



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019027257-7 A2



(22) Data do Depósito: 20/06/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 14/07/2020

(54) Título: MÉTODO PARA REDUZIR INFLAMAÇÃO DE PULMÃO

(51) Int. Cl.: A61K 31/198; A61K 31/00; A61K 9/72; A61P 29/00; A61P 11/00.

(30) Prioridade Unionista: 20/06/2017 AU 2017902365.

(71) Depositante(es): RESPIRION PHARMACEUTICALS PTY LTD.

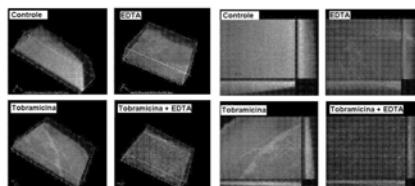
(72) Inventor(es): BARRY CLEMENTS.

(86) Pedido PCT: PCT AU2018050609 de 20/06/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/232452 de 27/12/2018

(85) Data da Fase Nacional: 19/12/2019

(57) Resumo: Um método para tratar ou prevenir inflamação no pulmão administrando uma alta concentração de um agente quelante inalável, em particular CaEDTA.



“MÉTODO PARA REDUZIR INFLAMAÇÃO DE PULMÃO”

CAMPO TÉCNICO

[0001]A presente invenção se refere a um método de tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão, administrando uma alta concentração de um agente quelante inalado, e formulações para usar no método. Em uma modalidade da invenção, a inflamação no pulmão é associada com ou causada por fibrose cística.

FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

[0002]A fibrose cística é caracterizada pela suscetibilidade à infecção, que contribui para a inflamação e danos nos pulmões. No entanto, a inflamação e danos nos pulmões também podem ocorrer na ausência de infecção bacteriana (Sly *et al. Am J Respir Crit Care Med.* 2009 180(2):146-52.

[0003]Inflamação é a resposta do corpo a insultos, que incluem infecção, trauma e hipersensibilidade. A resposta inflamatória é complexa e envolve uma variedade de mecanismos para defesa contra patógenos e reparo dos tecidos. No pulmão, a inflamação é geralmente causada por patógenos ou pela exposição a toxinas, poluentes, irritantes e alérgenos).

[0004]Durante a inflamação, vários tipos de células inflamatórias são ativados. Cada um deles libera citocinas e mediadores para modificar as atividades de outras células inflamatórias. A orquestração dessas células e moléculas leva à progressão da inflamação. Clinicamente, a inflamação aguda é observada em doenças como pneumonia e síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS), enquanto a inflamação crônica é representada por doenças como asma, fibrose cística e doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD). Como o pulmão é um órgão vital para a troca gasosa, a inflamação excessiva pode ser fatal. Um delicado equilíbrio entre inflamação e anti-inflamação é essencial para a homeostase pulmonar.

[0005]A imunidade envolve sistemas inatos e adaptativos. A imunidade inata é inespecífica e evoca respostas rápidas, incluindo

inflamação em face de insultos patogênicos. A imunidade adaptativa é específica do antígeno. Primeiro, detecta-se o antígeno específico e depois mobiliza-se as células inflamatórias para atingir esse antígeno específico. Os sistemas inatos e adaptativos compartilham componentes e agem em conjunto para se defender contra patógenos.

[0006]O epitélio das vias aéreas secreta uma variedade de substâncias como mucinas, defensinas, lisozima, lactoferrina e óxido nítrico, que protegem não especificamente o trato respiratório do ataque microbiano. As células epiteliais também produzem vários mediadores, como radicais de oxigênio reativos, citocinas (TNF- α , IL-1 β , fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos [GM-CSF]) e fator de ativação de plaquetas para recrutar células inflamatórias no local da inflamação. As citocinas estimulam a liberação de ácido araquidônico dos lipídios da membrana, levando à produção de eicosanoides, que estimulam ainda mais a secreção de muco pelas células caliciformes e a inflamação dos tecidos.

[0007]O surfactante fica na superfície dos alvéolos e contém quatro proteínas surfactantes (SP A-D). Importante para reduzir a tensão superficial do pulmão, essas proteínas desempenham um papel crítico na absorção do surfactante na superfície alveolar. O SP-A e o SP-D também participam da defesa do hospedeiro. Eles se ligam moléculas de superfície bacteriana, modulam a atividade leucocitária e levam à opsonização do patógeno.

[0008]A IgA secretada pelas células plasmáticas forma uma barreira protetora epitelial adicional, que impede a adesão microbiana à superfície epitelial. Também se liga a patógenos, causando fagocitose e citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos. A imunoglobulina E (IgE) induz hipersensibilidade imediata ao trato respiratório. Produz reações graves ligando-se a receptores IgE nas superfícies de mastócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos B. A repetição da exposição ao mesmo antígeno induz degranulação e a liberação de mediadores pró-inflamatórios, incluindo

histamina, prostaglandinas, leucotrienos e triptase. Isso aumenta a permeabilidade vascular, broncoconstrição e infiltração inflamatória de células.

[0009]O documento US20160263151 ensina o uso de um antibiótico inalado, em combinação com nitrito acidificado e um quelante de ferro, para tratar infecções bacterianas. O quelante de ferro presente nas formulações do documento US20160263151 serve para fornecer um efeito sinérgico quando combinado com o nitrito acidificado, aumentando a capacidade do antibiótico de agir.

[0010]Os tratamentos atuais para a inflamação pulmonar incluem esteroides orais ou inalados e medicamentos não esteroides que têm como alvo as respostas inflamatórias do hospedeiro. No entanto, os efeitos são transitórios, requerem tratamento contínuo e existem efeitos colaterais significativos.

[0011]Há a necessidade de métodos para tratar ou prevenir inflamação no pulmão; ou pelo menos um método para complementar ou fornecer uma alternativa aos métodos de tratamento previamente conhecidos.

[0012]A presente invenção procura fornecer um método melhorado ou alternativo para o tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão, administrando uma alta concentração de um agente quelante inalado.

[0013]A discussão anterior da técnica de fundamento se destina a facilitar uma compreensão da presente invenção somente. A discussão não é um reconhecimento ou admissão que qualquer material referido é ou era parte do conhecimento geral comum como na data de prioridade do pedido.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0014]A presente invenção fornece um método para tratar ou prevenir inflamação no pulmão administrando uma alta concentração de um agente quelante inalado.

[0015]Preferivelmente, a alta concentração de um agente

quelante inalado é superior a 37,5 mg/dose.

[0016]Preferivelmente, a alta concentração de um agente quelante inalado é superior a 50 mg/dose.

[0017]Em uma forma da invenção, o agente quelante de alta concentração é fornecido por uma forma de dosagem contendo pelo menos 50 mg/dose, ou entre 50 mg/dose e 300 mg/dose. O agente quelante pode ser administrado entre uma e quatro vezes ao dia, até uma dose total de cerca de 1.200 mg/dia, preferivelmente pelo menos 150 mg/dia.

[0018]Em uma forma da invenção, o agente quelante de alta concentração é fornecido em uma forma de dosagem contendo pelo menos 37,5 mg/dose ou entre 37,5 mg/dose e 300 mg/dose. O agente quelante pode ser administrado entre uma e quatro vezes ao dia, até uma dose total de até cerca de 1.200 mg/dia, preferivelmente pelo menos 150 mg/dia.

[0019]Preferivelmente, de 37,5 mg/dia a 1.200 mg/dia de agente quelante são administrados. Preferivelmente, pelo menos 50 mg/dia de agente quelante são administrado. O agente quelante pode ser administrado entre uma e quatro vezes ao dia, até uma dose diária total de cerca de 1.200 mg/dia.

[0020]Preferivelmente, cada dose do agente quelante é administrada por um período não superior ao administrado por um período não superior a 8 horas. Preferivelmente, o agente quelante e/ou antibiótico são administrados durante um período não superior a 1 h.

[0021]Preferivelmente, o agente quelante é CaEDTA.

[0022]A presente invenção fornece ainda um método de tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão, administrando uma alta concentração de um agente quelante inalado, em que o tratamento ou prevenção de inflamação resulta em um aumento no volume expiratório forçado (FEV).

[0023]A presente invenção também fornece um método de tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão, administrando uma alta

concentração de um agente quelante inalado, em que o tratamento ou prevenção de inflamação está associado a uma diminuição da atividade da metaloproteinase da matriz (MMP).

[0024]A presente invenção fornece ainda um método de tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão, administrando uma alta concentração de um agente quelante inalado em que o tratamento ou prevenção de inflamação está associado a uma diminuição na produção de radicais hidroxila.

[0025]A presente invenção fornece uma formulação inalável contendo uma alta concentração de um agente quelante.

[0026]A presente invenção fornece uma formulação inalável contendo uma alta concentração de um agente quelante e capaz de fornecer uma alta concentração de um agente quelante inalável como uma dose única.

[0027]A presente invenção fornece um kit para tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão contendo (i) uma formulação inalável contendo uma alta concentração de um agente quelante; e (ii) instruções de uso.

[0028]A presente invenção fornece um kit para tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão, contendo (i) uma formulação inalável capaz de fornecer uma alta concentração de um agente quelante inalável como dose única; e (ii) instruções de uso.

[0029]O uso de uma alta concentração de um agente quelante na fabricação de uma formulação inalável para o tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão.

[0030]O uso de um agente quelante inalável na fabricação de um medicamento para a administração de uma alta concentração do agente quelante inalável como dose única para o tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0031]Outras características da presente invenção são descritas mais detalhadamente na descrição a seguir de várias modalidades não limitantes da mesma. Esta descrição é incluída apenas para fins de exemplificação da presente invenção. Não deve ser entendido como uma restrição ao resumo, divulgação ou descrição geral da invenção, conforme estabelecido anteriormente. A descrição será feita com referência aos desenhos anexos nos quais:

A Figura 1 mostra partículas submicrônicas de biofilmes de *P. aeruginosa* mortas em EDTA e que atuam sinergicamente com a tobramicina *in vitro*. Biofilmes de *P. aeruginosa* no muco de CF, tratados com partículas de EDTA em aerossol e/ou tobramicina. A concentração final de tobramicina nas gotículas foi de 325 µg/ml. 1A) Imagens microscópicas confocais de biofilmes corados com BacLight LIVE/DEAD. 1B) Contagens bacterianas mostrando o efeito quantitativo dos tratamentos.

A Figura 2 mostra que o CaEDTA reduz a carga bacteriana nos pulmões com FC mais rapidamente do que o tratamento com antibióticos isoladamente. Os indivíduos com FC foram tratados com CaEDTA nebulizado (EDTA) ou solução salina (placebo), e a carga bacteriana no muco expectorado foi monitorada (unidades formadoras de colônia por grama de muco).

A Figura 3A mostra a alteração média no FEV1 (% de pontos) nos pacientes tratados com CaEDTA ou placebo desde o início do tratamento até 10 semanas (4 semanas após o tratamento).

A Figura 3B mostra a relação entre a melhora do FEV1 (0 a 2 semanas) e o peso corporal.

A Figura 4 mostra a concentração de EDTA alcançada no escarro de três indivíduos com CF 5 minutos e duas horas após o tratamento com 75 mg de CaEDTA nebulizado.

As Figuras 5-7 demonstram que a administração de uma alta concentração de quelante nos pulmões de camundongo reduz a

inflamação na ausência de infecção.

A Figura 5 mostra a contagem total de leucócitos no líquido de lavagem broncoalveolar (BALF) de camundongos expostos à fumaça do ar ou de cigarro (CS) e tratados por administração intranasal de veículo ou deferoxamina (DFO). Embora a fumaça do cigarro induza o número de leucócitos conforme o esperado, o tratamento com DFO reduz significativamente esse efeito.

A Figura 6 mostra o peso pulmonar de camundongos expostos ao ar ou CS e tratados com veículo ou DFO como acima. O peso pulmonar pode ser usado como substituto da inflamação, com aumento do peso indicando mais inflamação. Em camundongos tratados com CS, o peso pulmonar aumenta significativamente conforme o esperado, e o tratamento com DFO reduz o peso médio, sugerindo inflamação reduzida.

A Figura 7 mostra que, embora CS aumente o teor de ferro de BALF, o tratamento com deferoxamina reduz esse efeito. Esquerda: teor médio de ferro para cada grupo de camundongos; Direita: Gráfico de dispersão dos mesmos dados.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Descrição Detalhada da Invenção

Método de Tratamento ou Prevenção

[0032]A presente invenção fornece um método de tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão, administrando uma alta concentração de um agente quelante inalado.

[0033]Preferivelmente, a alta concentração de um agente quelante inalado é superior a 37,5 mg/dose.

[0034]Preferivelmente, a alta concentração de um agente quelante inalado é superior a 50 mg/dose.

