP-C es una lipoproteína compuesta de 35 residuos de aminoácidos con un dominio de hélices α entre los residuos 9-34 (8). La hélice está mayormente compuesta de residuos de valilo y está incrustada en la bicapa lipídica y orientada en paralelo con las cadenas acilo lipídicas (9). Dos grupos palmitoílo están unidos en modo covalente a residuos de cisteína en posiciones 5 y 6 en el extremo N-terminal del péptido (5). Los dos residuos cargados positivamente, arginina y lisina, en las posiciones 11 y 12, posiblemente interactúan con los grupos principales con carga negativa de la membrana lipídica aumentando así su rigidez. La rigidez

de la interacción lípido-péptido se puede disminuir hacia el extremo C-terminal, ya que éste contiene grupos pequeños o no polares, haciendo esta parte potencialmente más móvil en una bicapa de fosfolípido. Se piensa que la SP-C tiene influencia sobre el espesor y fluidez de los lípidos de los alrededores vía la extremadamente estable hélice de polivalilo (4)

Estado de la técnica

Debido a que las preparaciones tensioactivas obtenidas de los tejidos animales presentan algunas desventajas, como su disponibilidad en cantidades limitadas y la posibilidad de que contengan agentes infecciosos e induzcan reacciones inmunológicas, se han hecho intentos para crear tensioactivos artificiales (4, 10), usualmente a partir de lípidos sintéticos y proteínas hidrofóbicas.

Los trabajos previos han demostrado que la SP-C sintética con dificultad se pliega como el péptido nativo en una conformación α -helicoidal necesaria para una óptima actividad tensioactiva (11).

En consecuencia, los análogos sintéticos de la SP-C no se pliegan como el péptido nativo y no interactúan en forma apropiada con los lípidos tensioactivos. Para sortear este problema se han hecho muchos intentos para modificar la secuencia, por ejemplo, reemplazando todos los residuos helicoidales de Val en la SP-C nativa con Leu, el cual favorece fuertemente la conformación α -helicoidal. El análogo trans-membrana correspondiente, SP-C(Leu), mostró una excelente dispersión en la interfase aire-líquido cuando se combina con DPPC:PG:ácido palmítico PA (68:22:9) (p/p/p). Sin embargo, el máximo valor de tensión superficial durante la compresión cíclica de la superficie ($\gamma_{\max}$) fue significativamente mayor que el del tensioactivo nativo.

Además no fue posible preparar mezclas lípido-péptido de mayores concentraciones que aproximadamente 20 mg/ml, probablemente debido a la formación de oligómeros del péptido (12). Otros autores han sintetizado análogos de SP-C constituidos por polileucinad de diferentes longitudes. En estos estudios no se informaron problemas de auto oligomerización ni problemas en la producción de muestras de alta concentración de lípidos.

Diferentes publicaciones tratan el problema de sintetizar análogos peptídicos de los péptidos tensioactivos naturales dando una cantidad de soluciones diferentes. Entre esas publicaciones, las WO93/21225, la EP 0 733 645, y la WO/96 17872, a nombre de Tokyo Tanabe, revelan péptidos análogos de la SP-C natural, los cuales difieren en general del péptido nativo en relación a la secuencia N-terminal.

Las Solicitudes de Patente del Scripps Research Institute WO89/06657 y WO92/22315 revelan análogos de la SP-B que tienen residuos de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos alternados.

Clercx, A. et al. eur. J. Biochem **229**, 465-72, 1995, revela péptidos de diferentes longitudes que corresponden al N-terminal de la SP-C porcina y péptidos híbridos derivados de la SP-C porcina y bacteriorhodopsina.

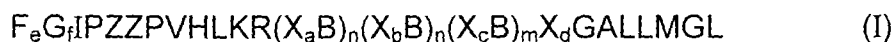
Johansson, J. et al. Biochem.J. **307**, 535-541, 1995, revelan péptidos sintéticos que difieren de la SP-C porcina nativa por la sustitución de algunos aminoácidos.

La WO89/04326 a nombre de California Biotechnology - Byk Gulden, y la WO91/18015 a nombre de California Biotechnology - Scios Nova, revelan análogos de la SP-C que contienen una secuencia N-terminal inicial en la cual los dos Cys de la SP-C natural son reemplazados por dos Ser.

Descripción de la invención

Ahora se ha encontrado que reemplazando residuos de aminoácidos neutros con residuos voluminosos o polares, residuos de Val con otros residuos neutros e hidrofóbicos, residuos de Cys con Ser, se obtiene un análogo de SP-C con propiedades particularmente favorables para la reducción de la tensión superficial.

La invención proporciona análogos de SP-C que tienen la fórmula general (I), usando el código de aminoácidos de una letra:



en la cual:

X es un aminoácido seleccionado a partir del grupo formado por V, I, L, Nle (norleucina);

B es un aminoácido seleccionado a partir del grupo formado por ornitina, K, I, W, F, Y, Q, N;

Z es un aminoácido seleccionado a partir del grupo formado por S, C, F o residuos de S o C sustituidos con grupos acilo que contienen de 12 a 22 átomos de carbono unidos a la cadena lateral respectivamente a través de enlaces éster o tioéster;

a es un entero de 1 a 19

b es un entero de 1 a 19

c es un entero de 1 a 21

d es un entero de 0 a 20

e es 0 o 1

f es 0 o 1

n es 0 o 1

74 107
H) 48

m es 0 o 1

con las condiciones :

$n + m > 0$,

$f \geq e$

$(X_aB)_n(X_bB)_n(X_cB)_mX_d$ es una secuencia que tiene un total de 22 aminoácidos, preferiblemente de 10 a 22.

