(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 379 775**

(51) Int. Cl.:
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **10711127 .0**
(96) Fecha de presentación: **26.03.2010**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2315580**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **04.05.2011**

(54) Título: **Formulaciones farmacéuticas y métodos para tratar infecciones del aparato respiratorio**

(30) Prioridad:
26.03.2009 US 163772 P
26.03.2009 US 163763 P
26.03.2009 US 163767 P
28.10.2009 US 255764 P
25.01.2010 US 298092 P
18.02.2010 US 305819 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.05.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.05.2012

(73) Titular/es:
Pulmatrix, Inc.
99 Hayden Avenue
Lexington MA 02421, US

(72) Inventor/es:
LIPP, Michael M.;
CLARKE, Robert W.;
HAVA, David L.;
BATYCKY, Richard y
HANRAHAN, John

(74) Agente/Representante:
Linage González, Rafael

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 379 775 T3

DESCRIPCIÓN

Formulaciones farmacéuticas y métodos para tratar infecciones del aparato respiratorio.

Antecedentes de la invención

Las infecciones del aparato respiratorio son infecciones comunes del aparato respiratorio superior (por ejemplo, nariz, oídos, senos paranasales y garganta) y el aparato respiratorio inferior (por ejemplo, tráquea, bronquios y pulmones). Las infecciones del aparato respiratorio pueden ser infecciones primarias o secundarias.

Los síntomas de infecciones del aparato respiratorio superiores incluyen congestión o goteo nasal, irritabilidad, inquietud, escaso apetito, disminución del nivel de actividad, tos y fiebre. Las infecciones virales del aparato respiratorio superior provocan, o están asociadas con, por ejemplo, dolores de garganta, resfriados, laringotraqueobronquitis y gripe. Los ejemplos de virus que provocan infecciones del aparato respiratorio superior incluyen rinovirus y virus influenza. Las infecciones bacterianas del aparato respiratorio superior provocan, o están asociadas con, por ejemplo, tos ferina e faringitis estreptocócica. Las bacterias a modo de ejemplo que provocan infecciones del aparato respiratorio superior incluyen *Streptococcus pyogenes* y *Bordatella pertussis*.

Las manifestaciones clínicas de una infección del aparato respiratorio inferior incluyen tos superficial que produce esputo en los pulmones, fiebre y dificultad para respirar. Los ejemplos de infecciones virales del aparato respiratorio inferior incluyen infecciones por virus influenza, virus parainfluenza ("VPI"), infecciones por virus respiratorio sincitial ("VRS") y bronquiolitis. Los ejemplos de bacterias que provocan infecciones del aparato respiratorio inferior incluyen *Streptococcus pneumoniae* (que provoca neumonía neumocócica) y *Mycobacterium tuberculosis* (que provoca tuberculosis).

Las infecciones del aparato respiratorio provocadas por hongos incluyen candidiasis sistémica, blastomicosis, criptococosis, coccidiomicosis y aspergilosis.

La influenza, normalmente conocida como gripe, es una enfermedad infecciosa de aves y mamíferos provocada por un virus de ARN de la familia Orthomyxoviridae (los virus influenza). Normalmente, la gripe se transmite desde mamíferos infectados a través de las gotitas y los aerosoles transportados por el aire que contienen el virus, y desde aves infectadas a través de sus deposiciones. La gripe puede transmitirse también por la saliva, secreciones nasales, heces y sangre. Las infecciones se producen a través del contacto con estos fluidos corporales o con superficies contaminadas.

Los virus parainfluenza humanos (VPIh) son un grupo de cuatro serotipos distintos de virus de ARN monocatenarios que pertenecen a la familia de paramixovirus. Son la segunda causa más común de infección del aparato respiratorio inferior en niños pequeños. En conjunto, los virus parainfluenza provocan ~75% de los casos de laringotraqueobronquitis. No es rara la infección repetida a lo largo de la vida del huésped. Los síntomas de brotes tardíos incluyen enfermedad del aparato respiratorio superior como en un resfriado y dolor de garganta. En personas inmunosuprimidas, tales como pacientes de trasplantes, las infecciones por virus parainfluenza pueden provocar neumonía grave, que algunas veces podría ser mortal.

El rinovirus humano es un género de la familia *Picornaviridae* y se cree que es responsable de entre el 30% y el 50% de las infecciones por resfriado común. Se han identificado más de 100 cepas serotípicamente distintas de rinovirus humano. No están disponibles vacunas frente a todos los serotipos porque hay poca protección cruzada entre serotipos. El rinovirus también desempeña un papel significativo en la patogénesis de agravamientos de asma y otitis media. La infección con rinovirus conduce a la liberación de mediadores inflamatorios y al aumento de la reactividad bronquial.

El virus respiratorio sincitial (VRS) humano es un virus que provoca infecciones del aparato respiratorio. Es la causa principal de infección del aparato respiratorio inferior y de las visitas hospitalarias durante la lactancia e infancia. No hay ninguna vacuna para VRS y el tratamiento se limita a cuidados paliativos (con líquidos y oxígeno hasta que la enfermedad sigue su curso).

La neumonía, una enfermedad común provocada por una gran diversidad de agentes infecciosos, es responsable de una morbimortalidad enorme en todo el mundo. La neumonía es la tercera causa principal de muerte en todo el mundo y la causa principal de muerte debida a enfermedad infecciosa en países industrializados. Las bacterias son la causa más común de neumonía en adultos. La mayoría de las neumonías adquiridas en la comunidad se deben a infecciones con *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Mycoplasma pneumoniae*. Lancet., 362:1991-200 (2003); Curr Opin Pulm Med., 6:226-233 (2000). La mayoría de las neumonías asociadas a ventilación mecánica de aparición tardía están provocadas por *S. aureus*, incluyendo subtipos resistentes a antibióticos, *Pseudomonas spp*., *Klebsiella spp*., así como *Acitenobacter spp*. Crit Care., 9:459-464 (2005).