[0035]Foi demonstrado anteriormente que o EDTA inalado por si só não trata infecções bacterianas (Brown *et al.* (*Am J Dis Child.* 1985 139(8):836-9); Hassett (*Front Microbiol.* 2016 7:291)). Brown *et al.* (1985)

trataram dez crianças com CF cronicamente infectadas com *P. aeruginosa* com EDTA de sódio nebulizado por três meses e não observaram alterações na função pulmonar. Outros relataram que o EDTA causa broncoconstrição dependente da concentração (Beasley *et al.* (*Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987 294(6581):1197-8)); e que o EDTA não tem efeito no FEV1 (Asmus *et al.* (*J Allergy Clin Immunol*. 2001 107(1):68-72)). Portanto, não há razão para acreditar que um agente quelante tenha algum efeito positivo em indivíduos como fibrose cística (CF), asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) ou outras condições pulmonares que causem ou estejam associadas com inflamação. No entanto, a presente invenção descobriu surpreendentemente que o agente quelante inalado pode tratar ou prevenir a inflamação do pulmão.

[0036]É uma crença comum de que o ambiente pulmonar da CF é ácido. No entanto, recentemente foi demonstrado que o pulmão com CF tem o mesmo pH que os pulmões normais (Schultz *et al.* “Airway surface liquid pH in children with cystic fibrosis”. *Nature Communications* 2017 8(1):1409). Portanto, é improvável que a tecnologia existente usando nitrito acidificado, como a discutida no documento US20160263151, funcione clinicamente na CF, pois a formulação não permanece acidificada, mas imediatamente retorna ao pH normal do pulmão de 7,4.

[0037]Embora a acidez do pulmão com CF seja normal, verificou-se que os níveis de ferro são notavelmente diferentes dos pulmões normais. Stites *et al.* (*Am J Respir Crit Care Med*. 1999 160(3):796-80) mostrou que os níveis de ferro são muito elevados nos pulmões de pacientes com CF, bem como nos pulmões de fumantes, em comparação com indivíduos saudáveis. Também foi demonstrado que a maior parte desse ferro está na forma ferrosa, Fe(II), e se correlaciona significativamente com a gravidade da doença (Hunter *et al.*, *MBio*. 2013 4(4):1-8). O ferro ferroso pode participar da reação de Fenton para gerar radicais de oxigênio altamente reativos que podem danificar seriamente os tecidos e o DNA (Jomova *et al.* *Toxicology*. 2011 283(2-3):65-87; MacNee, *Eur J Pharmacol*. 2001 429(1-3):195-207).

[0038]Sem desejar ser limitado pela teoria, acredita-se que o método da presente invenção reduz a inflamação por (i) inativação de metaloproteinases da matriz (MMPs) pela quelação de zinco; (ii) reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROSs) pela quelação de ferro; e/ou (iii) reduzir a carga bacteriana nos pulmões privando as bactérias de íons essenciais como ferro e zinco. A ação no pulmão de um indivíduo pode ser uma ou qualquer combinação dos métodos teorizados de redução da inflamação.

[0039]A inalação é um método de administração localizado e, portanto, pode ser mais eficaz em atingir a área alvo, isto é, o pulmão, e fornecer uma concentração alta e localizada do agente quelante inalado. A inalação evita efeitos colaterais indesejados devido à exposição sistêmica dos ativos e reduz o risco dos pacientes desenvolverem resistência.

[0040]A presente invenção fornece ainda um método de tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão, administrando uma alta concentração de um agente quelante inalado em que o tratamento ou prevenção de inflamação resulta em um aumento no FEV.

[0041]A presente invenção fornece ainda um método de tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão, administrando uma alta concentração de um agente quelante inalado, em que o tratamento ou prevenção de inflamação está associado a uma diminuição da atividade da MMP. Sabe-se que as metaloproteinases da matriz (MMPs) causam danos nos pulmões (Garratt *et al. Eur Respir J.* 2015 46(2):384-94) e que a atividade da MMP depende de Zn^{2+} (Hazra *et al. Molecular Vision* 2012; 18:1701-1711). No entanto, tentativas anteriores de atingir MMPs nos pulmões não foram bem-sucedidas. A presente invenção usa um agente quelante inalado para quelar o zinco nos pulmões, reduzindo assim os danos pulmonares induzidos por MMP e tratando ou prevenindo a inflamação.

[0042]A presente invenção fornece ainda um método de tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão, administrando uma alta

concentração de um agente quelante inalado, em que o tratamento ou prevenção de inflamação está associado a uma diminuição na produção de radicais hidroxila. O ferro é um fator-chave no dano pulmonar (Stites *et al.* (*Am J Respir Crit Care Med.* 1999 160(3):796-80)), pois o Fe catalisa a formação de radicais hidroxila, porém, até o momento, ensaios com antioxidantes não produziram melhoria significativa da função pulmonar. A presente invenção usa um agente quelante inalado para quelar o ferro nos pulmões, reduzindo assim os danos pulmonares induzidos pelo radical hidroxila e tratando ou prevenindo a inflamação.

[0043]A presente invenção fornece ainda um método de tratamento ou prevenção de infecção no pulmão, administrando uma alta concentração de um agente quelante inalado, em que o tratamento ou prevenção de inflamação resulta da remoção ou redução de biofilme bacteriano produzido nos pulmões pela presença do agente quelante. A redução no biofilme permite maior remoção das bactérias e biofilme por tosse e expectoração.

[0044]A presente invenção fornece ainda um método de tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão, administrando uma alta concentração de um agente quelante inalado, em que o tratamento ou prevenção de inflamação resulta da remoção ou redução de enzimas de protease produzidas por bactérias, que podem estimular a inflamação local, causar dano tecidual local e pode neutralizar a atividade antibiótica. Essas enzimas são amplamente dependentes de cátions e espera-se que a remoção de cátions do ambiente desative essas enzimas.

[0045]Preferivelmente, o agente quelante é um agente quelante de ferro ou um agente quelante de zinco. Mais preferivelmente, o agente quelante é um quelante tanto de ferro quanto de zinco (um quelante de ferro/zinco). Alternativamente, o agente quelante pode ser uma mistura de dois ou mais agentes quelantes, por exemplo, uma mistura de um agente quelante de ferro e um agente quelante de zinco, ou um agente quelante de ferro/zinco e

um agente quelante de zinco ou um agente quelante de ferro e um agente quelante de ferro/zinco.

[0046]O agente quelante é preferivelmente selecionado do grupo que consiste em ácido cítrico, fosfatos, sais di, tri- e tetra-sódio do ácido etileno diamina tetracético (EDTA), sais de cálcio do EDTA, etileno glicol-bis-(b-éter aminoetilico)-N,N,N',N'-tetra-acético (EGTA); Ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetra-acético (BAPTA); etileno-N,N'-diglicina (EDDA); Ácido 2,2'-(etilendi-imino)dibutírico (EBDA); lauroil EDTA; EDTA dilauoil, di-hidrociorida de trietileno tetramina (TRIEEN), ácido dietilenotriamina-penta-acético (DPTA), ácido trietilenotetramina hexa-acético (TTG), deferoxamina (DFO), deferasirox (DSX), dimercaprol, citrato de zinco, penicilamina, succímero, editronato, hexmetafosfato de sódio, edetato de cálcio dissódico, D-penicilamina, polifenóis, galol, catecol, dimercaprol, tetratiomolibdato, lactoferrina e clioquinol e suas combinações.

[0047]Preferivelmente, o agente quelante é um agente quelante farmacologicamente aceitável.

[0048]Em uma modalidade, o agente quelante é o ácido etileno diamina tetra-acético (EDTA). Em outra modalidade, o agente quelante é deferoxamina (DFO). Em outra modalidade, o agente quelante é deferasirox (DSX).

[0049]Preferivelmente, o agente quelante tem aproximadamente a mesma afinidade de ferro que o EDTA e/ou aproximadamente a mesma afinidade de zinco que o EDTA. A constante de formação ou constante de estabilidade ($\log K_1$) para EDTA a 25°C e 0,1 M é 14,3 para Fe^{2+} , 25,1 para Fe^{3+} e 16,5 para zinco.

[0050] Em uma modalidade, o agente quelante é um sal de cálcio do agente quelante. Preferivelmente, o agente quelante é CaEDTA.

[0051]Em uma modalidade, o agente quelante é fornecido em uma forma de dose inalada contendo entre 37,5 mg/dose e 300 mg/dose, 50 mg/dose e 300 mg/dose, entre cerca de 75 mg/dose e 200 mg/dose, entre

cerca de 75 mg/dose e 100 mg/dose, entre cerca de 37,5 mg/dose e 200 mg/dose, entre cerca de 50 mg/dose e 200 mg/dose; preferivelmente cerca de 37,5 mg/dose, 50 mg/dose, 75 mg/dose, 100 mg/dose, 200 mg/dose ou 300 mg/dose. O agente quelante é preferivelmente fornecido em uma forma de dose inalada contendo pelo menos 37,5 mg/dose. O agente quelante é preferivelmente fornecido em uma forma de dose inalada contendo pelo menos 50 mg/dose.

[0052]A quantidade total de agente quelante inalado por dia é preferivelmente entre cerca de 37,5 mg/dia e 1.200 mg/dia, 50 mg/dia e 1.200 mg/dia, entre cerca de 100 mg/dia e 1.000 mg/dia, entre cerca de 300 mg/dia e 900 mg/dia, entre cerca de 400 mg/dia e 800 mg/dia; preferivelmente cerca de 150 mg/dia, 300 mg/dia, 500 mg/dia ou 600 mg/dia.

[0053]A quantidade total de agente inalado por dia está preferivelmente entre cerca de 0,1 mg de agente quelante/kg de peso corporal e 15 mg de agente quelante/kg de peso corporal, entre cerca de 0,5 mg de agente quelante/kg de peso corporal e 10 mg de agente quelante/kg de peso corporal, entre cerca de 1,0 mg de agente quelante/kg de peso corporal e 5 mg de agente quelante/kg de peso corporal; entre cerca de 1,0 mg de agente quelante/kg de peso corporal e 3,5 mg de agente quelante/kg de peso corporal; preferivelmente cerca de 1,0 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 1,5 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 2,0 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 2,5 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 3,0 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 3,5 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 4,0 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 4,5 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 5,0 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 10 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 15 mg de agente quelante/kg de peso corporal.

[0054]Foi determinado que, se 75 mg de um agente quelante como CaEDTA for inalado, poderão ser detectados cerca de 0,4 mM a 1,34 mM de agente quelante no escarro dos pulmões após 5 minutos.

[0055]O agente quelante inalado é preferivelmente administrado por um período não superior a 8 h, 7 h, 6 h, 5 h, 4 h, 3 h, 2 h, 1 h, 45 min, 30 min, 20 min, 15 min, 10 min ou 5 min. Se a administração for por entrega de pó seco, o agente quelante inalado pode ser entregue por um período de segundos, por exemplo, 1 segundo por "sopro" do dispositivo aerossol ou inalador de pó seco, em que um ou mais sopros são administrados de cada vez.

[0056]Preferivelmente, o agente quelante inalado é administrado por pelo menos 28 dias consecutivos. O agente quelante inalado pode ser administrado por 2 dias ou mais, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias ou 7 dias. O agente quelante inalado pode ser administrado por 2 a 28 dias, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas ou 4 semanas.

[0057]Alguns indivíduos podem se beneficiar de um período de "carregamento" do indivíduo com antibiótico e/ou agente quelante, com uma dose mais alta ou administração mais frequente por um período de dias ou semanas, seguido por uma dose reduzida ou de manutenção.

[0058]Assim, a presente invenção:

- fornece uma quantidade total de agente quelante inalado entre 37,5 mg/dia e 1.200 mg/dia;
- é administrado pelo menos uma vez por dia até seis vezes por dia, preferivelmente até quatro vezes por dia;
- é administrado por um período não superior a 8 h.

[0059]Preferivelmente, a presente invenção:

- fornece uma quantidade total de agente quelante inalado entre 37,5 mg/dia e 1.200 mg/dia;
- é administrado uma ou duas vezes por dia;
- é administrado por um período não superior a 1 hora por administração;
- contém CaEDTA como agente quelante;

[0060]A quantidade preferível de qualquer agente quelante pode ser calculada comparando a capacidade quelante do agente com a do CaEDTA e multiplicando a faixa de dosagem dada anteriormente por esse número. O resultado deve fornecer um nível de quelação aproximadamente igual ao nível preferido de quelação fornecido pela quantidade preferida de EDTA.

[0061]Preferivelmente, a inflamação é causada por, causa ou está associada às seguintes condições pulmonares: fibrose cística (CF); asma; doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD); hipertensão pulmonar; câncer de pulmão; fibrose pulmonar; bronquiectasia; bronquite; bronquiolite; síndrome da insuficiência respiratória aguda; tuberculose; infecções pulmonares por micobactérias não tuberculosas (NTM); pneumonia incluindo, sem limitação, pneumonia associada ao ventilador, pneumonia adquirida na comunidade, pneumonia brônquica, pneumonia lobar; infecções por bactérias como *Pseudomonas spp*, *Streptococcus pneumoniae*, *Chlamydia*, *Mycoplasma pneumonia*, *Staphylococci spp*, *Klebsiella spp*, *E. coli*, *Stenotrophomonas spp* e fungos, incluindo *Aspergillus*, *Scedosporium* e *Candida sp*; tratamento profilativo ou prevenção para condições nas quais a infecção pode surgir, por exemplo, pacientes intubados ou ventilados; infecções em pacientes transplantados de pulmão; bronquite; coqueluche (tosse convulsa); infecções do ouvido interno; infecções estreptocócicas na garganta; antraz por inalação; tularemia; ou sinusite.