Los péptidos preferidos de la Fórmula (I) tienen las siguientes secuencias:

(Ia) FGIPSSPVHLKRX₄BX₄BX₄BXGALLMGL

(Ib) FGIPSSPVHLKRX₅BX₅BX₄GALLMGL

(Ic) FGIPSSPVHLKRX₄BX₁₁GALLMGL

(Id) FGIPSSPVHLKRX₈BX₇GALLMGL

(Ie) FGIPSSPVHLKRX₁₁BX₄GALLMGL

donde la serina se puede opcionalmente acilar, por ejemplo con palmitoílo.

Entre las secuencias (Ia) - (Ie), aquellas que tienen $B = K$ y $F = L, I$ o Nle son las preferidas.

De acuerdo con las realizaciones preferidas, los péptidos de la fórmula (Ia) - (Ie) tienen respectivamente las siguientes secuencias:

FGIPSSPVHLKRLILKLLLLKILLLKLGALLMGL [SP-C (LKS)]

FGIPSSPVHLKRLILKLLLLIKLLILGALLMGL [SP-C (LKS)₁]

FGIPSSPVHLKRLILKLLLLLILLLILGALLMGL [SP-C (LKS)₂]

FGIPSSPVHLKRLILLLLLLKLILLLILGALLMGL [SP-C (LKS)₃]

FGIPSSPVHLKRLILLLLLLLIKLLILGALLMGL [SP-C (LKS)₄]

FGIPSSPVHLKRLILFLLLLFILLFLGALLMGL [SP-C (LFS)]

donde la serina se puede opcionalmente acilar, por ejemplo con palmitoílo.

80 100
28 49

Los péptidos de la fórmula (I) se pueden preparar por métodos convencionales de síntesis peptídicas.

Estas técnicas están descritas en, por ejemplo, Schroeder et al., "The peptides", vol 1, Academic press, 1965; Bodzanszky et al., "Peptide synthesis", Interscience Publisher, 1996; Baramy & Merrifield, "The peptides; Analysis, Synthesis, Biology", vol 2, chapter 1, Academic Press, 1980, e incluyen síntesis de péptidos en fase sólida, en solución, métodos de síntesis de química orgánica, o cualquier combinación de los mismos.

Los péptidos acilados son preferiblemente sintetizados por tratamiento de los péptidos con cloruro de acilo en ácido trifluoroacético puro, durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego la reacción se para por agregación de etanol acuoso al 80% (E. Salakdeh-Yousefi, J. Johansson and R. Strömberg, en curso de publicación).

Los péptidos de la invención se pueden ventajosamente preparar también con técnicas de biotecnología.

Después de síntesis y purificación, los péptidos sintéticos se caracterizan, desde el punto de vista bioquímico y biofísico, como informado a continuación.

La actividad de los péptidos de la invención en la reducción de la tensión superficial ha sido evaluada en combinación con lípidos y fosfolípidos, SP-B, análogos de la SP-B, o polimixinas. En particular, los péptidos han sido combinados con DPPC/PG/PA con o sin SP-B, análogos activos de SP-B o polimixinas.

Los resultados de los ensayos de actividad superficial de burbuja pulsante muestran claramente que los péptidos sintéticos de acuerdo con la

presente invención disminuyen fuertemente la tensión mínima y máxima durante la compresión cíclica de superficie ($\gamma_{\min}$ y $\gamma_{\max}$) hasta valores comparables con aquellos obtenidos usando tensioactivos que se obtienen de fuentes naturales.

La adición de SP-B o polimixina B a la mezcla de péptido/lípido y/o fosfolípidos dio resultados particularmente favorables.

Un segundo aspecto de la invención se refiere al uso en un tensioactivo artificial de polimixinas, en particular la polimixina B, como análogos de la SP-B, junto con uno o más péptidos de la fórmula (I), lípidos y/o fosfolípidos. Los lípidos/fosfolípidos apropiados se pueden seleccionar a partir del grupo formado por DPPC, PG, PA, triacilglicerolos, esfingomielina.

El tensioactivos se puede preparar mezclando soluciones o suspensiones de péptidos y lípidos y a continuación secando la mezcla. En el momento necesario, la mezcla seca puede ser suspendida, dispersada o administrada como tal a sujetos con necesidad de tratamiento por deficiencia de tensioactivo.

Si la administración es en forma de aerosol, será necesario combinar pequeñas partículas de tensioactivo con un propelente inerte adecuado. Otras formas de administración, como la nebulización o rociado de soluciones/suspensiones estables de tensioactivo, también están incluidas dentro del alcance de la invención.