Las terapias actuales para infecciones del aparato respiratorio implican la administración de agentes antivirales, agentes antibacterianos o agentes antifúngicos para el tratamiento, la prevención o la mejora de infecciones virales, bacterianas y fúngicas del aparato respiratorio, respectivamente. Desafortunadamente, en algunos casos, no hay terapias disponibles, o las infecciones han demostrado ser insensibles a las terapias, o la aparición de efectos

secundarios contrarresta los beneficios de la administración de un agente terapéutico. El uso de agentes antibacterianos para el tratamiento de infecciones bacterianas del aparato respiratorio también puede producir efectos secundarios o dar como resultado cepas bacterianas resistentes. La administración de agentes antifúngicos puede provocar insuficiencia renal o disfunción de la médula ósea y puede no ser eficaz contra la infección fúngica en pacientes con sistemas inmunitarios suprimidos. Adicionalmente, el microorganismo que provoca la infección (por ejemplo, un virus, una bacteria o un hongo) puede ser resistente o desarrollar resistencia al agente terapéutico o la combinación de agentes terapéuticos administrado. De hecho, los microorganismos que desarrollan resistencia a los agentes terapéuticos administrados a menudo desarrollan resistencia a múltiples fármacos o resistencia a fármaco pleiotrópico, es decir, resistencia a agentes terapéuticos que actúan mediante mecanismos diferentes de los mecanismos de cómo actúan los agentes administrados. Por tanto, como resultado de la resistencia a fármacos, muchas infecciones demuestran ser insensibles a una amplia gama de protocolos de tratamiento convencionales. Por tanto, se necesitan nuevas terapias para el tratamiento, la prevención, el manejo y/o la mejora de las infecciones del aparato respiratorio y los síntomas de las mismas.

La publicación de solicitud estadounidense n.º 2007/0053844 describe formulaciones conductoras que comprenden una sal de calcio en solución salina (por ejemplo, $CaCl_2$ al 1,29% disuelto en NaCl al 0,9%). Las formulaciones pueden alterar las propiedades físicas del revestimiento mucoso de las vías respiratorias (tales como la tensión superficial, la elasticidad superficial y la viscosidad volumétrica del revestimiento mucoso de las vías respiratorias), y suprimir las partículas exhaladas. Por ejemplo, formulaciones que consisten en $CaCl_2$ al 1,29% disuelto en solución salina isotónica al 0,9% suprimían las partículas exhaladas en más de 1000 veces.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas tal como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, la invención se refiere a formulaciones farmacéuticas útiles para tratar una infección del aparato respiratorio o una enfermedad pulmonar en un individual, que comprenden una sal de calcio y una sal de sodio, en las que la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol). Los datos proporcionados en el presente documento muestran que cuando la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol), la combinación de las dos sales proporciona efectos sinérgicos superiores en la reducción de la replicación viral en un modelo de cultivo celular de infección por influenza. Además, las formulaciones son altamente eficaces en la reducción de la replicación viral de múltiples cepas de influenza (por ejemplo, Influenza A H1N1, Influenza A H3N2, Influenza B). Estudios *in vivo* posteriores confirman que las formulaciones con una razón 8:1 de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} son también altamente eficaces en el tratamiento de una infección por influenza, ya que se mostró que las formulaciones: (1) retrasan la aparición y reducen la gravedad de la fiebre, (2) previenen la pérdida de peso corporal y (3) reducen los recuentos de células inflamatorias nasales en un modelo de gripe en hurón. De manera similar, en un modelo de gripe en ratón *in vivo*, se mostró que las formulaciones mejoran la tasa de supervivencia de los animales. Además, las actividades terapéuticas de las formulaciones farmacéuticas tal como se describen en el presente documento son independientes del patógeno, ya que se mostró que las formulaciones son eficaces en (1) la reducción de la infectividad del virus parainfluenza humano (VPIh) en un modelo de cultivo celular, (2) la reducción de la infectividad de rinovirus en un modelo de cultivo celular y (3) el tratamiento de la infección por *Streptococcus pneumoniae* en un modelo de ratón.

En ciertas realizaciones, la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de aproximadamente 4:1 (mol:mol), aproximadamente 4,5:1 (mol:mol), aproximadamente 5:1 (mol:mol), aproximadamente 5,5:1 (mol:mol), aproximadamente 6:1 (mol:mol), aproximadamente 6,5:1 (mol:mol), aproximadamente 7:1 (mol:mol), aproximadamente 7,5:1 (mol:mol), aproximadamente 8:1 (mol:mol), aproximadamente 8,5:1 (mol:mol), aproximadamente 9:1 (mol:mol), aproximadamente 9,5:1 (mol:mol), aproximadamente 10:1 (mol:mol), aproximadamente 10,5:1 (mol:mol), aproximadamente 11:1 (mol:mol), aproximadamente 11,5:1 (mol:mol), aproximadamente 12:1 (mol:mol), aproximadamente 12,5:1 (mol:mol), aproximadamente 13:1 (mol:mol), aproximadamente 13,5:1 (mol:mol), aproximadamente 14:1 (mol:mol), aproximadamente 14,5: 1 (mol:mol), aproximadamente 15:1 (mol:mol), aproximadamente 15,5:1 (mol:mol) o aproximadamente 16:1 (mol:mol).

En ciertas realizaciones, la formulación farmacéutica es una formulación líquida. En ciertas realizaciones, la concentración de ión Ca^{2+} en la formulación líquida es de desde aproximadamente 0,115 M hasta aproximadamente 1,15 M, o desde aproximadamente 0,575 M hasta aproximadamente 1,15 M.

En ciertas realizaciones, la concentración de ión Na^{+} en la formulación líquida es de desde aproximadamente 0,053 M hasta aproximadamente 0,3 M, o desde aproximadamente 0,075 M hasta aproximadamente 0,3 M.