[0062]Preferivelmente, a formulação é administrada ao indivíduo em necessidade entre cerca de uma vez por dia a cerca de 6 vezes por dia, mais preferivelmente cerca de 4 vezes por dia.

[0063]Alternativamente, a formulação pode ser administrada ao indivíduo em necessidade por inalação contínua, por meio de um nebulizador. A formulação pode ser administrada por 24 horas, 12 horas, 8 horas, 6 horas, 4 horas, 2 horas ou 1 hora e cada uma dessas entregas (além das 24 e 12 horas) pode ser repetida várias vezes dentro de um período de 24

horas.

[0064]Um indivíduo normalmente recebe uma dose de cerca de 0,01 a 15 mg/kg/dia de um agente quelante, $\pm 20\%$ ou $\pm 10\%$. Esta dose será tipicamente administrada nebulizada ou por pelo menos uma, preferivelmente, várias "baforadas" do dispositivo aerossol. Por exemplo, um sujeito pode receber entre 0,1 mg/kg de agente quelante e 15 mg/kg em uma dose única ou em várias doses ao longo de um dia.

[0065]A dose total por dia é preferivelmente administrada pelo menos uma vez por dia, mas pode ser dividida em duas ou mais doses por dia. Alguns indivíduos podem se beneficiar de um período de "carregamento" do indivíduo com o agente quelante com uma dose mais alta ou administração mais frequente por um período de dias ou semanas, seguido por uma dose reduzida ou de manutenção. Como fibrose cística, COPD, etc., são condições tipicamente crônicas, espera-se que os indivíduos recebam essa terapia por um período prolongado de tempo.

[0066]Independentemente da forma da formulação do fármaco, é preferível criar gotículas ou partículas para inalação na faixa de cerca de 0,1 μm a 12 μm ou cerca de 0,25 μm a 6 μm , preferivelmente 1 μm a 6 μm e mais preferivelmente cerca de 2 μm a 4 μm . Alternativamente, as partículas podem ser de 0,1 μm a 1,0 μm , 0,2 μm a 0,9 μm , 0,3 μm a 0,8 μm , 0,4 μm a 0,7 μm ou 0,5 μm . Ao criar partículas inaladas com uma faixa de tamanho relativamente estreita, é possível aumentar ainda mais a eficiência do sistema de administração de medicamentos e melhorar a repetibilidade da dosagem. Assim, é preferível que as partículas não apenas tenham um tamanho na faixa de 0,1 μm a 12 μm ou 2 μm a 6 μm ou cerca de 3 a 4 μm , mas que o tamanho médio das partículas esteja dentro de uma faixa estreita, de modo que 80% ou mais das partículas sendo entregue a um indivíduo tenham um diâmetro de partícula que está dentro de $\pm 20\%$ do tamanho médio de partícula, preferivelmente $\pm 10\%$ e mais preferivelmente $\pm 5\%$ do tamanho

médio de partícula.

[0067]"Tamanho de partícula" é uma noção introduzida para comparar as dimensões de partículas sólidas, partículas líquidas (gotículas). Para gotículas e aerossóis, são utilizados termos como "diâmetro aerodinâmico" e "diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD). As definições são dadas a seguir.

[0068]"Diâmetro aerodinâmico" é o diâmetro de uma esfera de densidade unitária com a mesma velocidade de assentamento terminal que a partícula em questão. É usado para prever onde essas partículas se depositarão no trato respiratório.

[0069]"Diâmetro aerodinâmico mediano de massa" é o diâmetro aerodinâmico médio geométrico. Cinquenta por cento das partículas em peso serão menores que o MMAD, 50% serão maiores.

[0070]Durante o experimento de dimensionamento de partículas, as suspensões contêm um número incontável de partículas de tamanhos variados em movimento. Quando a máquina de dimensionamento de partículas analisa essas partículas, ela forma uma curva de distribuição de partículas, que cobre toda a faixa de tamanho de partícula, partindo da menor partícula, que pode ser de 1 nm à maior, que pode ser de 100 µm. Na curva de distribuição do tamanho de partícula, uma frequência cumulativa é calculada para as partículas. D_{10} se refere ao diâmetro particular de partícula em que 10% das partículas na suspensão têm um diâmetro menor ou igual ao diâmetro do diâmetro particular da partícula.

[0071] D_{50} : Semelhante ao D_{10} , D_{50} diâmetro de corte para 50% da população de partículas na formulação e se refere ao diâmetro de partícula específico em que 50% das partículas na suspensão têm um diâmetro menor ou igual ao diâmetro do diâmetro particular das partículas.

[0072] D_{90} : D_{90} é o diâmetro de corte para 90% da população de partículas na formulação e se refere ao diâmetro de partícula específico em que 90% das partículas na suspensão têm um diâmetro menor

ou igual ao diâmetro do diâmetro de partícula particular.

[0073]O termo "trato respiratório" deve ser entendido como um sistema de células e órgãos funcionando na respiração, em particular os órgãos, tecidos e células do trato respiratório incluem pulmões, nariz, passagem nasal, seios paranasais, nasofaringe, laringe, traqueia, brônquios, bronquíolos, bronquíolos respiratórios, dutos alveolares, sacos alveolares, alvéolos, pneumócitos (tipo 1 e tipo 2), epitélio mucoso ciliado, epitélio mucoso, epitélio mucoso, células epiteliais escamosas, mastócitos, células caliciformes e células dendríticas intraepiteliais.

[0074]Em uma forma da invenção, o método de tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão de um sujeito compreende administrar uma concentração terapeuticamente eficaz ou eficaz preventiva de um agente quelante inalado, na forma de uma ou mais doses de pelo menos 37,5 mg/dose, em que a ou cada dose do agente quelante é administrada durante um período não superior a 8h.

[0075]Em uma forma da invenção, o método de tratamento de inflamação no pulmão de um sujeito compreende administrar uma concentração terapeuticamente eficaz de um agente quelante inalado, na forma de uma ou mais doses de pelo menos 37,5 mg/dose, em que a ou cada dose do agente quelante é administrada por um período não superior a 8 horas.

[0076]Em uma forma da invenção, o método de prevenção de inflamação no pulmão de um indivíduo, administrando uma concentração eficaz preventiva de um em um agente quelante inalado, na forma de uma ou mais doses de pelo menos 37,5 mg/dose , em que a ou cada dose do agente quelante é administrada por um período não superior a 8h.

[0077]Em uma forma da invenção, o método de tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão de um sujeito compreende o tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão de um sujeito necessitado de tal tratamento.

[0078]O termo "quantidade terapeuticamente eficaz",

conforme usado aqui, significa uma quantidade da formulação, que quando administrada de acordo com um regime de dosagem desejado, é suficiente para pelo menos parcialmente atingir o efeito terapêutico desejado ou retardar o aparecimento de, ou inibir a progressão, interromper, parcial ou totalmente o início ou progressão da inflamação.

[0079]O termo "quantidade eficaz preventiva", como usado aqui, significa uma quantidade da formulação, que quando administrada de acordo com um regime de dosagem desejado, é suficiente para pelo menos parcialmente impedir ou retardar o início da inflamação.

[0080]Como aqui utilizado, "tratar" ou "tratamento" se refere à inibição da doença ou condição, isto é, interromper ou reduzir seu desenvolvimento ou pelo menos um sintoma clínico ou subclínico do mesmo. "Tratar" ou "tratamento" se refere ainda a aliviar a doença ou condição, ou seja, causar regressão da doença ou condição ou pelo menos um de seus sintomas clínicos ou subclínicos. O benefício para um sujeito a ser tratado é estatisticamente significativo ou pelo menos perceptível para o sujeito e/ou o médico. No contexto do tratamento da inflamação, o termo tratamento inclui a redução ou eliminação de uma ou mais infiltrações de leucócitos (incluindo macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares, linfócitos e outras células imunes); imunoglobulinas; citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e seus receptores; mediadores nocivos, como ROS e enzimas proteolíticas; Abundância e atividade de MMP; marcadores de tensão oxidativa; bem como hiperreatividade brônquica e exacerbações. O termo tratamento inclui ainda um ou mais de um aumento nas citocinas anti-inflamatórias e um aumento na função pulmonar (FEV1).

[0081]Com base no exposto, será entendido pelos versados na técnica que uma pluralidade de diferentes tratamentos e meios de administração podem ser utilizados para tratar um único sujeito. Assim, os sujeitos que já recebem tais medicações, por exemplo, ciprofloxacina intravenosa ou antibióticos, etc., podem se beneficiar da inalação das

formulações da presente invenção. Alguns sujeitos podem receber apenas as presentes formulações de uma alta concentração de um agente quelante por inalação. Esses sujeitos podem ter sintomas de fibrose cística, ser diagnosticados como tendo infecções pulmonares ou apresentar sintomas de uma condição médica, cujos sintomas podem se beneficiar da administração ao sujeito de uma alta concentração de um agente quelante. As formulações da invenção também podem ser utilizadas em diagnóstico. Em uma modalidade, por exemplo, um sujeito pode receber uma dose de uma formulação da invenção como parte de um procedimento para diagnosticar infecções pulmonares, em que um dos mais sintomas do sujeito melhora em resposta à formulação.

Forma de dosagem

[0082]A presente invenção fornece uma formulação inalável contendo uma alta concentração de um agente quelante.

[0083]A formulação inalável pode estar na forma de pó seco para inalação ou na forma nebulizada para inalação. Preferivelmente, a formulação é adaptada para inalação para tratar ou prevenir inflamação no pulmão.

[0084]Em uma modalidade, o agente quelante é um sal de cálcio do agente quelante. Preferivelmente, o agente quelante é CaEDTA.

[0085]Preferivelmente, a alta concentração de um agente quelante inalado é superior a 37,5 mg/dose. Preferivelmente, a alta concentração de um agente quelante inalado é superior a 50 mg/dose. Preferivelmente, o agente quelante de alta concentração é fornecido em uma forma de dosagem contendo entre 37,5 mg/dose e 300 mg/dose, entre 50 mg/dose e 300 mg/dose, entre cerca de 75 mg/dose e 200 mg/dose, entre cerca de 75 mg/dose e 100 mg/dose, entre cerca de 50 mg/dose e 200 mg/dose; preferivelmente cerca de 50 mg/dose, 75 mg/dose, 100 mg/dose, 200 mg/dose ou 300 mg/dose. O agente quelante é preferivelmente fornecido em uma forma de dose inalada contendo pelo menos 37,5 mg/dose. O agente

quelante é preferivelmente fornecido em uma forma de dose inalada contendo pelo menos 50 mg/dose.

[0086]A quantidade total de agente quelante inalado por dia é preferivelmente entre cerca de 37,5 mg/dia e 1.200 mg/dia, 50 mg/dia e 1.200 mg/dia, entre cerca de 100 mg/dia e 1.000 mg/dia, entre cerca de 300 mg/dia e 900mg/dia, entre cerca de 400mg/dia e 800mg/dia; preferivelmente cerca de 300 mg/dia, 500 mg/dia ou 600 mg/dia. O agente quelante pode ser administrado até uma dose total de até cerca de 1.200 mg/dia, preferivelmente pelo menos 150 mg/dia.

[0087]A quantidade total de agente quelante inalado por dia é preferivelmente entre cerca de 37,5 mg/dia e 1.200 mg/dia, cerca de 50 mg/dia e 1.200 mg/dia, entre cerca de 100 mg/dia e 1.000 mg/dia, entre cerca de 300 mg/dia e 900mg/dia, entre cerca de 400mg/dia e 800mg/dia; preferivelmente cerca de 150 mg/dia, 300 mg/dia, 500 mg/dia ou 600 mg/dia.

[0088]A quantidade total de agente quelante inalado por dia é preferivelmente entre cerca de 0,1 mg de agente quelante/kg de peso corporal e 15 mg de agente quelante/kg de peso corporal, entre cerca de 0,5 mg de agente quelante/kg de peso corporal e 10 mg de agente quelante/kg de peso corporal, entre cerca de 1,0 mg de agente quelante/kg de peso corporal e 5 mg de agente quelante/kg de peso corporal; entre cerca de 1,0 mg de agente quelante/kg de peso corporal e 3,5 mg de agente quelante/kg de peso corporal; preferivelmente cerca de 1,0 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 1,5 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 2,0 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 2,5 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 3,0 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 3,5 mg de quelante agente/kg de peso corporal, 4,0 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 4,5 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 5,0 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 10 mg de agente quelante/kg de peso corporal, 15 mg de agente quelante/kg de peso corporal.