De acuerdo a otro aspecto, la invención proporciona el uso de los péptidos descriptos y/o de las polimixinas B para la preparación de un agente tensioactivo para usar en todos los casos de deficiencia o disfunción de tensioactivo. Típicamente el tensioactivo será usado preferiblemente en el

SP 104
80 \$1

tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria el cual afecta de modo frecuente a los infantes prematuros.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención en mayor detalle.

Ejemplo 1:

Síntesis y purificación del péptido

Un análogo de la SP-C, la SP-C(LKS) (Fig.1), fue sintetizado a partir de los correspondientes *tert*butiloxicarbonilderivados (13) usando la tecnología de fase sólida por pasos en un aparato Applied Biosystems 430A. La ruptura de la unión resina-péptido y la desprotección de las cadenas laterales se llevaron a cabo en fluoruro de hidrógeno anhidro/metoxibenceno/dimetilsulfuro, 10:1:1 (v/v/v) por 1,5 h a 0 °C. Los grupos protectores y secuestrantes (bases para neutralizar el ácido fluorhídrico) fueron removidos por extracción repetida con dietil éter y el péptido fue extraído de la resina en forma subsiguiente con diclorometano/ácido trifluoroacético (TFA) 3:1 (v/v) seguido por evaporación rotativa al vacío. El extracto del péptido crudo se re-disolvió a una concentración de 100 mg/ml en cloroformo/metanol 1:1 (v/v) que contenía 5% de agua. Una alícuota de 10 mg se aplicó a una columna Sephadex LH-60 (40 x 1 cm) en el mismo solvente (2). Se recolectaron fracciones de 2,5 ml y se midieron las absorbancias a 214 y 280 nm. La identificación y cuantificación se realizaron por análisis de aminoácidos.

Para la acilación, el péptido purificado (típicamente aproximadamente 5 mg) se seca y se disuelve en TFA destilado (100 µl) y se agrega el cloruro de acilo (10 a 20 equivalentes en comparación al péptido). Luego de 10 minutos la reacción se apaga con etanol acuoso al 80% (1,9 ml). La purificación de los

acil péptidos se realiza usando cromatografía sobre Lipidex 5000 en cloruro de etileno/metanol 1:4 (v/v) seguida por purificación sobre columna HPLC de fase invertida C18 usando un gradiente lineal de 2-propanol/0,1% TFA corriendo en metanol (acuoso) 60%/0,1% TFA o etanol (acuoso) 75%/0,1% TFA.

Ejemplo 2:

Caracterización Bioquímica

La pureza del péptido se confirmó por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) dodecil sulfato de sodio (SDS) (Phast-system, Pharmacia, Suecia) y por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase invertida, usando una columna C18 y un gradiente lineal de metanol acuoso 60% / 0,1% TFA e isopropanol / 0,1% TFA (16).

Las masas moleculares se determinaron por espectrometría de masa por desorción ionización láser asistido por matriz - tiempo de vuelo (MALDI-TOF) (Lasermat 2000, Finnigan MAT) calibrado con péptido vasoactivo intestinal (M_r 3326,8).

La estructura secundaria del péptido se investigó usando espectroscopía por dicroísmo circular (CD) Jasco-720 (Jasco, Japan). Luego de la solubilización con trifluoroetanol (TFE) se registraron los espectros de 260 a 184 nm con una velocidad de barrido de 20 nm/min y una resolución de 2 puntos por nm. Se calculó la elipticidad molar residual y se expresó en kdeg x cm^2/dmol . Las elipticidades molares a 208 y 222 nm se utilizaron para estimar el contenido de estructura helicoidal (17).

Las investigaciones sobre la estructura secundaria de la SP-C(LKS) usando espectroscopía CD mostraron un espectro típico de péptidos α -helicoidales y se estimó un contenido de aproximadamente 75% a partir de los

mínimos a 208 y 222 nm. La estructura secundaria permaneció estable luego de la dilución a pasos con agua hasta un 12% TFE con la condición de que el péptido fuera solubilizado en TFE puro.

El SDS-PAGE de la SP-C(LKS) mostró una banda única similar a la de la SP-C nativa, mientras que la SP-C(Leu), la cual no tiene Lys en la parte helicoidal, forma oligómeros. En contraste a nuestra experiencia con mezclas SP-C(Leu)/lípidos, las cuales son difíciles de solubilizar en concentraciones mayores de 20 mg/ml (12), se pudo realizar una mezcla SP-C(LKS)/lípidos con una concentración de lípidos de 80 mg/ml y una relación polipéptido/lípidos de 0,03.

Ejemplo 3:

Preparación de mezclas péptido/lípidos

El DPPC, PG y PA fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis MO). Los lípidos, disueltos en cloroformo/metanol 98:2 (v/v), se mezclaron en las proporciones DPPC:PG:PA de 68:22:9 (p/p/p) o DPPC:PG de 7:3 (p/p). Las preparaciones de los tensioactivos se realizaron agregando SP-C(LKS) solo o SP-C(LKS) y SP-B a cada una de las mezclas de lípidos, a una relación en peso de péptido total/lípidos de 0-0,05. Las mezclas se evaporaron bajo nitrógeno y fueron suspendidas nuevamente en NaCl 150 mmol/l o en 10 mmol/l de regulador de pH Hepes 10 mmol/l de pH 6,9 que contiene 140 mmol/l de NaCl 140mmol/l y 2,0 mmol/l de CaCl_2 , para obtener una concentración de lípidos de 10-80 mg/ml. Se realizaron congelamientos y sonicaciones repetidas veces (50 W, 48 kHz) hasta alcanzar suspensiones homogéneas. En algunos casos las suspensiones finales se incubaron a 45 °C por 1 hora.