Las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden ser hipotónicas, isotónicas o hipertónicas según se desee. Por ejemplo, cualquiera de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento puede tener una tonicidad de aproximadamente 0,1X, una tonicidad de aproximadamente 0,25X, una tonicidad de aproximadamente 0,5X, una tonicidad de aproximadamente 1X, una tonicidad de aproximadamente 2X, una tonicidad de aproximadamente 3X, una tonicidad de aproximadamente 4X, una tonicidad de aproximadamente

5X, una tonicidad de aproximadamente 6X, una tonicidad de aproximadamente 7X, una tonicidad de aproximadamente 8X, una tonicidad de aproximadamente 9X, una tonicidad de aproximadamente 10X, una tonicidad de al menos aproximadamente 1X, una tonicidad de al menos aproximadamente 2X, una tonicidad de al menos aproximadamente 3X, una tonicidad de al menos aproximadamente 4X, una tonicidad de al menos aproximadamente 5X, una tonicidad de al menos aproximadamente 6X, una tonicidad de al menos aproximadamente 7X, una tonicidad de al menos aproximadamente 8X, una tonicidad de al menos aproximadamente 9X, una tonicidad de al menos aproximadamente 10X, entre aproximadamente 0,1X y aproximadamente 1X, entre aproximadamente 0,1X y aproximadamente 0,5X, entre aproximadamente 0,5X y aproximadamente 2X, entre aproximadamente 1X y aproximadamente 4X, entre aproximadamente 1X y aproximadamente 2X, entre aproximadamente 2X y aproximadamente 10X, o entre aproximadamente 4X y aproximadamente 8X.

En ciertas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende una sal de calcio que se selecciona del grupo que consiste en cloruro de calcio, carbonato de calcio, acetato de calcio, fosfato de calcio, alginato de calcio, estearato de calcio, sorbato de calcio, sulfato de calcio, gluconato de calcio, lactato de calcio y citrato de calcio. En una realización a modo de ejemplo, la sal de calcio es cloruro de calcio o lactato de calcio. En otra realización a modo de ejemplo, la sal de calcio es citrato de calcio, lactato de calcio o sulfato de calcio.

En ciertas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende una sal de sodio que se selecciona del grupo que consiste en cloruro de sodio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, sulfato de sodio, estearato de sodio, ascorbato de sodio, benzoato de sodio, bifosfato de sodio, fosfato de sodio, bisulfito de sodio, citrato de sodio, borato de sodio, gluconato de sodio, metasilicato de sodio y lactato de sodio. En una realización a modo de ejemplo, la sal de sodio es cloruro de sodio. En otra realización a modo de ejemplo, la sal de sodio es citrato de sodio, lactato de sodio o sulfato de sodio.

En ciertas realizaciones, la formulación farmacéutica es una formulación de polvo seco. En ciertas realizaciones, la sal de calcio está presente en la formulación de polvo seco en una cantidad de desde aproximadamente el 19,5% hasta aproximadamente el 90% (p/p).

En una realización a modo de ejemplo, la sal de calcio de la formulación de polvo seco es lactato de calcio, citrato de calcio, sulfato de calcio, cloruro de calcio o una combinación de los mismos.

En una realización a modo de ejemplo, la sal de sodio de la formulación de polvo seco es lactato de sodio, citrato de sodio, sulfato de sodio, cloruro de sodio o una combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, la formulación farmacéutica se formula para administrar una dosis de calcio de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/dosis a los pulmones. En ciertas realizaciones, la formulación farmacéutica se formula para proporcionar una dosis de sodio de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/dosis a los pulmones. En ciertas realizaciones, la formulación farmacéutica se formula para administrar una dosis de calcio de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/dosis a la cavidad nasal. En ciertas realizaciones, la formulación farmacéutica se formula para proporcionar una dosis de sodio de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/dosis a la cavidad nasal.

En ciertas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende además un agente terapéutico adicional.

En ciertas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende además un excipiente. Los excipientes a modo de ejemplo incluyen lactosa, glicina, alanina, leucina, isoleucina, trehalosa, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), difosfatidilglicerol (DPPG), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (DPPS), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC), polioxietilen-9-lauril éter, trioleato de sorbitano (Span 85), glicocolato, surfactina, tiloxapol, fosfato de sodio, dextrano, dextrina, manitol, maltodextrina, albúmina sérica humana, albúmina sérica humana recombinante o polímeros biodegradables.

En ciertas realizaciones, la formulación farmacéutica es una formulación de dosis unitaria.

También se describe en el presente documento un método para tratar (incluyendo tratar profilácticamente) una infección del aparato respiratorio, que comprende administrar a un individuo que tiene una infección del aparato respiratorio, que presenta síntomas de una infección del aparato respiratorio, o que corre el riesgo de contraer una infección del aparato respiratorio, una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende una sal de calcio y una sal de sodio, en la que la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol).

También se describe en el presente documento un método para reducir la propagación de una infección del aparato respiratorio, que comprende administrar a un individuo que tiene una infección del aparato respiratorio, que presenta síntomas de una infección del aparato respiratorio, o que corre el riesgo de contraer una infección del aparato respiratorio, una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende una sal de calcio y una sal de

sodio, en la que la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol).

En ciertas realizaciones, la infección del aparato respiratorio es una infección bacteriana, tal como neumonía bacteriana. En ciertas realizaciones, la infección bacteriana está provocada por una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *Streptocuccus pneumoniae* (también denominada neumococo), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bordatella pertussis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, una bacteria de la familia Citrobacter, una bacteria de la familia Ecinetobacter y *Mycobacterium tuberculosis*.

En ciertas realizaciones, la infección del aparato respiratorio es una infección viral, tal como gripe o neumonía viral. En ciertas realizaciones, la infección viral está provocada por un virus seleccionado del grupo que consiste en virus influenza (por ejemplo, virus influenza A, virus influenza B), virus respiratorio sincitial, adenovirus, metapneumovirus, citomegalovirus, virus parainfluenza (por ejemplo, VPIh-1, VPIh-2, VPIh-3, VPIh-4), rinovirus, adenovirus, virus de coxsackie, echovirus, coronavirus, virus del herpes simple, SARS-coronavirus y viruela.