[0089]Por exemplo, uma dose de 50 mg de CaEDTA pode

ser administrada como 4 ml de solução nebulizada a 33 mM (massa molecular $C_{10}H_{12}CaN_2Na_2O_8$ é 274,27 g/mol). Da mesma forma, uma dose de 75 mg pode ser administrada em 4 ml a 50 mM, ou uma dose de 100 mg pode ser administrada em 4 ml a 66 mM.

[0090] Preferivelmente, a formulação é administrada ao indivíduo em necessidade entre cerca de uma vez por dia a cerca de 6 vezes por dia, mais preferivelmente cerca de 4 vezes por dia.

[0091] Alternativamente, a formulação pode ser administrada ao indivíduo em necessidade por inalação contínua, por meio de um nebulizador. A formulação nebulizada pode ser administrada por 24 horas, 12 horas, preferivelmente, 8 horas, 6 horas, 4 horas, 2 horas ou 1 hora e cada uma dessas entregas (além de 24 e 12 horas) pode ser repetida várias vezes dentro de um período de 24 horas.

[0092] As formulações da invenção podem ser administradas a um indivíduo usando uma embalagem descartável e um dispositivo portátil, manual, alimentado por bateria, como o dispositivo AERx (Patente Nº 5.823.178, Aradigm, Hayward, Califórnia). Alternativamente, as formulações da presente invenção podem ser realizadas usando um dispositivo mecânico (não eletrônico). Outros dispositivos de inalação podem ser utilizados para fornecer as formulações, incluindo nebulizadores de jato convencionais, nebulizadores ultrassônicos, inaladores de névoa suave, inaladores de pó seco (DPIs), inaladores de dose medida (MDIs), geradores de aerossol de condensação e outros sistemas.

[0093] Para uso como aerossóis, os compostos da presente invenção em solução ou suspensão podem ser embalados em um recipiente de aerossol pressurizado junto com propulsores adequados, por exemplo, propulsores de hidrocarbonetos como propano, butano ou isobutano com adjuvantes convencionais. Um inalador de pó seco é um sistema operável com uma fonte de ar pressurizado para produzir partículas de pó seco de uma formulação farmacêutica que é compactada em um volume muito pequeno.

Para inalação, o sistema possui uma pluralidade de câmaras ou blisters, cada um contendo uma dose única da formulação farmacêutica e um elemento selecionado para liberar uma dose única.

[0094]Um aerossol pode ser criado forçando o fármaco através dos poros de uma membrana cujos poros têm um tamanho na faixa de cerca de 0,25 a 6 μm (Patente US 5.823.178). Quando os poros têm esse tamanho, as partículas que escapam através dos poros para criar o aerossol terão um diâmetro na faixa de 0,5 a 12 μm . As partículas do fármaco podem ser liberadas com um fluxo de ar destinado a manter as partículas dentro dessa faixa de tamanho. A criação de pequenas partículas pode ser facilitada pelo uso do dispositivo de vibração que fornece uma frequência de vibração na faixa de cerca de 800 a cerca de 4.000 quilohertz. Os versados na técnica compreenderão que alguns ajustes podem ser feitos nos parâmetros, como o tamanho dos poros dos quais o fármaco é liberado, a frequência de vibração, a pressão e outros parâmetros com base na densidade e viscosidade da formulação, tendo em mente que um objetivo de algumas modalidades é fornecer partículas em aerossol com um diâmetro na faixa de cerca de 0,5 a 12 μm .

Excipientes

[0095]As formas das formulações exemplificadas anteriormente aqui descritas podem ser fabricadas por métodos bem conhecidos dos versados na técnica da ciência das formulações. Além disso, as formulações aqui descritas podem incluir outros excipientes opcionais para auxiliar na fabricação e/ou administração das formulações aqui descritas. Os exemplos não limitantes de tais excipientes são bem conhecidos na técnica e incluem aromas, corantes, palatantes, antioxidantes, modificação da viscosidade, agentes de tonicidade, transportadores de fármacos, agentes de liberação sustentada, agentes de aumento de conforto, emulsificantes, auxiliares de solubilização, lubrificantes, ligantes agentes e outros agentes estabilizadores para auxiliar na fabricação e/ou administração das formulações.

[0096] Preferivelmente, a presente formulação é estéril. Em outra modalidade, a formulação da presente invenção é estável.

[0097] Além disso, podem ser adicionados agentes tamponantes para ajustar o nível de pH da formulação. Preferivelmente, as formulações da presente invenção contêm tris (hidroximetil) aminometano (TRIS, também conhecido como THAM, ou trometamina) como agente tampão. O TRIS pode ter um efeito adicional no aumento do efeito da morte bacteriana pelo EDTA. Preferivelmente, o TRIS é adicionado às formulações da presente invenção para tamponar a formulação e aumentar a eficácia do EDTA e/ou antibiótico no tratamento ou prevenção de infecções bacterianas.

[0098] Além disso, as formulações da presente invenção podem conter um conservante antimicrobiano.

[0099] Preferivelmente, o pH das formulações da presente invenção está entre cerca de 6,5 e 8,0, mais preferivelmente cerca de 7,0 e 7,4. Verificou-se anteriormente que as bactérias se tornam mais resistentes à terapia antimicrobiana quanto mais o pH cai. O pH preferível ajuda a evitar a resistência bacteriana às formulações contendo alta concentração de um agente quelante inalado em combinação com um antibiótico na ausência de nitrito acidificado.

[00100] Em uma modalidade alternativa, a formulação da presente invenção pode compreender um conservante, agente de suspensão, agente umectante, agente de tonicidade e/ou diluente. As formulações fornecidas neste documento podem compreender de cerca de 0,01% a cerca de 90%, ou cerca de 0,01% a cerca de 50%, ou cerca de 0,01% a cerca de 25%, ou cerca de 0,01% a cerca de 10% ou cerca de 0,01% a cerca de 5% de um ou mais fluidos de suspensão farmacologicamente adequados que são fisiologicamente aceitáveis por administração por inalação. Os fluidos farmacologicamente adequados para uso aqui incluem, entre outros, solventes polares, incluindo, entre outros, compostos que contêm grupos hidroxila ou outros grupos polares. Os solventes incluem, entre outros, água ou álcoois,

como etanol, isopropanol e glicóis, incluindo álcoois de propileno glicol, polietileno glicol, polipropileno glicol, éter glicol, glicerol e polioxietileno. Os solventes polares também incluem solventes próticos, incluindo, entre outros, água, soluções salinas aquosas com um ou mais sal(is) farmacologicamente aceitável(is), álcoois, glicóis ou uma mistura dos mesmos. Em uma modalidade alternativa, a água para uso nas presentes formulações deve atender ou exceder os requisitos regulatórios aplicáveis para uso em fármacos inalados.

[00101] Em uma modalidade, as formulações descritas neste documento podem ser aquosas e conter 0 a 90% de água. Em outras modalidades, as formulações aquosas aqui descritas podem conter 20 a 80% de água. Ainda em outras modalidades, as formulações aquosas podem conter 50 a 70% de água. A água pode ainda compreender água que é clara, destilada, estéril, desmineralizada ou desionizada.

[00102] Alternativamente, a formulação pode ser não aquosa e não conter água ou quantidades desprezíveis de água (por exemplo, abaixo de 1%, abaixo de 0,1%, abaixo de 0,01%).

[00103] Em uma modalidade, a formulação compreende ainda um ou mais veículos, diluentes ou excipientes farmacologicamente ou fisiologicamente aceitáveis.

[00104] Além ou no lugar da esterilização, as formulações da presente invenção podem conter um conservante farmacologicamente aceitável para minimizar a possibilidade de contaminação microbiana. Além disso, um conservante farmacologicamente aceitável pode ser usado nas presentes formulações para aumentar a estabilidade das formulações. Deve-se notar, no entanto, que qualquer conservante deve ser escolhido para a segurança da inalação, pois os tecidos tratados podem ser sensíveis a substâncias irritantes. Os conservantes adequados para uso neste documento incluem, entre outros, os que protegem a solução da contaminação com partículas patogênicas, incluindo álcool fenilético, cloreto de benzalcônio ou ácido benzoico ou benzoatos, tais como benzoato de sódio e álcool

feniletílico. Em certas modalidades, as formulações aqui compreendem de cerca de 0,001% a cerca de 10,0% p/p de cloreto de benzalcônio, ou de cerca de 0,01% v/p de álcool feniletílico. Os agentes de conservação também podem estar presentes em uma quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 1%, preferivelmente cerca de 0,002% a cerca de 0,02%, mais preferivelmente 0,02% em peso.

[00105] As formulações aqui fornecidas também podem compreender de cerca de 0,001% a cerca de 90%, ou cerca de 0,001% a cerca de 50%, ou cerca de 0,001% a cerca de 25%, ou cerca de 0,001% a cerca de 10% ou cerca de 0,001% a cerca de 1% de um ou mais agentes emulsificantes, umectantes ou agentes de suspensão. Tais agentes para uso neste documento incluem, entre outros, ésteres ou polissorbatos graxos de polioxietileno sorbitano, incluindo, entre outros, mono-oleato de polietileno sorbitano (Polissorbato 80), polissorbato 20 (monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano), triestearato de polissorbato 65 (polioxietileno (20) sorbitano), mono-oleato de polioxietileno (20) sorbitano, monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitano, monoestearato de polioxietileno (20) sorbitano; lecitinas; ágar; carragenina; goma de alfarroba; goma de guar; tragacanto; acácia; goma xantana; goma de karaya; pectina; pectina amidada; fosfatídeos de amônia; celulose microcristalina; metilcelulose; hidroxipropilcelulose; hidroxipropilmetilcelulose; etilmetilcelulose; carboximetilcelulose; sais de sódio, potássio e cálcio de ácidos graxos; mono- e di-glicéridos de ácidos graxos; ésteres de ácido acético de mono- e di-glicerídeos de ácidos graxos; ésteres de ácido láctico de mono- e di-glicerídeos de ácidos graxos; ésteres de ácido cítrico de mono- e di-glicerídeos de ácidos graxos; ésteres de ácido tartárico de mono- e di-glicerídeos de ácidos graxos; ésteres de ácido mono- e diacetiltartárico de mono- e di-glicerídeos de ácidos graxos; ésteres mistos de ácidos acético e tartárico de mono- e di-glicerídeos de ácidos graxos; ésteres de sacarose de ácidos graxos; sucroglicerídeos; ésteres de poliglicerol de ácidos graxos; ésteres de poliglicerol de ácidos graxos policondensados de

óleo de mamona; ésteres de propano-1,2-diol de ácidos graxos; estearoil-21-acilato de sódio; estearoil-2-lactilato de cálcio; tartarato de estearoil; monoestearato de sorbitano; tristearato de sorbitano; monolaurato de sorbitano; mono-oleato de sorbitano; monopalmitato de sorbitano; extrato de quillaia; ésteres de poliglicerol de ácidos graxos dimerizados do óleo de soja; óleo de soja polimerizado oxidativamente; e extrato de pectina.

[00106] As formulações da presente invenção podem compreender de cerca de 0,001% a cerca de 5% em peso de um umectante para inibir a secagem da membrana mucosa e impedir irritação. Qualquer um de uma variedade de umectantes farmacologicamente aceitáveis pode ser empregado, incluindo sorbitol, propileno glicol, polietileno glicol, glicerol ou suas misturas, por exemplo.

[00107] A formulação da presente invenção pode ainda compreender um adjuvante, como: um broncodilatador, outro agente anti-inflamatório, um surfactante, aspirina ou álcool etílico.

[00108] Os broncodilatadores utilizados opcionalmente nas formulações da invenção incluem, entre outros, agonistas do receptor β_2 -adrenérgico (como albuterol, bambuterol, salbutamol, salmeterol, formoterol, arformoterol, levosalbutamol, procaterol, indacaterol, carmoterol, milveterol, procaterol, indacaterol, carmoterol, milveterol, procaterol e terbutalina e semelhantes) e antimuscarínicos (como tróspio, ipratrópio, glicopirrônio, aclidínio e semelhantes). Combinações de fármacos podem ser usadas.

[00109] Os anti-inflamatórios adicionais que podem opcionalmente ser utilizados nas formulações da invenção incluem, entre outros, corticosteroides inalados (como beclometasona, budesonida, ciclesonida, fluticasona, etiprednol, mometasona e similares), antagonistas dos receptores de leucotrieno e inibidores da síntese de leucotrieno (como montelukaste, zileuton, ibudilast, zafirlukast, pranlukast, amelubant, tipelukast e semelhantes), inibidores da ciclo-oxigenase (como ibuprofeno, cetoprofeno,

cetorolaco, indometacina, naproxeno, zaltoprofeno, lornoxicam, piroxicam, ampiroxicam, cinnoxiam, diclofenac, felbinac, lornoxicam, mesalazina, triflusal, tinoridina, iguratimod, pamicogrel e semelhantes). Combinações de fármacos podem ser usadas. A aspirina também pode ser adicionada para atuar como um agente anti-inflamatório.

[00110] Os tensoativos abrangidos pela invenção incluem, entre outros, tensoativo sintético (Exosurf®), dipalmitoilfosfatidilcolina e ácido oleico. Combinações de fármacos podem ser usadas.