Las preparaciones de tensioactivos suspendidas en NaCl 150 mmol/l tienen un pH de 3,5 - 5,5. Los menores valores de pH, 3,5 a 4,5, se observaron en las preparaciones que contienen SP-B. Como el SP-B nativo se purifica usando solventes orgánicos acidificados (2), en las preparaciones pueden permanecer pequeñas cantidades de ácido. Se obtuvo un pH cercano al fisiológico suspendiendo la preparación tensioactiva en regulador de pH Hepes de pH 6,9, que contiene 140 mmol/l de NaCl y 2 mmol/l de CaCl_2 . Comparando con las preparaciones correspondientes en solución salina no regulada no hubo cambios en $\gamma_{\min}$ o $\gamma_{\max}$ cuando se usó DPPC/PG 7:3 (p/p) como mezcla de lípidos. Sin embargo, cuando se incluyó el PA en la mezcla de lípidos, ambos, $\gamma_{\min}$ o $\gamma_{\max}$ aumentaron en el mayor pH (Tablas 1 y 2).

TABLA 1: Propiedades de superficie de las preparaciones de tensioactivo artificial en solución fisiológica salina.

Las mediciones se llevaron a cabo directamente luego de la preparación de las muestras o luego de la incubación por 1 hora a 45 °C. La concentración de los fosfolípidos fue de 10 mg/ml en NaCl 150 mmol/l.

Los registros se obtuvieron a diferentes períodos de tiempo con un tensiómetro de burbuja pulsante a 37 °C, 50% de compresión de superficie y a una velocidad de 40 ciclos por minuto. Los valores son los medios (desviación estándar) de 3-5 mediciones. Las abreviaturas están definidas en el texto.

86 105
84 55

Tabla 1

Preparación del tensioactivo			Tensión superficial (mN/m)						
SP-C (LKS) (% p/p)	SP-B (% p/p)	Fosfolípidos	Temperatura de incubación	7,5 s		1 min.		5 min.	
				$\gamma_{\min}$	$\gamma_{\max}$	$\gamma_{\min}$	$\gamma_{\max}$	$\gamma_{\min}$	$\gamma_{\max}$
3	-	DPPC/PG/P A	-	<1	41(1)	<1	41(1)	<1	41(0)
3	-	DPPC/PG/P A	45 °C	<1	41(1)	<1	41(1)	<1	41(1)
3	2	DPPC/PG/P A	-	<1	33(2)	<1	33(2)	<1	33(2)
3	2	DPPC/PG/P A	45 °C	<1	34(2)	<1	34(2)	<1	25(2)
3	-	DPPC/PG	-	12	39(5)	14(4)	42(4)	9(5)	42(2)
3	-	DPPC/PG	45 °C	8(3)	35(5)	9(3)	39(5)	6(4)	42(3)
3	2	DPPC/PG	-	2(1)	31(1)	2(1)	31(3)	2(1)	33(1)
3	2	DPPC/PG	45 °C	3(3)	29(3)	1(1)	33(2)	1(0)	36(1)
3	1	DPPC/PG	-	<1	24(4)	1(2)	26(4)	<1	31(1)
3	0.5	DPPC/PG	45 °C	4(2)	29(1)	4(3)	29(2)	3(1)	34(2)

TABLA 2: Propiedades superficiales de las preparaciones de tensioactivo artificial en solución salina a pH regulado.

La mediciones se llevaron a cabo a la concentración de 10 mg/ml de fosfolípidos en 10 mmol/l en regulador de pH Hepes (pH 6,9) que contiene 140 mmol/l de NaCl y 2,0 mmol/l de CaCl₂. Los registros se obtuvieron a diferentes períodos de tiempo con un tensiómetro de burbuja pulsante a 37 °C, 50% de

compresión de superficie y a una velocidad de 40 ciclos por minuto. Los valores son los medios (desviación estándar) de 3-5 mediciones.

Tabla 2

Preparación del tensioactivo			Tensión superficial (mN/m)					
SP-C (LKS) (% p/p)	SP-B (% p/p)	Fosfolípidos	7,5 seg. $\gamma_{min} - \gamma_{max}$		1 min. $\gamma_{min} - \gamma_{max}$		5 min. $\gamma_{min} - \gamma_{max}$	
3	-	DPPC/PG/PA	4(1)	44(2)	5(2)	47(2)	7(2)	50(1)
3	2	DPPC/PG/PA	3(3)	38(3)	4(4)	40(2)	3(3)	44(2)
3	2	DPPC/PG	15(3)	39(4)	16(2)	42(3)	13(3)	44(3)
3	2	DPPC/PG	2(2)	26(3)	1(1)	29(3)	<1	35(1)

Ejemplo 4: Preparación de mezclas de fosfolípidos con SP-C(LKS) y polimixina B.