En ciertas realizaciones, la infección del aparato respiratorio es una infección fúngica. En ciertas realizaciones, la infección fúngica está provocada por un hongo seleccionado del grupo que consiste en *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jiroveci*, *Coccidioides immitis*, *Candida albicans* y *Pneumocystis jirovecii* (que provoca neumonía por *Pneumocystis* (PCP), también denominada neumocistosis).

En ciertas realizaciones, la infección del aparato respiratorio es una infección parasitaria. En ciertas realizaciones, la infección parasitaria está provocada por un parásito seleccionado del grupo que consiste en *Toxoplasma gondii* y *Strongyloides stercoralis*.

También se describe en el presente documento un método para tratar (incluyendo tratar profilácticamente) a un individuo con un enfermedad pulmonar (por ejemplo, un individuo que tiene una enfermedad pulmonar, que presenta síntomas de una enfermedad pulmonar, o propenso a una enfermedad pulmonar), que comprende administrar al aparato respiratorio del individuo una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende una sal de calcio y una sal de sodio, en la que la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol).

También se describe en el presente documento un método para tratar (incluyendo tratar profilácticamente) un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar crónica en un individuo, que comprende administrar al aparato respiratorio del individuo que lo necesita (por ejemplo, un individuo que tiene un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar, que presenta síntomas de un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar, o propenso a un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar) una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende una sal de calcio y una sal de sodio, en la que la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16: (mol:mol). Las enfermedades pulmonares a modo de ejemplo incluyen asma (por ejemplo, alérgica/atópica, infantil, de aparición tardía, con tos variante u obstructiva crónica), hiperreactividad del aparato respiratorio, rinitis alérgica (estacional o no estacional), bronquiectasia, bronquitis crónica, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, sibilancia en los primeros años de vida y similares.

La invención también se refiere a una formulación farmacéutica tal como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una infección del aparato respiratorio, para reducir la propagación de una infección del aparato respiratorio, para tratar una enfermedad pulmonar o para tratar un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar crónica.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico de contorno que muestra el efecto de cambiar las concentraciones de sodio y calcio sobre la replicación viral de Influenza A/WSN/33/1. Para normalizar los datos de varios experimentos, se determinó para cada experimento el cambio de replicación viral en cada condición tratada, en comparación con la condición de nada de sal. El eje X representa la concentración de $CaCl_2$ creciente y el eje Y representa la concentración de NaCl creciente. Cada punto representa una formulación sometida a prueba con al menos tres repeticiones por prueba. Se muestra la reducción de la infectividad viral mediante oscuridad creciente (es decir, números superiores y tonos más oscuros representan formulaciones que tienen mayor efecto sobre la reducción de la replicación viral de influenza).

La figura 2A muestra los efectos sensibles a la dosis de formulaciones líquidas con una razón de Ca^{2+}:Na^{+} a 8:1 (mol:mol). La figura 2B muestra los efectos sensibles a la dosis de formulaciones líquidas con una razón de Ca^{2+}:Na^{+} a 16:1 (mol:mol). En ambos casos, se trataron las células con las formulaciones líquidas 1 hora antes de la infección.

La figura 3 muestra que las formulaciones reducían la infectividad de influenza en células epiteliales bronquiales humanas normales (NHBE). Se trataron células NHBE de cuatro donantes diferentes con las formulaciones indicadas y se infectaron con Influenza A/Panama/2007/99. Se determinaron los títulos virales en lavados apicales

24 horas tras la infección. Se normalizaron los datos con respecto al control sin tratar (aire) y se presentaron como el cambio de log_{10} en $TCID_{50}$/ml con respecto al control. Los datos son la media ± DE para de 2 a 3 repeticiones por condición. N.D. = no determinado.

La figura 4 muestra que las formulaciones reducían la infectividad de múltiples cepas de virus influenza en células Calu-3 de una manera sensible a la dosis. Se trataron células Calu-3 con formulaciones que eran de tonicidad de 0,5X, 2X y 8X (1X = isotónico), con una razón molar 8:1 de Ca^{2+}:Na^{+}. Se determinaron los títulos virales 24 horas tras el tratamiento y se calculó la reducción en veces de los títulos virales en relación con un control sin tratar para cada cepa viral. Las cepas virales de influenza sometidas a prueba en este ejemplo se muestran en la leyenda y en la tabla 2.

La figura 5 muestra que el tratamiento con formulaciones de calcio:sodio retrasaba la aparición de la fiebre y reducía las temperaturas corporales en hurones infectados por influenza. Se representan los cambios de temperatura corporal (media ± EEM) de hurones control (círculos negros), hurones tratados con la formulación A (círculos blancos), hurones tratados 4X (recuadros negros) o hurones tratados 8X (recuadros blancos). La figura 5A muestra que los hurones tratados presentaban una aparición retrasada de la fiebre y tenían temperaturas corporales inferiores a lo largo del transcurso del estudio (p<0,0001 ANOVA de dos vías). La figura 5B muestra que los hurones tratados tenían temperaturas corporales inferiores en el momento del pico de fiebre en los animales control (36 horas tras la infección; *p<0,05, **p<0,01 prueba de la U de Mann-Whitney; n=9 para el control, n=9 para los tratados con la formulación A y n=10 para los tratados 4X y 8X).

La figura 6 muestra que el tratamiento con formulaciones de calcio:sodio prevenían la pérdida de peso corporal en hurones infectados por influenza. Se representa el porcentaje de pérdida de peso corporal desde tiempo cero en hurones control (círculos negros), hurones tratados con la formulación A (círculos blancos), hurones tratados 4X (recuadros negros) o hurones tratados 8X (recuadros blancos). La figura 6A muestra que los hurones tratados presentaban menor pérdida de peso corporal a lo largo del transcurso del estudio (p<0,0001 ANOVA de dos vías). La figura 6B muestra que los hurones tratados tenían menor pérdida de peso corporal en el momento del pico de pérdida en los animales control (48 horas tras la infección; *p<0,05, **p<0,01 prueba de la U de Mann-Whitney; n=10 para todos los grupos excepto la formulación A, n=9).