[00111] Antioxidantes como glutathione e vitamina E, zinco e sais de zinco de EDTA, podem ser adicionados.

[00112] O vapor de álcool etílico atua como um agente antiespumante nos pulmões e torna o escarro mais líquido, o que pode ajudar a respirar e reduzir o edema pulmonar. O etanol pode ser adicionado às formulações da presente invenção entre 0,5% e 60%, mais preferivelmente entre 1 e 40%, 1 e 20% ou 1 e 10%. O etanol pode ser adicionado a 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 55% ou 60%.

[00113] A invenção também se refere ao uso de uma alta concentração de um agente quelante inalado em combinação adicional com outros medicamentos administrados por inalação. Estes outros fármacos podem incluir uma sequência de nucleotídeos que pode ser incorporada em um vetor de entrega adequado, como um plasmídeo ou vetor viral. O outro fármaco pode ser uma sequência terapêutica de nucleotídeos (DNA, RNA, siRNA), enzimas para reduzir a viscoelasticidade do muco, como DNase e outros agentes mucolíticos, produtos químicos para regular positivamente o canal de íons cloreto ou aumentar o fluxo de íons através das células, nicotina, agonistas de P2Y2, inibidores de elastase, incluindo antitripsina α -1 (AAT), N-acetilcisteína, antibióticos e peptídeos catiônicos, como lantibióticos e especificamente duramicina, broncodilatadores de ação curta (por exemplo,

agonistas do receptor β 2-adrenérgico como albuterol ou indacaterol), antagonistas muscarínicos M3 (por exemplo, brometo de ipatrópio), abridores de canal K^+ , broncodilatadores de ação prolongada (por exemplo, formoterol, salmeterol), esteroides (por exemplo, budesonida, fluticasona, triamcinolona, beclometasona, ciclesonida, etc.), xantinas, antagonistas de leucotrienos (por exemplo, montelucaste de sódio), inibidores da fosfodiesterase 4, antagonistas do receptor de adenosina, outros anti-inflamatórios diversos (por exemplo, inibidores da Syk quinase (AVE-0950), inibidores da triptase (AVE-8923 & AVE-5638), antagonistas de taquicinina (AVE-5883), inibidores indutíveis de óxido nítrico sintase (GW-274150) e outros), chamarizes de fatores de transcrição, agonistas de TLR-9, oligonucleotídeos anti-sentido, siRNA, DNA, CGRP, lidocaína, β 2-agonistas inversos, terapias oxidativas anti-infecciosas, moduladores de citocinas (por exemplo, antagonistas do receptor CCR3 (GSK-766994, DPC-168, AZD-3778), inibidores da produção de TNF- α (LMP-160 e YS-TH2) e antagonistas da IL-4 (AVE-0309)), inibidores de pequenas moléculas de IgE, inibidores de moléculas de adesão celular (CAM), moléculas pequenas direcionadas ao receptor VLA4 ou integrina alfa.4.beta.1 (por exemplo, R-411, PS-460644, DW-908e e CDP-323), imunomoduladores, incluindo os que bloqueiam a sinalização de células T pela inibição da calcineurina (Tacrolimus), neutralizadores de heparina (Talactoferrina α), inibidores da PLA2 citosólica (Efipladib) ou combinações dos mesmos. Se o indivíduo em necessidade tiver CF, também podem ser administrados a eles medicamentos padrão como ivacaftor, pulmozyme, manitol ou outros medicamentos aprovados de acordo com a prática padrão, em combinação com as formulações da presente invenção.

[00114] A entrega dos produtos combinados pode ser alcançada combinando os medicamentos em uma formulação estável ou fornecendo os medicamentos em recipientes separados para serem combinados no momento da administração ou, alternativamente, pela entrega sequencial dos produtos.

[00115] Preferivelmente, as formulações da presente invenção são estáveis. Como aqui utilizado, a estabilidade das formulações aqui fornecidas se refere ao período de tempo a uma dada temperatura que é superior a 80%, 85%, 90% ou 95% da quantidade inicial de substância farmacológica, por exemplo, agente quelante e antibiótico, está presente na formulação. Por exemplo, as formulações aqui fornecidas podem ser armazenadas entre cerca de 15°C e cerca de 30 °C, e permanecem estáveis por pelo menos 1, 2, 12, 18, 24 ou 36 meses. Além disso, as formulações podem ser adequadas para administração a um indivíduo em necessidade após o armazenamento por mais de 1, 2, 12, 18, 24 ou 36 meses a 25 °C. Além disso, em outra modalidade alternativa, usando a Cinética de Arrhenius, mais de 80%, ou mais de 85%, ou mais de 90%, ou mais de 95% da quantidade inicial de substância do medicamento (por exemplo, agente quelante e antibiótico) permanece após armazenamento das formulações por mais de 1, 2, 12, 18, 24 ou 36 meses entre cerca de 15 °C e cerca de 30 °C.

[00116] Como aqui utilizado, a afirmação de que uma formulação é estável durante o "armazenamento em longo prazo" significa que a formulação é adequada para administração a um indivíduo em necessidade quando ela tem uma vida útil estimada superior a 1, 2 ou 3 meses de tempo de uso a 25 °C e superior a 1, 2 ou 3 anos de tempo de armazenamento a 5 °C. Em certas modalidades deste documento, usando a cinética de Arrhenius, > 80% ou > 85% ou > 90% ou >95% do agente quelante e antibiótico estimados permanecem após esse armazenamento.

[00117] O termo "inflamação", conforme usado aqui, significa um ou mais sinais da resposta do corpo a insultos, como infecção, agressões ambientais (incluindo fumaça de cigarro), trauma ou hipersensibilidade. A inflamação pode ser aguda ou crônica, e os sinais incluem inchaço dos tecidos, recrutamento de diferentes tipos de células inflamatórias, liberação de citocinas e mediadores e hiper-reatividade brônquica. A inflamação pode ser localizada, subclínica ou temporária, ou pode

ser mais disseminada e se tornar crônica. A inflamação pode incluir respostas imunes humorais e celulares e pode persistir após a remoção do insulto que o desencadeou. Os sinais de inflamação incluem, mas não estão limitados a, níveis elevados de células inflamatórias (por exemplo, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e mastócitos), níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-8$, e $IFN\gamma$) e seus receptores, proteases excessivas, incluindo MMPs, ROS e outros mediadores, e marcadores de inflamação, como proteína C reativa (CRP) e escarro e calprotectina sérica. A inflamação a curto prazo ("aguda") resultará em edema das vias aéreas, complacência pulmonar alterada, reatividade das vias aéreas e hipersecreção de muco, com sintomas clínicos que podem incluir aumento da frequência e dificuldade respiratórias, chiado, tosse e redução do FEV1 e, se persistir ("crônica"), levará a danos estruturais do parênquima da parede das vias aéreas e do pulmão na forma de fibrose, alterações císticas e bronquiectasias.

Métodos para fabricar um medicamento

[00118] O uso de uma alta concentração de um agente quelante na fabricação de uma formulação inalável para o tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão.

[00119] O uso de um agente quelante inalável na fabricação de um medicamento para a administração de uma alta concentração do agente quelante inalável como uma dose única para o tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão.

[00120] De preferência, o agente quelante de alta concentração é fornecido em uma forma de dosagem contendo pelo menos 37,5 mg/dose, pelo menos 50 mg/dose, ou entre 50 mg/dose e 300 mg/dose, ou entre 37,5 mg/dose e 300 mg/dose. O agente quelante pode ser administrado entre uma e quatro vezes ao dia, até uma dose total de até cerca de 1.200 mg/dia, preferivelmente pelo menos 150 mg/dia. Preferivelmente, o

agente quelante é CaEDTA.

Kits

[00121] A presente invenção fornece um kit para tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão contendo (i) uma formulação inalável contendo uma alta concentração de um agente quelante; e (ii) instruções de uso.

[00122] A presente invenção fornece um kit para tratamento ou prevenção de inflamação no pulmão contendo (i) uma formulação inalável capaz de fornecer uma alta concentração de um agente quelante inalável como dose única; e (ii) instruções de uso.

[00123] De preferência, o agente quelante de alta concentração é fornecido em uma forma de dosagem contendo pelo menos 37,5 mg/dose, pelo menos 50 mg/dose ou entre 37,5 mg/dose e 300 mg/dose, ou entre 50 mg/dose e 300 mg/dose. O agente quelante pode ser administrado entre uma e quatro vezes ao dia, até uma dose total de até cerca de 1.200 mg/dia, preferivelmente pelo menos 150 mg/dia. Preferivelmente, o agente quelante é CaEDTA.

[00124] Em uma modalidade, o kit da presente invenção compreende uma formulação compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma alta concentração de um agente quelante inalado. Numa modalidade alternativa, a formulação é pré-medida, pré-misturada e/ou pré-embalada. De preferência, a solução de inalação é estéril.

[00125] O kit da presente invenção também pode incluir instruções projetadas para facilitar a conformidade do usuário. As instruções, como aqui utilizadas, se referem a qualquer etiqueta, inserção, etc., e podem ser posicionadas em uma ou mais superfícies do material de embalagem ou as instruções podem ser fornecidas em uma folha separada ou em qualquer combinação dos mesmos. Por exemplo, em uma modalidade, o kit da presente invenção compreende instruções para administrar as formulações da presente invenção. Em uma modalidade, as instruções indicam que a

formulação da presente invenção é adequada para o tratamento de uma inflamação pulmonar. Tais instruções também podem incluir instruções sobre dosagem, bem como instruções para administração via nebulizador ou inalador de pó seco.

[00126] O agente quelante inalado e qualquer agente ativo podem ser embalados individualmente, de modo a permitir que um médico ou usuário formule cada um deles em uma formulação farmacêutica, conforme necessário. Alternativamente, a formulação farmacêutica compreendendo o agente quelante inalado e o qualquer agente ativo pode ser embalada em conjunto, requerendo assim uma formulação *de minimus* pelo médico ou usuário. De qualquer forma, a embalagem deve manter a integridade química, física e estética dos ingredientes ativos.

Geral

[00127] Os versados na técnica compreenderão que a invenção descrita neste documento é suscetível a variações e modificações diferentes das especificamente descritas. A invenção inclui todas essas variações e modificações. A invenção também inclui todas as etapas, características, formulações e compostos referidas ou indicadas neste relatório descritivo, individual ou coletivamente, e quaisquer e todas as combinações ou quaisquer duas ou mais das etapas ou características.

[00128] Cada documento, referência, pedido de patente ou patente citados neste texto é expressamente incorporado neste documento em sua totalidade por referência, o que significa que deve ser lido e considerado pelo leitor como parte deste texto. Que o documento, referência, pedido de patente ou patente citados neste texto não são repetidos neste texto é meramente por razões de concisão.

[00129] Todas as instruções, descrições, especificações do produto e folhas de produtos do fabricante para quaisquer produtos mencionados neste documento ou em qualquer documento incorporado por referência neste documento são aqui incorporados por

referência e podem ser utilizados na prática da invenção.

[00130] A presente invenção não deve ser limitada no seu escopo por nenhuma das modalidades específicas aqui descritas. Essas modalidades são destinadas apenas para fins de exemplificação. Os produtos, formulações e métodos funcionalmente equivalentes estão claramente dentro do escopo da invenção como descrita neste documento.

[00131] A invenção aqui descrita pode incluir uma ou mais faixas de valores (por exemplo, tamanho, deslocamento e intensidade do campo etc.). Uma faixa de valores deve ser entendida como incluindo todos os valores dentro da faixa, incluindo os valores que definem a faixa e os valores adjacentes à faixa que levam ao mesmo ou substancialmente o mesmo resultado que os valores imediatamente adjacentes ao valor que define o limite para a faixa. Nesse sentido, a menos que indicado o contrário, os parâmetros numéricos estabelecidos no seguinte relatório descritivo e nas reivindicações são aproximações que podem variar dependendo das propriedades desejadas a serem obtidas pela presente invenção. Por isso, "cerca de 80%" significa "cerca de 80%" e também "80%". Pelo menos, cada parâmetro numérico deve ser interpretado à luz do número de dígitos significativos e abordagens de arredondamento comuns.

[00132] Ao longo do relatório descritivo, a menos que o contexto indique de outra forma, a palavra "compreender", ou variações, tais como "compreende" ou "compreendendo", serão entendidas como implicando a inclusão de um inteiro ou grupo de inteiros declarados, mas não a exclusão de qualquer outro inteiro ou grupo de inteiros. Nota-se também que nesta divulgação e particularmente nas reivindicações e/ou parágrafos, termos como "compreende", "compreendido", "compreendendo" e semelhantes podem ter o significado atribuído a eles na lei de patentes dos EUA; por exemplo, eles podem significar "inclui", "incluído", "incluindo" e semelhantes; e que termos como "consistindo essencialmente em" e "consiste essencialmente em" têm o significado atribuído a eles na lei de patentes dos EUA, por exemplo, permitem

elementos não recitados explicitamente, mas excluem elementos encontrados na técnica anterior ou que afetam uma característica básica ou nova da invenção.