El DPPC y el PG se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis MO). Los fosfolípidos, disueltos en cloroformo/metanol 98:2 (v/v), se mezclaron en proporciones DPPC/PG 7:3 (p/p). La SP-C(LKS) se agregó a las mezclas de fosfolípido a una relación en peso de péptido total/fosfolípido de 0,03. Las mezclas se evaporaron bajo nitrógeno y se suspendieron nuevamente a temperatura ambiente en regulador de pH Hepes de pH 6,9 de 10 mmol/l que contiene 140 mmol/l de NaCl y 2,0 mmol/l de $CaCl_2$ o en el mismo regulador que contiene 0,01 % de polimixina B (PxB) de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO). Se realizaron congelamientos y sonicaciones repetidas veces (50 W, 48 kHz) hasta alcanzar suspensiones homogéneas. La concentración final de fosfolípido para ambas preparaciones fue de 10 mg/ml. La adición de PxB

disminuyó tanto $\gamma_{\min}$ como $\gamma_{\max}$ y se obtuvo una óptima actividad superficial (Tabla 3).

TABLA 3: Propiedades tensioactivas de mezclas de fosfolípidos con SP-C (LKS) y polimixina B.

Los registros se obtuvieron a diferentes períodos de tiempo con un tensiómetro de burbuja pulsante a 37 °C y 50% de compresión de superficie y a una velocidad de 40 ciclos por minuto. Los valores son los medios (+desviación estándar SD) de 5 a 11 mediciones. Las abreviaturas están definidas en el texto.

Tabla 3

Preparación del tensioactivo			Tensión superficial (mN/m)					
SP-C (LKS) (% p/p)	PxB (% p/p)	Fosfolípidos	7,5 seg.		1 min.		5 min.	
			$\gamma_{\min} - \gamma_{\max}$		$\gamma_{\min} - \gamma_{\max}$		$\gamma_{\min} - \gamma_{\max}$	
3	-	DPPC/PG	15(3)	39(4)	16(2)	42(3)	13(3)	44(3)
3	1	DPPC/PG	3(2)	29(3)	2(2)	31(4)	1(1)	34(2)

Ejemplo 5: Caracterización biofísica

La cinética de dispersión sobre la superficie se midió a aproximadamente 34°C con una balanza de Wilhelmy (Biegler, Viena, Austria). La tensión superficial se midió durante 10 minutos usando una placa de platino conectada a una celda de tensión e insertada 1 mm en una hipofase de 20 ml de NaCl de 150 mmol/l en un canal de Teflón. Las suspensiones se agregaron

de a gotas, totalizando 1 mg de lípidos, sobre la hipofase, a 4 cm de la placa de platino.

Las mediciones cinéticas de SP-C(LKS) al 3 % en peso en DPPC/PG 7:3 (p/p) usando la balanza de Wilhelmy mostraron una rápida dispersión con una tensión superficial de 28 mN/m luego de 3 segundos (Fig. 2). La dispersión fue de alguna manera más lenta usando SP-C(LKS) al 1 % en peso en la misma mezcla de lípidos. La adición de SP-B al 2 % en peso no cambia en forma significativa la velocidad de dispersión o la tensión superficial de equilibrio (Fig. 2). No se observaron mejoras luego de la incubación de la mezcla por 1 h. a 45 °C. Se obtuvieron resultados similares con DPPC:PG:PA, 68:22:9 (p/p/p).

La tensión superficial dinámica se registró usando un tensiómetro de burbuja pulsante (Surfactometer International, Toronto, Canadá) a 37 °C durante una compresión cíclica del 50% de la superficie de la burbuja a una frecuencia de 40 ciclos por minuto. Todas las mediciones se realizaron por 5 minutos y a una concentración de lípido de 10 mg/ml. Los gradientes de presión a través de la pared de la burbuja se midieron a intervalos de tiempo específicos y se usaron para calcular la tensión superficial al mínimo ($\gamma_{\min}$) y al máximo ($\gamma_{\max}$) tamaño de burbuja.

En el tensiómetro de burbuja pulsante, después de 1 minuto un 3 % en peso de SP-C(LKS) en DPPC:PG:PA, 68:22:9 (p/p/p) produjo un valor de $\gamma_{\min}$ inferior a 1mN/m, mientras que se observó un $\gamma_{\min}$ de 9 - 14 mN/m con un 3 % en peso de SP-C(LKS) en DPPC:PG, 7:3 (p/p) (Tabla 1).

La tensión superficial al máximo radio de burbuja ($\gamma_{\max}$) fue de aproximadamente 40 mN/m en ambos casos. La adición de un 2 % en peso

94 713
SA

de SP-B dió valores de $\gamma_{\max}$ de 31 a 33 mN/m y $\gamma_{\min}$ de 0 - 2 mN/m para ambas preparaciones de lípido. Estos valores son muy similares a aquéllos obtenidos con preparaciones de tensioactivo aisladas de fuentes naturales (19).