La figura 7 muestra que el tratamiento con formulaciones de calcio:sodio reducía la respuesta inflamatoria frente a la infección por influenza en hurones. Se realizaron lavados nasales una vez al día en los momentos indicados y se contaron el número de células inflamatorias en cada lavado nasal. Se desecharon las muestras de lavados nasales que tenían cantidades perceptibles de sangre para el análisis en cada punto de tiempo. Se representan la media (±EEM) de hurones control (círculos negros), hurones tratados con la formulación A (círculos blancos), hurones tratados 4X (recuadros negros) o hurones tratados 8X (recuadros blancos). La figura 7A muestra que los tratamientos con las formulaciones de calcio:sodio reducían el número de células inflamatorias en muestras de lavados nasales hasta niveles estadísticamente significativos a lo largo del tiempo (p<0,0001 ANOVA de dos vías). La figura 7B muestra la reducción en el pico de infiltración de células inflamatorias en animales tratados, en comparación con los animales control (72 horas; * * p< 0,01 y *** P< 0,001 prueba de la U de Mann-Whitney; n=5 para el control, n=6 para los tratados con la formulación A y 4X, y n=7 para los tratados 8X en el punto de tiempo de 72 horas). La figura 7C muestra la reducción de células inflamatorias en animales tratados a las 120 horas tras la infección (* p< 0,05 prueba de la U de Mann-Whitney; n=6 para el control, n=5 para los tratados con la formulación A, n=6 para los tratados 4X y n=7 para los tratados 8X).

La figura 8 muestra que las formulaciones de calcio:sodio reducían la infección por VPIh-3 en células Calu-3 o epiteliales bronquiales normales (NHBE) de una manera sensible a la dosis. Se trataron células Calu-3 (círculos negros) o NHBE (círculos blancos) con formulaciones de calcio:sodio (tonicidad de 0,5X, 2X u 8X; razón molar 8:1 de Ca^{2+}:Na^{+}) 1 hora antes de la infección con parainfluenza humano 3 (VPIh-3). Se determinó el título viral en los lavados apicales de células 24 horas tras la infección mediante ensayo de $TCID_{50}$ usando células MK-2. El título de parainfluenza en los lavados apicales se redujo de una manera sensible a la dosis. Se analizaron los datos de cada tipo celular usando un ANOVA de una vía y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey.

La figura 9 muestra que las formulaciones de calcio:sodio reducían la infección por rinovirus en células Calu-3. Se trataron células Calu-3 con la formulación de calcio:sodio (tonicidad de 8X; razón molar 8:1 de Ca^{2+}:Na^{+}). Una hora más tarde, se infectaron las células con rinovirus y tres horas más tarde se lavaron las células para eliminar el virus no unido. Se determinó el título viral a partir de la superficie apical de los cultivos mediante ensayo de TCID50 24 horas tras la infección. Cada punto de datos es la media + DE de pocillos por duplicado y es representativo de dos experimentos independientes.

La figura 10 muestra que las formulaciones de calcio:sodio (Ca^{2+}:Na^{+} a una razón molar de 8:1) reducían la carga bacteriana de los pulmones de una manera sensible a la dosis. Se trataron ratones con las formulaciones indicadas usando un nebulizador PariLC Sprint y posteriormente se infectaron con *S. pneumoniae*. Se muestra la carga bacteriana de los pulmones en cada animal. Cada círculo representa datos a partir de un único animal y la barra representa la media geométrica con el intervalo de confianza del 95%. Los datos para los grupos de NaCl, 0,5X y 1X se agrupan a partir de dos o tres experimentos independientes. Los datos de los grupos 2X y 4X son a partir de un único experimento.

La figura 11 muestra que una dosis de calcio creciente con tiempos de nebulización más largos no tiene un impacto significativo sobre las actividades terapéuticas. Se trataron ratones con solución salina (NaCl) o una formulación de calcio:sodio (tonicidad de 1X = isotónica; razón molar de Ca^{2+}:Na^{+} a 8:1) usando un nebulizador Pari LC Sprint y posteriormente se infectaron con *S. pneumoniae*. Se muestra la carga bacteriana de los pulmones en cada animal. Cada círculo representa datos a partir de un único animal y la barra representa la media geométrica. Tiempos de dosificación de 3 minutos o mayores reducían significativamente las cargas bacterianas en relación con los controles (ANOVA de una vía; prueba a posteriori de comparaciones múltiples de Tukey).

La figura 12 muestra que las formulaciones de calcio:sodio eran eficaces en el tratamiento de la infección viral por influenza en un modelo de gripe de ratón. Se trataron ratones BALB/c (n=7-8 por grupo) con cada una de las formulaciones indicadas 3 horas antes de la infección con Influenza A/PR/8 (H1N1). Se trataron posteriormente los ratones 3 horas tras la infección y entonces dos veces al día durante un total de 11 días. Se siguieron la supervivencia de los animales, los cambios en la temperatura corporal de los animales y los cambios en el peso corporal durante 21 días. Se sacrificaron los animales que presentaban temperaturas corporales inferiores a 95ºF.

Descripción detallada de la invención

1. Vista general

Tal como se describe en el presente documento, se realizaron estudios *in vivo* e *in vitro* de las actividades terapéuticas de formulaciones de sal inhaladas que contienen una sal de calcio y una sal de sodio. En el transcurso de estos estudios, se descubrió que la razón de calcio con respecto a sodio relativa en las formulaciones de sal afecta a las actividades terapéuticas de las formulaciones. Los resultados de los estudios *in vitro* e *in vivo* revelaron que un intervalo estrecho de razones de calcio con respecto a sodio proporcionaba actividades terapéuticas superiores. En particular, se descubrió que una razón de calcio con respecto a sodio de desde aproximadamente 4:1 hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol) proporcionaba actividades terapéuticas superiores.