[00133] Outras definições para os termos selecionados usados neste documento podem ser encontradas dentro da descrição detalhada da invenção e aplicáveis ao longo da mesma. A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado como comumente entendido por uma pessoa versada na técnica à qual a invenção pertence. O termo "agente ativo" pode significar um agente ativo ou pode abranger dois ou mais agentes ativos.

[00134] Os seguintes exemplos servem para descrever mais completamente o modo de utilização da invenção acima descrita, bem como para estabelecer os melhores modos contemplados para a realização de vários aspectos da invenção. Entende-se que estes métodos de forma alguma servem para limitar o verdadeiro alcance desta invenção, mas sim são apresentados para fins ilustrativos.

EXEMPLOS

[00135] Outras características da presente invenção são descritas mais detalhadamente nos seguintes Exemplos não limitantes. Esta descrição é incluída apenas para fins de exemplificação da presente invenção. Eles não devem ser entendidos como uma restrição na divulgação ou descrição geral da invenção, conforme estabelecido anteriormente.

Exemplo 1: Método de tratamento ou prevenção de infecção no pulmão, administrando uma alta concentração de um agente quelante inalado

[00136] Os biofilmes foram cultivados em um modelo realista *in vitro* usando gotas suspensas de muco de fibrose cística colhidas a partir de linhagens celulares epiteliais (Haley *et al.* *BMC Microbiol* 2012 12:181). Culturas de uma cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa* (MIC

tobramicina >256 $\mu\text{g/ml}$) foram cultivadas em fase estacionária tardia em M63 sem fonte de carbono para imitar a limitação de nutrientes.

[00137] Gotas de muco ($5\mu\text{l}$) foram suspensas a partir de uma lamela de IBIDI invertida e inoculadas com 10^3 unidades formadoras de colônias (CFU), depois incubadas em ambiente umidificado a 35°C por 72 horas para permitir o desenvolvimento de biofilme. As gotas foram então tratadas por 5 min com tobramicina nebulizada (20 mg/ml), partículas CaEDTA em aerossol (10 mg/ml) ou ambas. Os controles foram tratados com uma solução 50/50 salina/água a 0,9% nebulizada. Após o tratamento, as gotas foram incubadas por 16 horas, depois coradas com BacLight LIVE/DEAD ($1\mu\text{l}$), e fixadas em vapor de paraformaldeído por 30 min. Os biofilmes foram visualizados usando microscopia confocal.

[00138] A Figura 1A mostra biofilmes espessos e robustos com células principalmente vivas (verde) após tratamento com solução salina nebulizada. Como esperado com uma cepa resistente, o tratamento com tobramicina sozinha tem pouco efeito na viabilidade. Somente o EDTA causa algum grau de morte (glóbulos vermelhos). Surpreendentemente, uma combinação de tobramicina e EDTA mata a grande maioria das células de biofilme. A Figura 1B mostra uma representação quantitativa das imagens de microscopia na Figura 1A. Os biofilmes de controle foram de 1×10^8 CFU/ml, enquanto os biofilmes tratados com EDTA-tobramicina foram reduzidos em >6 ordens de grandeza para $<10^2$ CFU/ml.

[00139] Pacientes com CF com idade ≥ 6 anos internados no hospital com exacerbação foram randomizados para receber EDTA ou salina (placebo), além do tratamento usual de antibióticos intravenosos e tobramicina nebulizada. O EDTA foi administrado juntamente com tobramicina como uma solução nebulizada de 4 ml de CaNa_2EDTA 50 mM, Tris 111 mM em solução salina a 0,9%, pH 7,1. Após a randomização, os pacientes foram tratados no hospital por duas semanas, durante a qual

receberam o tratamento quatro vezes ao dia (300 mg de EDTA/dia ou até 3,3 mg de EDTA/kg/dia). Os pacientes receberam alta e o tratamento foi continuado duas vezes ao dia por quatro semanas. Os pacientes foram monitorados por mais quatro semanas, elevando o tempo total do estudo para 10 semanas.

[00140] O escarro foi induzido com solução salina hipertônica nebulizada a 3% a 8-10 L/min por ≥ 5 minutos. As amostras foram coletadas antes do tratamento e em 2, 6 e 10 semanas, processadas de acordo com o protocolo relevante e armazenadas a -80°C . O muco foi dissecado do escarro claro misturado com Sputalisina (1 ml por grama de escarro), submetido a vórtice e incubado por uma hora, depois colocado no meio de armazenamento Skim Milk Glicerol e armazenado a -80°C .

[00141] As amostras de escarro foram obtidas por expectoração de indivíduos na triagem inicial, depois na Visita 3 (após cerca de 2 semanas), Visita 5 (6 semanas) e finalmente no acompanhamento (10 semanas). O muco foi dissecado do escarro límpido, tratado com Esputolisina (1 ml por grama de escarro) e colocado em meio de armazenamento Skim Milk Glicerol (1 ml/100mg de muco), misturado por vórtice e armazenado a -80°C

[00142] As amostras foram descongeladas em gelo, diluições em série foram feitas no máximo 10^{-7} da concentração original e 20 μL de cada diluição foram colocados em cada uma das três placas de cultura de ágar de McConkey (McC) ou ágar de Sangue (BA). As placas foram incubadas a 35°C .

[00143] *Pseudomonas spp.* foram definidas como colônias negativas de lactose rosa claro ou muito pálido em placas de ágar McC. As colônias de morfologia aproximada tinham um brilho metálico e bordas ásperas das colônias, as colônias de morfologia suave cresciam lentamente com limites regulares de colônia no ágar de McC e as colônias de morfologia mucoide eram cercadas por grandes quantidades de alginato, secretadas pelas

bactérias.

[00144] Os números de colônias ásperas, lisas e mucoides foram contados em 24 horas em placas de ágar de McC e BA, as placas foram incubadas por mais 24 horas e foram feitas contagens confirmatórias de cada morfologia das colônias. Colônias únicas de cada morfologia presente em cada amostra foram colhidas e riscadas em placas de BA para obter culturas puras.

[00145] Uma identificação adicional foi feita por coloração de Gram para confirmar que o isolado consistia em células Gram-negativas em forma de bastonete e confirmação de um status positivo de oxidase, esfregando uma pequena parte de uma colônia em uma tira de teste de oxidase. O rápido desenvolvimento de uma cor azul intensa indica um isolado positivo oxidativo.

[00146] A confirmação de *Pseudomonas spp.* foi realizada testando a resistência ao antibiótico C390. Discos impregnados com antibiótico foram colocados em uma placa de Ágar nutritivo (NA) espalhada com uma suspensão do isolado puro em solução salina tamponada com fosfato (PBS) até uma densidade de McFarland de 0,5. A ausência de qualquer zona de inibição ao redor do disco após incubação durante a noite a 35°C indica resistência ao antibiótico. Colônias únicas de *Pseudomonas spp.* foram confirmadas (provavelmente *P. aeruginosa*) de cada tipo morfológico presente em cada isolado foram colhidos e ressuspensos em glicerol/meio de armazenamento de soro e armazenadas a -80°C. A Figura 2 mostra a mudança na contagem de colônias para *P. aeruginosa* (McC) em 2 e 6 semanas, em comparação com o início do tratamento. Após duas semanas de tratamento, a redução na contagem de colônias foi >400 vezes no grupo de EDTA, em comparação com 4,5 vezes no grupo placebo.

Exemplo 2: O tratamento da inflamação pulmonar resulta em um aumento dependente da dose no FEV1

[00147] Os sujeitos com CF com idade ≥ 6 anos

internados no hospital com exacerbação foram randomizados para receber EDTA ou soro fisiológico (placebo), além do tratamento usual de antibióticos intravenosos e tobramicina nebulizada. O EDTA foi administrado em conjunto com tobramicina como uma solução nebulizada de 4 ml de CaEDTA 50 mM, Tris 111 mM em solução salina a 0,9%, pH 7,1. Após a randomização, os pacientes foram tratados no hospital por duas semanas, durante as quais receberam o tratamento quatro vezes ao dia (300mg EDTA/dia). Após a alta, o tratamento foi continuado duas vezes por dia durante quatro semanas. Os indivíduos foram monitorados por mais quatro semanas, elevando o tempo total do estudo para 10 semanas.

[00148] Em cada visita de estudo, a função pulmonar era medida por espirometria. Os dados foram registrados como a melhor de três tentativas e os resultados foram expressos em % do previsto.

[00149] A Figura 3A mostra a alteração média no FEV1 para ambos os grupos em 2, 6 e 10 semanas após o início do tratamento. O aumento médio do FEV1 após 2 semanas foi de 16% no grupo EDTA versus 5% no grupo placebo. Esta diferença persistiu quatro semanas após o tratamento ter sido completado com um aumento de 7% no grupo de EDTA versus 2% no grupo placebo. Isso demonstra uma clara melhora na função pulmonar no grupo de EDTA, mas pouca mudança no grupo placebo. A Figura 3B mostra uma correlação inversa entre a melhoria de FEV1 e o peso corporal no grupo de EDTA ($R^2 = 0,70$), mas nenhuma correlação no grupo placebo tratado com tobramicina isolada ($R^2 = 0,01$). Isso mostra que o EDTA tem um efeito dependente da dose na função pulmonar (mg de EDTA/kg de peso corporal).

[00150] A Figura 4 mostra que a administração de 75 mg de CaEDTA aos pulmões resulta em concentrações máximas de 0,41-1,34 mM de EDTA 5 minutos após a dose

Exemplo 3: A inflamação pulmonar induzida pela fumaça do cigarro pode ser tratada pela administração de uma dose alta de quelante

aos pulmões

[00151] O efeito de um quelante na inflamação pulmonar foi testado em um modelo de camundongo com doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD). Sabe-se que a fumaça do cigarro induz inflamação pulmonar, que pode ser medida pelo aumento da contagem de leucócitos e aumento do peso pulmonar.

[00152] Camundongos machos BALB/c (8 em cada grupo) foram expostos a uma dose medida de fumaça de cigarro durante um período de duas semanas (3 cigarros, 3 vezes por dia de segunda a sexta-feira) ou ar ambiente filtrado. Os camundongos foram tratados por via intranasal com o quelante de ferro deferoxamina (DFO, 3,8 mg em 50 µl) ou veículo três vezes ao dia, 30-60 minutos antes de cada exposição à fumaça de cigarro durante o experimento. Os camundongos foram então terminados e as vias aéreas e os pulmões foram avaliados quanto aos efeitos na inflamação induzida pela fumaça do cigarro e nas concentrações de elementos.

[00153] O líquido de lavagem broncoalveolar (BALF) foi coletado (aproximadamente 1 ml/camundongo) e os pulmões foram removidos cirurgicamente e pesados. O número total de células viáveis no BALF foi determinado pela mistura de volumes iguais de azul de tripano ao BALF e contado manualmente em um hemocitômetro de Neubauer padrão usando um microscópio de fluorescência de axioscópico Zeiss. O ferro foi medido por análise elementar usando espectrometria de massa plasmática acoplada induzida por ablação a laser (LA-ICP-MS) e quantificado em comparação com padrões de conteúdo de metal conhecido.

[00154] A Figura 5 mostra que, como esperado, a fumaça do cigarro aumenta significativamente o número total de leucócitos de BALF. O tratamento com o quelante de ferro de DFO reduz significativamente esse efeito.

[00155] De acordo com isso, a Figura 6 mostra que o peso médio do pulmão aumenta significativamente com o tratamento com

fumaça de cigarro, mas o tratamento com CFO protege contra esse efeito.

[00156] Como mencionado anteriormente, Stites et al. (*Am J Respir Crit Care Med.* 1999 160(3):796-80) mostraram que os níveis de ferro são muito elevados nos pulmões de pacientes com CF, bem como nos pulmões de fumantes, em comparação com indivíduos saudáveis. A Figura 7 (esquerda) confirma que os níveis médios de ferro aumentaram significativamente no BALF de camundongos expostos à fumaça do cigarro, e que o tratamento com DFO reduz o teor médio de ferro de BALF. A Figura 7 (à direita mostra que em seis dos sete camundongos tratados com DFO (um foi perdido por razões não relacionadas ao tratamento), o teor de ferro de BALF estava no mesmo nível que o dos camundongos expostos ao ar.

Exemplo profético P1: estudo in vivo do efeito de uma alta dose de agente quelante de pó seco na infecção, inflamação e tensão oxidativa

[00157] Os indivíduos com CF que necessitam de tratamento com tobramicina em pó seco serão alocados em quatro coortes e receberão 112 mg de pó seco duas vezes por dia durante 28 dias. Além disso, a Coorte 1 (pacientes > 18 anos) receberá doses crescentes de pó seco CaEDTA (37,5 mg BID por 1 semana; 75 mg BID por 2 semanas, 150 mg BID por 1 semana). A coorte 2 (pacientes > 18 anos) receberá CaEDTA (37,5 mg duas vezes por 1 semana; 75 duas vezes por 2 semanas; 75 mg duas vezes por 1 semana). A coorte 3 (pacientes de 12 a 18 anos) receberá CaEDTA (37,5 mg BID por 1 semana; 75 mg BID por 2 semanas, 150 mg BID por 1 semana). Finalmente, uma coorte observacional receberá tobramicina sozinha por 28 dias.