La incubación de las preparaciones a 45 °C por 1 hora no tuvo un efecto significativo sobre la actividad superficial (Tabla 1). Disminuyendo la cantidad de SP-B al 0,5 % en peso en la mezcla de 3 % en peso de SP-C(LKS) en DPPC:PG, 7:3 (p/p) se tiende a aumentar el $\gamma_{\min}$ aunque los resultados no alcanzan una significación estadística (Tabla 1). En contraste al SP-B, la adición del péptido KL₄, descrito antes como análogo de SP-B (14) 2% en peso a SP-C(LKS) 3% en peso en DPPC:PG:PA,68:22:9 (p/p/p) no redujo el $\gamma_{\max}$ que permaneció relativamente alto en 41-42 mN/m.

Ejemplo 6

El efecto de la terapia con tensioactivo sobre las propiedades mecánicas de los pulmones inmaduros se evaluó en 5 conejos nacidos antes de término con una edad gestacional de 27 días. A los animales se les realizó una traqueotomía al nacer y cinco de ellos recibieron, vía la cánula traqueal, dos veces 2,5 ml/kg de tensioactivo artificial que contenía DPPC, PG, y SP-C (LKS), con o sin poliximina B, en las proporciones indicadas arriba. La concentración total de fosfolípido del material tensioactivo exógeno fue de 40 mg/ml. Un animal que sirvió como control positivo se trató con la misma dosis del tensioactivo natural modificado disponible comercialmente (Curosurf®), diluido a 40 mg/ml. Un animal fue tratado con una mezcla de DPCC y PG en salina (la misma concentración anterior) a una dosis de 2,5 ml/kg. Un animal se mantuvo sin tratamiento y sirvió de control. Todos los animales se mantuvieron en cajas de pletismógrafo corporal a una temperatura de 37 °C y ventilados en

paralelo por 60 minutos con oxígeno 100%, a una frecuencia de 40 actos respiratorios/min. y 50% de tiempo de inspiración [Servo Ventilator 900B (Siemens-Elema, Solna, Suecia)]. Los volúmenes periódicos se midieron con un neumotacógrafo conectado a cada caja de pletismógrafo. Los animales fueron ventilados con un volumen estándar de presión de expiración positiva (PIP): 35, 25 y 20 cm H₂O modificada por Berggren et al., 1985), con o sin presión de expiración terminal positiva (PEEP) de 3 cm H₂O. La concordancia pulmón-torax se definió como la relación entre el volumen de ventilación pulmonar y la diferencia entre la presión de inspiración [PIP-PEEP], y se expresó como ml/cm H₂O. kg.

En comparación con los animales de control no tratados, la concordancia pulmón-torax mejoró en forma significativa en los animales tratados con el tensioactivo artificial, especialmente en el animal que recibía el tensioactivo que contiene polimixina B, aunque la mejora resultaba inferior a la obtenida luego del tratamiento con una dosis similar de tensioactivo natural modificado. El tratamiento con fosfolípidos solos no afectaba la concordancia (Fig. 3).

Breve descripción de las figuras.

Fig. 1: Secuencias de aminoácidos y presentaciones de la rueda helicoidal de la SP-C y sus análogos.

La secuencia de SP-C humana está tomada de (18) y la de la SP-C(Leu) de (12). La SP-C(LKS) está basada en la estructura primaria del SP-C pero todos los residuos Val en las posiciones 16-28 con la excepción de la posición 17 están reemplazados por residuos Leu; los residuos Lis han sido introducidos

en las posiciones 17, 22 y 27, y la Cis palmitoílada en las posiciones 5 y 6 está reemplazada con Ser.

Fig. 2. Dispersión en la superficie de las preparaciones de tensioactivos sintéticos.

Cinéticas de dispersión de la SP-C(LKS) al 3 % en peso (cuadrados llenos, línea punteada) y de la SP-C(LKS) al 3 % en peso con la adición de un 2 % en peso de SP-B (triángulos abiertos, línea punteada). Todas las preparaciones fueron examinadas a una concentración de 10 mg/ml de DPPC:PG, 7:3 (p/p) en NaCl 150 mmol/l. Los registros se obtuvieron con una balanza Wilhelmy y cada punto es la media de tres diferentes registros.

Fig. 3.