Tal como se describe en el presente documento, se han demostrado las actividades terapéuticas de formulaciones que tienen razones de calcio:sodio de desde aproximadamente 4:1 hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol) en varios modelos preclínicos. Por ejemplo, se mostró que las formulaciones, entre otros, tienen efectos superiores sobre la reducción de la replicación viral en un modelo de gripe de cultivo celular, reducen las replicaciones virales de múltiples cepas de influenza (por ejemplo, Influenza A H1N1, Influenza A H3N2, Influenza B), reducen la gravedad de la fiebre y los recuentos de células inflamatorias nasales en un modelo de gripe de hurón *in vivo*, mejoran la tasa de supervivencia de animales en un modelo de gripe de ratón *in vivo*, reducen la replicación viral de virus parainfluenza humano (VPIh) en un modelo de cultivo celular, reducen la replicación viral de rinovirus en un modelo de cultivo celular y reducen la carga bacteriana de los pulmones de *Streptococcus pneumoniae* en un modelo de neumonía de ratón. Los datos obtenidos a partir de estos estudios demuestran que las formulaciones son útiles en el tratamiento (incluyendo tratar profilácticamente) de infecciones del aparato respiratorio provocadas por un amplio espectro de patógenos (por ejemplo, múltiples cepas de virus influenza, virus parainfluenza humano, *S. pneumoniae*). Las formulaciones también son útiles para reducir la propagación de una infección del aparato respiratorio, tratar una enfermedad pulmonar o tratar un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar crónica.

2. Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, el término “partículas aerodinámicamente ligeras” se refiere a partículas que tienen una densidad de compactación inferior a aproximadamente 0,4 g/cm^3. La densidad de compactación de partículas de un polvo seco puede obtenerse mediante la medición de la densidad de compactación según la USP convencional. La densidad de compactación es una medida común de la densidad de masa de envoltura. La densidad de masa de envoltura de una partícula isotrópica se define como la masa de la partícula dividida entre el volumen de envoltura de esfera mínimo en el que puede encerrarse. Las características que contribuyen a una densidad de compactación baja incluyen textura de superficie irregular y estructura porosa.

El término “aerosol” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier preparación de una vaporización fina de partículas (incluyendo partículas líquidas y no líquidas, por ejemplo, polvos secos, normalmente con un diámetro medio geométrico de volumen de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 30 micrómetros o un diámetro de masa media aerodinámica de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 10 micrómetros. Preferiblemente, el diámetro medio geométrico de volumen para las partículas de aerosol es inferior a aproximadamente 10 micrómetros. El diámetro medio geométrico de volumen preferido para las partículas de aerosol es de aproximadamente 5 micrómetros. Por ejemplo, el aerosol puede contener partículas que tienen un diámetro medio geométrico de volumen de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 30 micrómetros, entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 20 micrómetros, entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 10 micrómetros, entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 3,0 micrómetros, entre aproximadamente 1,0 y 5,0 micrómetros, entre aproximadamente 1,0 y 10,0 micrómetros, entre aproximadamente 5,0 y 15,0 micrómetros. Preferiblemente, el diámetro de masa media aerodinámica es de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 10 micrómetros, entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 3,0 micrómetros o entre aproximadamente 1,0 y 5,0 micrómetros.

El término “neumonía” es un término de la técnica que se refiere a una enfermedad inflamatoria del pulmón. La neumonía puede resultar de una variedad de causas, incluyendo infección con bacterias, virus, hongos o parásitos y lesión química o física en los pulmones. Los síntomas típicos asociados con la neumonía incluyen tos, dolor de pecho, fiebre y dificultad para respirar. El diagnóstico clínico de la neumonía se conoce bien en la técnica y puede incluir rayos x y/o examen del esputo.

El término “neumonía bacteriana” se refiere a neumonía provocada por infección bacteriana, incluyendo, por ejemplo, infección del aparato respiratorio por *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* o *Legionella pneumophila*.

El término “neumonía viral” se refiere a neumonía provocada por una infección viral. Los virus que provocan comúnmente neumonía viral incluyen, por ejemplo, virus influenza, virus respiratorio sincitial (VRS), adenovirus y metapneumovirus. El virus del herpes simple es una causa poco común de neumonía para la población general, aunque es más común en recién nacidos. Las personas con sistemas inmunitarios debilitados también corren el riesgo de neumonía provocada por citomegalovirus (CMV).

El término “aparato respiratorio” tal como se usa en el presente documento incluye el aparato respiratorio superior (por ejemplo, fosas nasales, cavidad nasal, garganta, faringe), las vías respiratorias (por ejemplo, laringe, tráquea, bronquios, bronquiolos) y los pulmones (por ejemplo, bronquiolos respiratorios, conductos alveolares, sacos alveolares, alvéolos).

El término “infección del aparato respiratorio” es un término de la técnica que se refiere a infecciones del aparato respiratorio superior (por ejemplo, infecciones de la cavidad nasal, faringe, laringe) e infecciones del aparato respiratorio inferior (por ejemplo, infecciones de la tráquea, los bronquios primarios, los pulmones) y combinaciones de las mismas. Los síntomas típicos asociados con infecciones del aparato respiratorio incluyen congestión nasal, tos, goteo nasal, dolor de garganta, fiebre, presión facial, estornudos, dolor de pecho y dificultad para respirar.

Tal como se usa en el presente documento, tonicidad de “1X” se refiere a una disolución que es isotónica en relación con células y sangre humana normal. Disoluciones que son hipotónicas o hipertónicas en comparación con células y sangre humana normal se describen en relación con una disolución 1X usando un multiplicador apropiado. Por ejemplo, una disolución hipotónica puede tener una tonicidad de 0,1X, 0,25X o 0,5X, y una disolución hipertónica puede tener una tonicidad de 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X o 10X.

El término “polvo seco” tal como se usa en el presente documento se refiere a una composición que contiene partículas secas respirables finamente dispersadas que pueden dispersarse en un dispositivo de inhalación y posteriormente inhalarse por un sujeto. Tal polvo seco o partícula seca puede contener hasta aproximadamente el 15% de agua u otro disolvente, o estar sustancialmente libre de agua u otro disolvente, o ser anhidro.