[00158] As amostras de escarro serão coletadas semanalmente e avaliadas quanto a marcadores de infecção e inflamação. As bactérias serão monitoradas pela contagem de colônias de escarro. Como uma medida de dano estrutural, os níveis de metaloproteinases da matriz (MMPs) e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) são medidos usando zimografia de gelatina e imunoenaios, respectivamente, conforme descrito

anteriormente (Gaggar *et al.*, *Eur Respir J.* 2011 38(3): 721–727; Garratt *et al.*, *Eur Respir J.* 2015 46(2):384-94). A quantidade de ferro no escarro é quantificada pelo ICP-MS, como descrito anteriormente (Hunter *et al.*, *MBio.* 2013 4(4):1-8). A quantidade de proteínas de ligação ao ferro é avaliada usando imunoenaios. A atividade da mieloperoxidase também é avaliada como uma medida da inflamação neutrofílica, conforme descrito anteriormente (Gaggar *et al.*, *Eur Respir J.* 2011 38(3): 721–727). A 3-clorotirosina é medida como um biomarcador do potente ácido hipocloroso oxidante. Os níveis são medidos usando cromatografia de gás de diluição isotópica estável com espectrometria de massa (Gaggar *et al.*, *Eur Respir J.* 2011 38(3): 721–727). As carbonilas proteicas são medidas como um indicador de espécies reativas de oxigênio (ROS) usando um kit de imunoenensaio comercial (Gaggar *et al.*, *Eur Respir J.* 2011 38(3): 721–727). A tensão oxidativa é avaliada medindo a glutathiona (GSSG e GSH) usando imunoenaios como descrito anteriormente (Kettle *et al.*, *Eur Respir J.* 2014 44(1):122-9). A expressão gênica de marcadores de estresse inflamatório e oxidativo (por exemplo, IL-8, IL-6, TNF α) também será monitorada por Nanostring, e as proteínas serão medidas por ELISA. A tensão oxidativa também pode ser medido por meio de metabólitos, como o molondialdeído (ensaio colorimétrico) ou o 8-isoprostano (ELISA). O ferro será medido por análise elementar usando espectrometria de massa plasmática acoplada induzida por ablação a laser (LA-ICP-MS).

[00159] Espera-se que este experimento mostre uma redução nos marcadores inflamatórios no grupo de EDTA em comparação com o grupo placebo e uma diminuição nos níveis de ferro. Seria de esperar ainda que este experimento mostrasse uma mudança no equilíbrio entre MMPs e TIMPs, especialmente MMP-9 e TIMP-1, os quais estão associados à progressão das bronquiectasias.

Seria de esperar que o experimento mostrasse uma redução da carga bacteriana no escarro e um aumento no FEV1 em indivíduos tratados com EDTA em comparação com pacientes controle.

Exemplo profético P2: estudo in vitro do efeito de altas doses de agente quelante na inflamação, dano pulmonar e tensão oxidativa

[00160] As células epiteliais do pulmão são cultivadas em cultura de tecidos e inflamação induzida pela exposição ao Fe(II) ou excesso de oxigênio. As células são tratadas com CaEDTA (0, 1, 5, 10, 25, 50 mM) por 30 min, 1, 3, 24 e 48 horas.

[00161] Os imunoenaios são usados para monitorar a alteração dos marcadores inflamatórios, como IL-6, IL-8, TNF- α , elastase de neutrófilos e outros. A tensão oxidativa e a toxicidade são medidos avaliando os níveis reduzidos de glutathione (GSH) e a apoptose com base em um ensaio de TUNEL, ambos usando kits de ensaios comerciais, como o ThermoFisher Scientific's *Glutathione Fluorescent Detection Kit* and BioVision Inc's *TUNEL DNA Fragmentation Assay Kit*.

[00162] Seria de esperar que este experimento mostrasse uma redução dependente da concentração nos marcadores inflamatórios nas células tratadas com EDTA em comparação com os controles; uma redução no GSH indicando uma redução nas espécies reativas de oxigênio nas células tratadas com EDTA em comparação com os controles; e apoptose reduzida, medida pelo ensaio de TUNEL, em células tratadas com EDTA em comparação com os controles.

Exemplo profético P3: estudo in vivo do efeito de altas doses de agente quelante nebulizado na inflamação, danos nos pulmões e tensão oxidativa

[00163] Os sujeitos com CF com idade ≥ 6 anos internados no hospital com exacerbação são randomizados para receber EDTA ou solução salina nebulizada (placebo), além do tratamento usual de antibióticos intravenosos e tobramicina nebulizada. O EDTA é administrado juntamente com a tobramicina como uma solução nebulizada de 4 ml de CaEDTA 50 mM, Tris 111 mM em solução salina a 0,9%, pH 7,1.

[00164] Após a randomização, os pacientes são tratados no hospital por duas semanas, durante o qual recebem o tratamento quatro vezes ao dia (300 mg de EDTA/dia ou até 3,3 mg de EDTA/kg/dia). Os sujeitos são então dispensados e o tratamento continua duas vezes por dia, durante quatro semanas. Os sujeitos são monitorados por mais quatro semanas, elevando o tempo total do estudo para 10 semanas. O escarro é coletado por indução com solução salina hipertônica nebulizada a 3% a 8-10 L/min por ≥ 5 minutos. As amostras são coletadas antes do tratamento e nas 2, 6 e 10 semanas, processadas de acordo com o protocolo relevante e armazenadas a -80°C .

- Expressão de marcador inflamatório

[00165] O escarro expectorado é armazenado em RNAlater®, o RNA total é extraído usando um kit de extração Qiagen RNEasy® ou similar, convertido em cDNA e marcadores inflamatórios monitorados usando qPCR, como descrito por Sivaneson et al. (Mol Microbiol 79, 1353-1366) e quantificados em relação a genes conhecidos de manutenção, como actina e/ou GAPDH.

[00166] Seria de esperar que este experimento mostrasse uma redução média na expressão gênica de marcadores inflamatórios no grupo de EDTA em comparação com o grupo placebo.

- Dano celular, ferro livre e tensão oxidativa

[00167] O escarro expectorado é congelado diretamente sem processamento e analisado para marcadores inflamatórios como acima. Como uma medida de dano estrutural, os níveis de metaloproteinases da matriz (MMPs) e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) são medidos usando zimografia de gelatina e imunoenaios, respectivamente, conforme descrito anteriormente (Gaggar et al., *Eur Respir J.* 2011 38(3): 721–727; Garratt et al., *Eur Respir J.* 2015 46(2):384-94). A quantidade de ferro no escarro é quantificada pelo ICP-MS, como descrito anteriormente (Hunter et al., *MBio.* 2013 4(4):1-8). A quantidade

de proteínas de ligação ao ferro é avaliada usando imunoenaios. A tensão oxidativa é avaliada medindo a glutathiona (GSSG e GSH) usando imunoenaios como descrito anteriormente (Kettle *et al.*, *Eur Respir J.* 2014 44(1):122-9).

[00168] Seria de esperar que este experimento mostrasse uma redução nos marcadores inflamatórios no grupo de EDTA em comparação com o grupo placebo. Seria de esperar ainda que este experimento mostrasse uma mudança no equilíbrio entre MMPs e TIMPs, especialmente MMP-9 e TIMP-1, os quais estão associados à progressão das bronquiectasias.

Exemplo profético P4: estudo in vivo do efeito de uma alta dose de agente quelante na inflamação, dano pulmonar e tensão oxidativa

[00169] É realizado um estudo cruzado, randomizado, duplo-cego, em centro único, de indivíduos com fibrose cística. Os indivíduos são randomizados para tratamento com CaEDTA inalado ou solução salina (placebo) por duas semanas. Isto é seguido por um período de lavagem e depois duas semanas do outro tratamento (EDTA ou placebo).

[00170] Os níveis de ferro, marcadores inflamatórios, MMP/TIMP e FEV1 são monitorados como acima. A atividade da mieloperoxidase também é avaliada como uma medida da inflamação neutrofílica, conforme descrito anteriormente (Gaggar *et al.*, *Eur Respir J.* 2011 38(3): 721–727). A 3-clorotirosina será medida como um biomarcador do potente ácido hipocloroso oxidante. Os níveis são medidos usando cromatografia de gás de diluição isotópica estável com espectrometria de massa (Gaggar *et al.*, *Eur Respir J.* 2011 38(3): 721–727). As carbonilas proteicas são medidas como um indicador de espécies reativas de oxigênio (ROS) usando um kit de imunoenensaio comercial (Gaggar *et al.*, *Eur Respir J.* 2011 38(3): 721–727).

[00171] Seria de esperar que este experimento mostrasse níveis reduzidos de marcadores de ferro e inflamatórios, um

equilíbrio alterado de MMP/TIMP e aumento do FEV1 médio em indivíduos tratados com EDTA em comparação com placebo. Seria de esperar ainda que esta experiência mostrasse atividade reduzida de mieloperoxidase e níveis médios mais baixos de clorotirosina e carbonilas.

[00172] Os dados clínicos demonstram eficácia em 300 mg/dia por duas semanas. O mesmo estudo demonstra que 150 mg/dia (75 mg BID) é benéfico para a função pulmonar e infecção (Figura 2 para contagens bacterianas reduzidas; Figura 3A para melhora da função pulmonar). Dada a magnitude significativa da melhora (FEV1 médio de 16% pontos), como seria entendido por versados na técnica, é altamente provável que doses muito mais baixas sejam eficazes, ou seja, 75 mg/dia (37,5 mg BID), conforme previsto pelo Exemplo Profético P1.

[00173] A Figura 4 mostra que uma dose única de 75 mg de CaEDTA resulta em até 1,34 mM de EDTA dentro dos tampões de muco após 30 minutos. Sabe-se que a penetração de fármacos como tobramicina no escarro de FC é significativamente retardada (Kuhn, R.J. (2001). Formulation of aerosolized therapeutics. *Chest* 120, 94S-98S), e a concentração de EDTA no líquido da superfície das vias aéreas é, portanto, mais provavelmente substancialmente mais alto que a do centro. Portanto, seria razoável esperar que uma dose diária de 37,5 mg (4 vezes menor que a dose mais baixa com benefícios clínicos) demonstrasse eficácia em um estudo completo. Este seria especialmente o caso em pacientes mais jovens que recebem uma dose mais alta por peso corporal e geralmente mostram uma resposta maior no FEV1 (Figura 3B).

[00174] Numerosas variações e modificações dos modos descritos acima de realizar as várias modalidades desta invenção serão evidentes para os versados na técnica, com base nos ensinamentos acima relacionados à invenção divulgada, sem se distanciar dos conceitos inventivos básicos. As modalidades da invenção acima são meramente exemplificativas e não devem ser interpretadas como limitativas, e todas essas variações e

modificações devem ser consideradas dentro do escopo da presente invenção, cuja natureza deve ser determinada a partir da descrição anterior.

[00175] O trabalho nesta invenção foi apoiado por prêmios da Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratar ou prevenir inflamação no pulmão, **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar uma alta concentração de um agente quelante inalado.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a concentração de agente quelante é maior do que 37,5 mg/dose.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que a concentração de agente quelante é maior do que 50 mg/dose.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que o agente quelante é fornecido numa forma de dosagem contendo entre 37,5 mg/dose e 300 mg/dose.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 **caracterizado** pelo fato de que o agente quelante é fornecido numa forma de dosagem contendo entre 50 mg/dose e 300 mg/dose.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o agente quelante é fornecido até a uma dose total de cerca de 1,200 mg/dia.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o agente quelante é CaEDTA.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o tratamento ou prevenção de inflamação resulta em um aumento em FEV.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o tratamento ou a prevenção de inflamação está associada com uma diminuição em atividade de MMP.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o tratamento ou a prevenção de inflamação está associada com uma diminuição na produção de radicais hidroxil.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o agente quelante é combinado com tris(hidroximetil)aminometano (TRIS).

12. Formulação inalável, **caracterizada** pelo fato de que contém uma alta concentração de um agente quelante.

13. Formulação, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizada** pelo fato de que a concentração de agente quelante é maior do que 37,5 mg/dose.

14. Formulação, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizada** pelo fato de que a concentração de agente quelante é maior que 50 mg/dose.

15. Formulação, de acordo com a reivindicação 13 ou 14, **caracterizada** pelo fato de que a concentração de agente quelante está entre 37,5 mg/dose e 300 mg/dose.

16. Formulação, de acordo com a reivindicação 13 ou 14, **caracterizada** pelo fato de que a concentração de agente quelante está entre 50 mg/dose e 300 mg/dose.

17. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 16, **caracterizada** pelo fato de que o agente quelante é fornecido até a uma dose total de cerca de 1,200 mg/dia.

18. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 17, **caracterizada** pelo fato de que o agente quelante é CaEDTA.

19. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 18, **caracterizada** pelo fato de que o agente quelante é combinado com tris(hidroximetil)aminometano (TRIS).