Concordancia pulmón-torax en 5 conejos nacidos antes de término con una edad gestacional de 27 días ventilados con expiración positiva de 25 cm H₂O. La concordancia pulmón-torax es mejorada en forma significativa en los animales tratados (Curosurf) y de forma moderada en los dos animales tratados con el tensioactivo artificial basado en SP-C(LKS). Por lo tanto, la adición de polimixina B (PxB) parece aumentar el efecto del tensioactivo artificial. La concentración de fosfolípidos es la misma en todas las preparaciones de tensioactivos, es decir 40 mg/ml.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Fujiwara, T. and Robertson, B. (1992) en: Robertson, B., van Golde, L.M.G, and Batenburg, B. (Eds.) Pulmonary Surfactant: From Molecular Biology to Clinical Practice, Amsterdam, Elsevier, pp. 561-592.
2. Curstedt, T., Jörnvall, H., Robertson, B., Bergman, T. & Berggren, P. (1987) Eur J. Biochem. **168**, 255-262.
3. Takahasi, A., Nemoto, T. and Fujiwara, T. (1994) Acta Paediatr. Jap. **36**, 613-618.
4. Johansson, J. and Curstedt, T. (1997) Eur. J. Biochem. **244**, 675-693.
5. Curstedt, T., Johansson, J., Persson, P., Eklund, A., Robertson, B., Löweland, B. and Jörnvall, H. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**, 2985-2989.
6. Johansson, J., Curstedt, T. and Jörnvall, H. (1991) Biochemistry **30**, 6917-6921.
7. Andersson, M., Curstedt, T., Jörnvall, H. and Johansson, J., (1995) FEBS Lett. **362**, 328-332.
8. Johansson, J. , Szyperski, T., Curstedt, T., and Wüthrich, K. (1994), Biochemistry **33**, 6015-6023.
9. Vandenbussche, G., Clerckx, A., Curstedt, T., Johansson, J., Jörnvall, H. and Ruysschaert, J.M. (1992) Eur. J. Biochem. **203**, 201-209.
10. Johansson, J., Curstedt, T. and Robertson, B. (1996), Acta Pediatr. **85**, 642-646.
11. Johansson, J., Nilsson, G., Strömberg, R., Robertson, B., Jörnvall, H. and Curstedt, T. (1995) Biochem.J. **307**, 535-541.

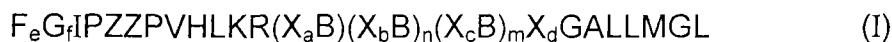
12. Nilsson, G., Gustafsson, M., Vandenbussche, G., Veldhuizen, E., Griffiths, W.J., Sjövall, J., Haagsman, H.P., Ruyschaert, J-M., Robertson, B., Curstedt, T. and Johansson, J. (1998), *Eur. J. Biochem.* **255**, 116-124.
13. Kent, S.B.H. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 957-989
14. Cochrane, C.G. and Revak, S.D. (1991) *Science* **254**, 566-568.
15. Gustafsson, M., Vandenbussche, Curstedt, T., Ruyschaert, J-M. and Johansson, J. (1996) *FEBS Lett.* **384**, 185-188.
16. Gustafsson, M., Curstedt, T., Jörnvall, H. and Johansson, J. (1997) *Biochem. J.* **326**, 799-806.
17. Barrow, C.J., Yasuda, A., Kenny, P.T.M. and Zagorski, M.G. (1992) *J. Mol. Biol.* **225**, 1075-1093.
18. Johansson, J., Jörnvall, H., Eklund, A., Christensen N., Robertson, B. and Curstedt, T., (1988) *FEBS Lett.* **232**, 61-64.
19. Robertson, B., Curstedt, T., Johansson, J., Jörnvall, H., and Kobayashi, T. (1990) *Prog. Respir. Res.* **25**, 237-246.
20. Robertson, B. and Schürch S. (1998) *En: Uhlig, S. and Taylor, A.E. (EDS) Methods in Pulmonary Research*, Basel, Birkhäuser, pp. 349-383.
21. Takei, T., Hashimoto, Y. Ohtsubo, E., Sakai, K. And Ohkawa, H. (1996) *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 1550-1555.
22. Revak, S.D., Merritt, T.A., Cochrane, C.G., Heldt, G.P., Alberts, M.S., Anderson, D.W. and Kheiter, A. (1996) *Pediatr. Res.* **39**, 715-724.
23. Schürch S., Qanbar, R., Ruyschaert, J-M. and Otting, G. (1997) *Nature Struct. Biol.* **4**, 793-795.
24. Leipnisch, E., Andersson, M. Ruyschaert, J-M- y Otting, G. (1997) *Nature Struct. Biol.* **4**, 793-795.

25. Tanaka, Y., Takei, T., Aiba, T., Masuda, K., Kiuchi, A. and Fujiwara, T. (1986) J. Lipid Res. **27**, 475-485.
26. Berggren P., Curstedt, T., Grossmann G., Nilsson, R., Robertson B.: Physiological activity of pulmonary surfactant with low protein content; effect of enrichment with synthetic phospholipids. Exp. Lung. Res 8:29-51, 1985.

46 378
94 65

REIVINDICACIONES::

1. Análogos de SP-C de la fórmula general (I), de acuerdo al código de aminoácidos de una letra:



donde:

X es un aminoácido seleccionado a partir del grupo formado por V, I, L, Nle (norleucina);

B es un aminoácido seleccionado a partir del grupo formado por ornitina, K, I, W, F, Y, Q, N;

Z es un aminoácido seleccionado a partir del grupo formado por S, C, F donde los residuos Ser o Cis, en forma opcional, están unidos vía uniones éster o tioéster con grupos acilo que contienen de 12 a 22 átomos de carbono,

a es un entero de 1 a 19

b es un entero de 1 a 19

c es un entero de 1 a 21

d es un entero de 0 a 20

e es 0 o 1

f es 0 o 1

n es 0 o 1

m es 0 o 1

con las condiciones siguientes:

$n + m > 0$,

$f \geq e$

$(X_a B) (X_b B)_n (X_c B)_m X_d$ es una secuencia que tiene un total de 22 aminoácidos, preferiblemente de 10 a 22 aminoácidos.