3. Formulaciones farmacéuticas

En un aspecto, la invención se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprenden una sal de calcio y una sal de sodio, en las que la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol). Las formulaciones farmacéuticas son adecuadas para inhalación, y pueden usarse para tratar una infección del aparato respiratorio, reducir la propagación de una infección del aparato respiratorio, tratar una enfermedad pulmonar o tratar un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar crónica en un individuo que lo necesita. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree que los beneficios terapéuticos proporcionados por las formulaciones de sal descritas en el presente documento resultan de un aumento en la cantidad de catión (Ca^{2+}, Na^{+}, o Ca^{2+} y Na^{+}) en el aparato respiratorio (por ejemplo, mucosidad pulmonar o fluido de revestimiento de las vías respiratorias) tras la administración de la formulación de sal.

Las formulaciones farmacéuticas pueden contener una razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} de desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol). Por ejemplo, las formulaciones pueden contener una razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} de desde aproximadamente 5:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol), desde aproximadamente 6:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol), desde aproximadamente 7:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol), desde aproximadamente 8:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol), desde aproximadamente 9:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol), desde aproximadamente 10:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol), desde aproximadamente 11:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol), desde aproximadamente 12:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol), desde aproximadamente 13:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol), desde aproximadamente 14:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol), desde aproximadamente 15:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol).

Alternativamente o además, las formulaciones pueden contener una razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} de desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 5:1 (mol:mol), desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 6:1 (mol:mol), desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 7:1 (mol:mol), desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 8:1 (mol:mol), desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 9:1 (mol:mol), desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 10:1

(mol:mol), desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 11:1 (mol:mol), desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 12:1 (mol:mol), desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 13:1 (mol:mol), desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 14:1 (mol:mol), desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 15:1 (mol:mol).

Alternativamente o además, las formulaciones pueden contener una razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} de desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 12:1 (mol:mol), desde aproximadamente 5:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 11:1 (mol:mol), desde aproximadamente 6:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 10:1 (mol:mol), desde aproximadamente 7:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 9:1 (mol:mol).

Alternativamente o además, la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de aproximadamente 4: (mol:mol), aproximadamente 4,5:1 (mol:mol), aproximadamente 5:1 (mol:mol), aproximadamente 5,5:1 (mol:mol), aproximadamente 6:1 (mol:mol), aproximadamente 6,5:1 (mol:mol), 7:1 (mol:mol), aproximadamente 7,5:1 (mol:mol), aproximadamente 8:1 (mol:mol), aproximadamente 8,5:1 (mol:mol), aproximadamente 9:1 (mol:mol), aproximadamente 9,5:1 (mol:mol), aproximadamente 10: 1 (mol:mol), aproximadamente 10,5:1 (mol:mol), aproximadamente 11:1 (mol:mol), aproximadamente 11,5:1 (mol:mol), aproximadamente 12:1 (mol:mol), aproximadamente 12,5:1 (mol:mol), aproximadamente 13:1 (mol:mol), aproximadamente 13,5:1 (mol:mol), aproximadamente 14:1 (mol:mol), aproximadamente 14,5:1 (mol:mol), aproximadamente 15:1 (mol:mol), aproximadamente 15,5:1 (mol:mol) o aproximadamente 16:1 (mol:mol).

En realizaciones a modo de ejemplo, la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de aproximadamente 8:1 (mol:mol) o aproximadamente 16:1 (mol:mol).

Las sales de calcio adecuadas incluyen, por ejemplo, cloruro de calcio, carbonato de calcio, acetato de calcio, fosfato de calcio, alginato de calcio, estearato de calcio, sorbato de calcio, sulfato de calcio, gluconato de calcio, citrato de calcio, lactato de calcio y similares, o una combinación de los mismos.

Ciertas sales de calcio proporcionan dos o más moles de Ca^{2+} por mol de sal de calcio tras su disolución. Tales sales de calcio pueden ser particularmente adecuadas para producir formulaciones de polvo seco o líquidas que son densas en calcio y, por tanto, pueden administrar una cantidad eficaz de catión (por ejemplo, Ga^{2+}, Na^{+} o Ca^{2+} y Na^{+}). Por ejemplo, un mol de citrato de calcio proporciona tres moles de Ca^{2+} tras su disolución. También se prefiere generalmente que la sal de calcio sea una sal con un bajo peso molecular y/o contenga aniones de bajo peso molecular. Sales de calcio de bajo peso molecular, tales como sales de calcio que contienen iones calcio y aniones de bajo peso molecular, son densas en calcio en relación con sales de alto peso molecular y sales de calcio que contienen aniones de alto peso molecular. Se prefiere generalmente que la sal de calcio tenga un peso molecular de menos de aproximadamente 1000 g/mol, menos de aproximadamente 950 g/mol, menos de aproximadamente 900 g/mol, menos de aproximadamente 850 g/mol, menos de aproximadamente 800 g/mol, menos de aproximadamente 750 g/mol, menos de aproximadamente 700 g/mol, menos de aproximadamente 650 g/mol, menos de aproximadamente 600 g/mol, menos de aproximadamente 550 g/mol, menos de aproximadamente 510 g/mol, menos de aproximadamente 500 g/mol, menos de aproximadamente 450 g/mol, menos de aproximadamente 400 g/mol, menos de aproximadamente 350 g/mol, menos de aproximadamente 300 g/mol, menos de aproximadamente 250 g/mol, menos de aproximadamente 200 g/mol, menos de aproximadamente 150 g/mol, menos de aproximadamente 125 g/mol o menos de aproximadamente 100 g/mol. Además o alternativamente, se prefiere generalmente que el ión calcio contribuya a una parte sustancial del peso en el peso global de la sal de calcio. Se prefiere generalmente que el ión calcio pese al menos el 10% de la sal de calcio global, al menos el 16%, al menos el 20%, al menos el 24,5%, al menos el 26%, al menos el 31%, al menos el 35% o al menos el 38% de la sal de calcio global.