20. Kit para tratar ou prevenir inflamação no pulmão, **caracterizado** pelo fato de que contém (i) uma formulação inalável contendo uma alta concentração de um agente quelante; e (ii) instruções para uso.

21. Uso de uma alta concentração de um agente quelante, **caracterizado** pelo fato de que é para a fabricação de uma formulação inalável para tratar ou prevenir inflamação no pulmão.

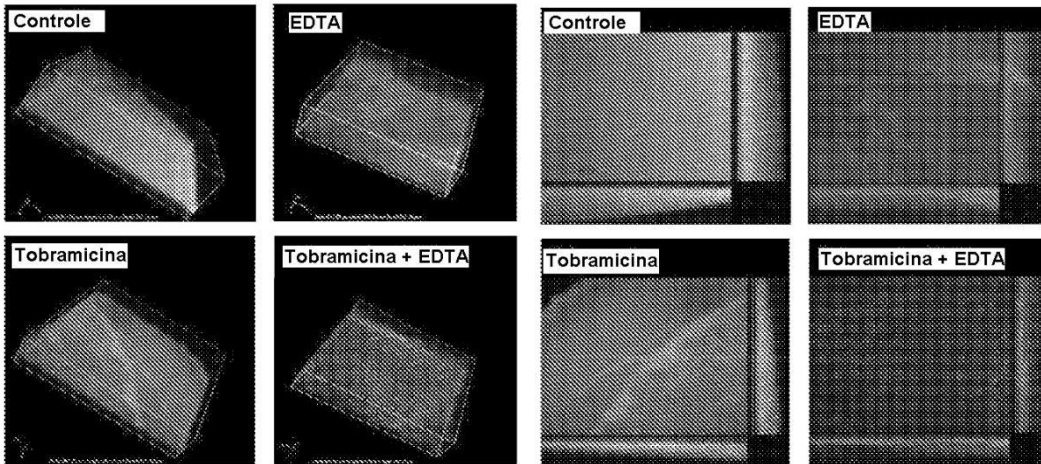


Figura 1A

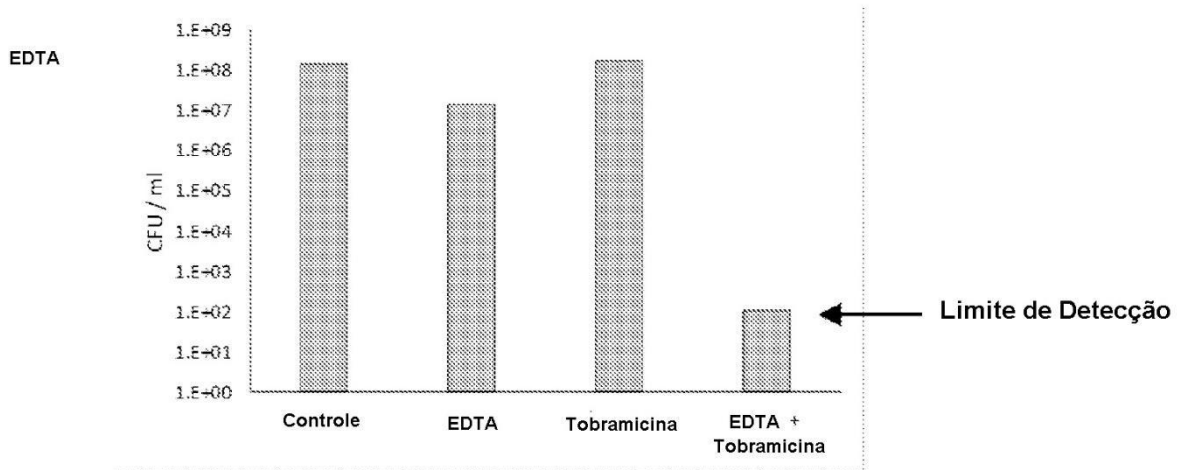
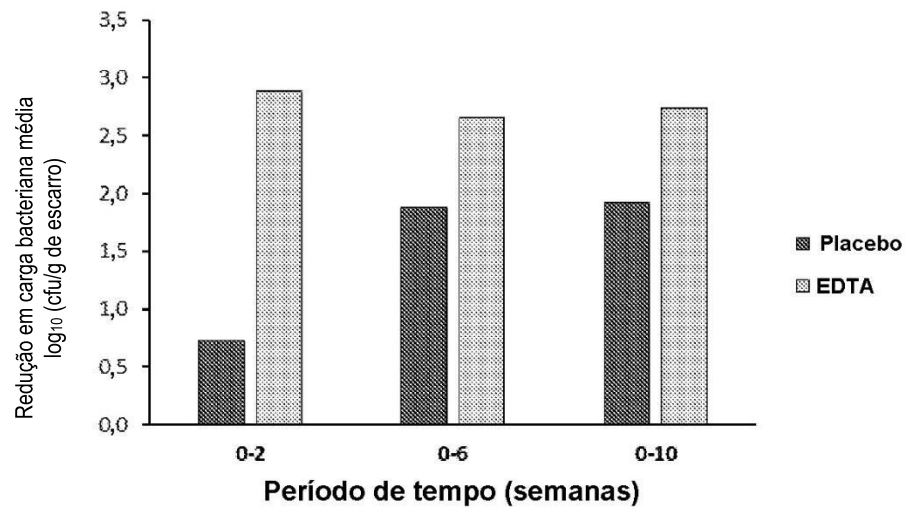


Figura 1B

**Figura 2**

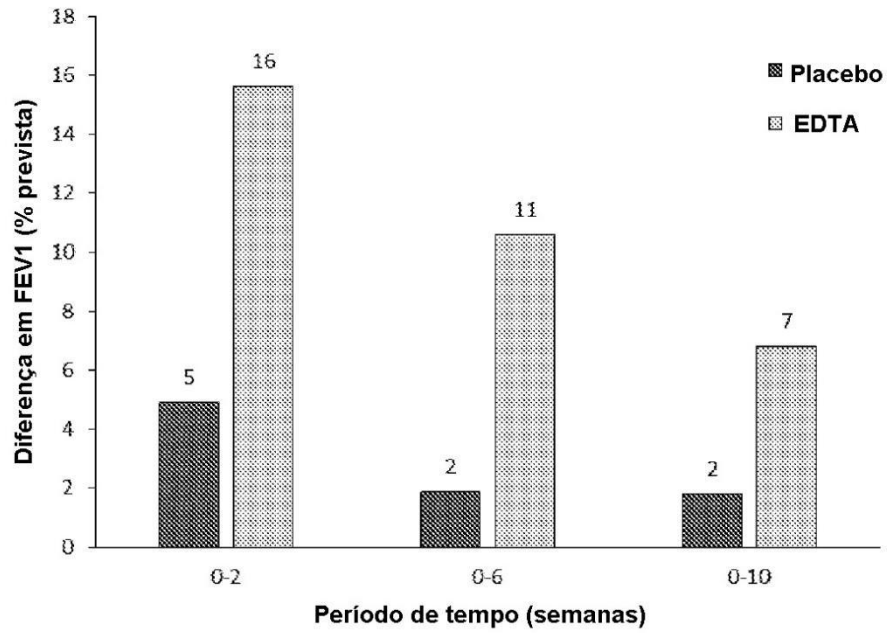


Figura 3A

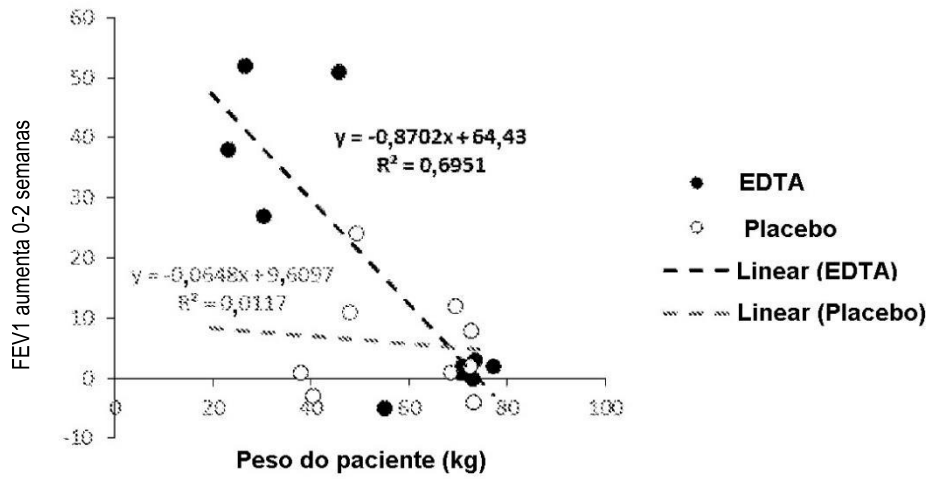
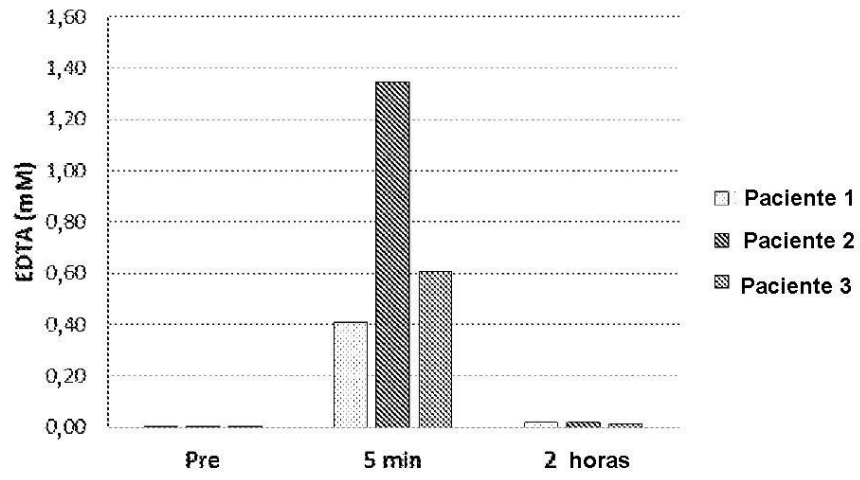
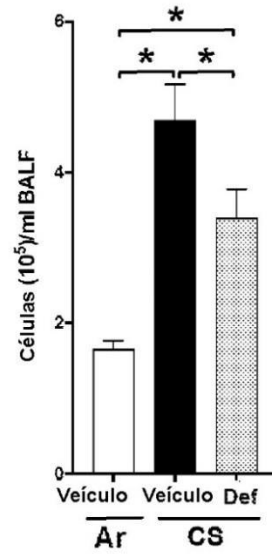


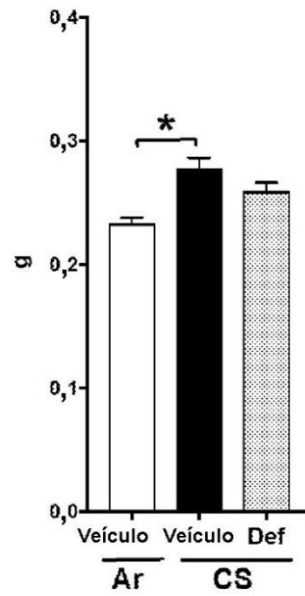
Figura 3B

**Figura 4**



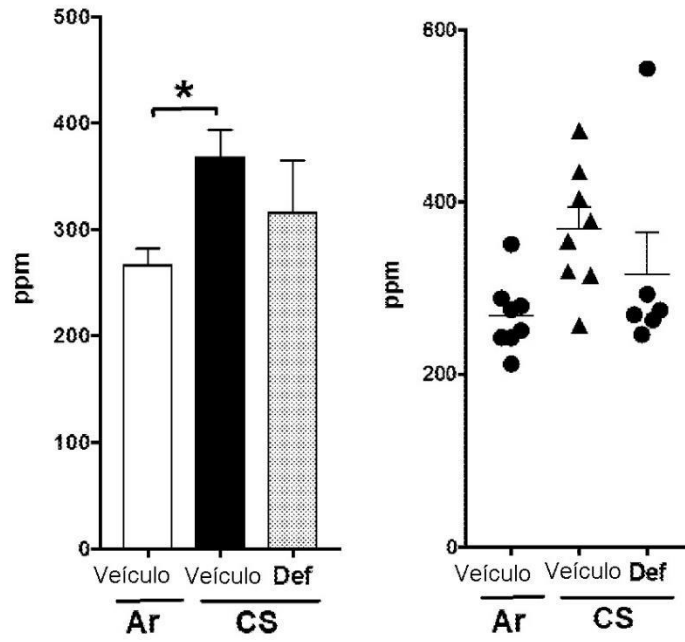
* = $p < 0,05$

Figura 5



* = $p < 0,05$

Figura 6



* = $p < 0,05$

Figura 7

RESUMO

“MÉTODO PARA REDUZIR INFLAMAÇÃO DE PULMÃO”

Um método para tratar ou prevenir inflamação no pulmão administrando uma alta concentração de um agente quelante inalável, em particular CaEDTA.