97 779
95 66

2. Análogos de SP-C de acuerdo a la reivindicación 1, de la fórmula (Ia):



3. Análogos de SP-C de acuerdo a la reivindicación 1, de la fórmula (Ib):



4. Análogos de SP-C de acuerdo a la reivindicación 1, de la fórmula (Ic):



5. Análogos de SP-C de acuerdo a la reivindicación 1, de la fórmula (Id):



6. Análogos de SP-C de acuerdo a la reivindicación 1, de la fórmula (Ie):



7. Análogos de SP-C de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 6 donde la serina está acilada, preferiblemente con grupos palmitoílo.

8. Análogos de SP-C de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 7, donde B es lisina y X es leucina, isoleucina o norleucina.

9. Análogos de SP-C de acuerdo a la reivindicación 8, seleccionados a partir del grupo formado por:



donde S está opcionalmente acilada, preferiblemente con palmitoílo.

10. Un tensioactivo sintético que comprende por lo menos un análogo de SP-C de la fórmula (I) en una mezcla con lípidos y fosfolípidos.

11. Un tensioactivo sintético de acuerdo a la reivindicación 10, en el cual la mezcla de lípidos/fosfolípidos comprende DPPG, PG, PA.
12. Un tensioactivo sintético de acuerdo a las reivindicaciones 10-11, que además comprende SP-B o un derivado activo del mismo o una polimixina.
13. Un tensioactivo sintético de acuerdo a las reivindicaciones 10-12, en forma de solución, dispersión, suspensión, o polvo seco.
14. El uso de análogos de SP-C de las reivindicaciones 1 a 7 para la preparación de un tensioactivo sintético para ser usado en la terapia en todos los casos de deficiencia o disfunción del tensioactivo pulmonar.
15. El uso de polimixina, preferiblemente la polimixina B para la preparación de un tensioactivo artificial de acuerdo a las reivindicaciones 10-13, para el tratamiento de todos los casos de deficiencia o disfunción de tensioactivo pulmonar. ✓
16. El uso de acuerdo a las reivindicaciones 14 y 15 en el síndrome de dificultad respiratoria.

Milán, 12 de febrero de 1999

El Mandatario

(Banfi Paolo)

de Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.

(firma)

MINISTERIO DE INDUSTRIA, COMERCIO Y ARTESANIA
Oficina Provincial Industria Comercio y Artesanía de Milán
Departamento Patentes

49 74
94 68

Documentos subsiguientes a reservas – Reg. R

Fecha entrega	Protocollo reserva	Solicitante
2 de abril de 1999		CHIESI FARMACEUTICI S.p.A. Parma

Representante del Solicitante

Bianchetti Giuseppe

Bracco Mauro

Bianchetti Marina

Minoja Fabrizio

Vergani Maria Fiorella

Banfi Paolo

Ferreccio Rinaldo

Ref. No. Solicitud	Fecha presentación solicitud
MI99A 000275 Invención X Modelo Marca	12 de febrero de 1999

Objeto de la continuación

1. Poder;

2. Designación de Inventor;

3. No. 2 copias del Impreso A;

4. No. 2 copias de los dibujos formales

El depositador
Biglia Michele
(firma)

El Oficial Otorgante

100 700
98 69

ACTA DE DESIGNACION DE INVENTORES

Los abajo firmantes, Señores Bianchetti Giuseppe et al. de Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l. (véase poder), Via Rossini, 8 - Milán, mandatarios de la empresa **CHIESI FARMACEUTICI S.p.A.** con sede en Parma,

d e c l a r a n

que los inventores de la solicitud de patente para invención industrial de título:

“PEPTIDOS SINTETICOS QUE TIENEN LA CAPACIDAD DE DISMINUIR LA TENSION SUPERFICIAL Y EL USO DE LOS MISMOS EN LA PREPARACION DE UN TENSIOACTIVO ARTIFICIAL”

depositada con fecha **12 de febrero de 1999** con el No. MI99A 000275

son los Señores:

1. **Curstedt Tore**
2. **Johansson Jan**
3. **Jörnvall Hans**
4. **Robertson Bengt**
5. **Ventura Paolo**

El Mandatario
(Banfi Paolo)
de Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l.
(firma)

10/ 723
79 70

Yo, Cecilia Bianchetti,

Via Goldoni 1 - 20129 MILAN (ITALIA)

declaro entender bien los idiomas español e italiano, y declaro que este texto es una traducción completa, fiel y verdadera hecha por mí misma el día 17 de abril de 2000, de la solicitud de patente n. MI 99 A 000275, de título **“PEPTIDOS SINTETICOS QUE TIENEN LA CAPACIDAD DE DISMINUIR LA TENSION SUPERFICIAL Y EL USO DE LOS MISMOS EN LA PREPARACION DE UN TENSIOACTIVO ARTIFICIAL”** depositada el día 12 de febrero de 2000, y aquí adjunta.

Milán, a 17 de abril de 2000

Cecilia Bianchetti

(firma)