Alternativamente o además, las formulaciones farmacéuticas incluyen una sal de calcio adecuada que proporciona calcio, en la que la razón en peso de calcio con respecto al peso global de dicha sal de calcio es de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5. Por ejemplo, la razón en peso de calcio con respecto al peso global de dicha sal de calcio es de entre aproximadamente 0,15 y aproximadamente 0,5, entre aproximadamente 0,18 y aproximadamente 0,5, entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 0,25 y aproximadamente 0,5, entre aproximadamente 0,27 y aproximadamente 0,5, entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 0,35 y aproximadamente 0,5, entre aproximadamente 0,37 y aproximadamente 0,5, o entre aproximadamente 0,4 y aproximadamente 0,5.

Las sales de sodio adecuadas incluyen, por ejemplo, cloruro de sodio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, sulfato de sodio, estearato de sodio, ascorbato de sodio, benzoato de sodio, bifosfato de sodio, fosfato de sodio, bisulfito de sodio, citrato de sodio, lactato de sodio, borato de sodio, gluconato de sodio, metasilicato de sodio y similares, o una combinación de los mismos.

Además de una sal de calcio y una sal de sodio, las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden incluir cualquier forma de sal no tóxica de los elementos sodio, potasio, magnesio, calcio, aluminio, silicio, escandio, titanio, vanadio, cromo, cobalto, níquel, cobre, manganeso, zinc, estaño, plata y elementos similares. Las sales de magnesio adecuadas incluyen, por ejemplo, carbonato de magnesio, sulfato de magnesio, estearato de magnesio, trisilicato de magnesio, cloruro de magnesio y similares. Las sales de potasio adecuadas incluyen, por ejemplo,

bicarbonato de potasio, cloruro de potasio, citrato de potasio, borato de potasio, bisulfito de potasio, bifosfato de potasio, alginato de potasio, benzoato de potasio y similares. Las sales adecuadas adicionales incluyen sulfato cúprico, cloruro de cromo, cloruro estannoso y sales similares. Otras sales adecuadas incluyen cloruro de zinc, cloruro de aluminio y cloruro de plata.

Las formulaciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma deseada, tal como una suspensión, emulsión o disolución líquida o un polvo seco.

Las formulaciones farmacéuticas se preparan generalmente en o comprenden un excipiente o vehículo fisiológicamente aceptable. Para formulaciones en forma de emulsiones, suspensiones o disoluciones líquidas, los vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, suspensiones, emulsiones o disoluciones acuosas, alcohólicas/acuosas y de alcohol, incluyendo disoluciones, emulsiones o suspensiones que contienen agua, solución salina, disoluciones de etanol/agua, disoluciones de etanol, medios tamponados, propelentes y similares. Para formulaciones en forma de polvos secos, los excipientes o vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, azúcares (por ejemplo, lactosa, trehalosa), alcoholes de azúcar (por ejemplo, manitol, xilitol, sorbitol), aminoácidos (por ejemplo, glicina, alanina, leucina, isoleucina), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), difosfatidilglicerol (DPPG), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (DPPS), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC), alcoholes grasos, polioxietilen-9-lauril éter, ácidos grasos tensioactivos, trioleato de sorbitano (Span 85), glicocolato, surfactina, polosomeros, ésteres de ácidos grasos de sorbitano, tiloxapol, fosfolípidos, azúcares alquilados, fosfato de sodio, maltodextrina, albúmina sérica humana (por ejemplo, albúmina sérica humana recombinante), polímeros biodegradables (por ejemplo, PLGA), dextrano, dextrina y similares. Si se desea, las formulaciones de sal también pueden contener aditivos, conservantes o reabastecedores de fluidos, nutrientes o electrolitos (véase, generalmente, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª edición, Mack Publishing Co., PA, 1985).

Las formulaciones farmacéuticas se formulan preferiblemente para su administración al aparato respiratorio, por ejemplo como un aerosol.

Las formulaciones farmacéuticas pueden comprender múltiples dosis o ser una composición de dosis unitaria según se desee.

Las formulaciones farmacéuticas contienen preferiblemente concentraciones de calcio y sodio que permiten una administración conveniente de una cantidad eficaz de la formulación al aparato respiratorio. Por ejemplo, es deseable generalmente que las formulaciones líquidas no estén tan diluidas que se requiera que se nebulice una gran cantidad de la formulación con el fin de administrar una cantidad eficaz al aparato respiratorio de un sujeto. Periodos de administración largos están desfavorecidos, y generalmente la formulación debe estar suficientemente concentrada como para permitir que se administre una cantidad eficaz al aparato respiratorio (por ejemplo, mediante inhalación de una formulación aerosolizada, tal como líquido nebulizado o polvo seco aerosolizado) o la cavidad nasal en no más de aproximadamente 120 minutos, no más de aproximadamente 90 minutos, no más de aproximadamente 60 minutos, no más de aproximadamente 45 minutos, no más de aproximadamente 30 minutos, no más de aproximadamente 25 minutos, no más de aproximadamente 20 minutos, no más de aproximadamente 15 minutos, no más de aproximadamente 10 minutos, no más de aproximadamente 7,5 minutos, no más de aproximadamente 5 minutos, no más de aproximadamente 4 minutos, no más de aproximadamente 3 minutos, no más de aproximadamente 2 minutos, no más de aproximadamente 1 minuto, no más de aproximadamente 45 segundos o no más de aproximadamente 30 segundos.

Por ejemplo, una formulación farmacéutica líquida puede contener ión Ca^{2+} desde aproximadamente 0,115 M hasta 1,15 M, ión Ca^{2+} desde aproximadamente 0,116 M hasta 1,15 M, ión Ca^{2+} desde aproximadamente 0,23 M hasta 1,15 M, ión Ca^{2+} desde aproximadamente 0,345 M hasta 1,15 M, ión Ca^{2+} desde aproximadamente 0,424 M hasta 1,15 M, ión Ca^{2+} desde aproximadamente 0,46 M hasta 1,15 M, ión Ca^{2+} desde aproximadamente 0,575 M hasta 1,15 M, ión Ca^{2+} desde aproximadamente 0,69 M hasta 1,15 M, ión Ca^{2+} desde aproximadamente 0,805 M hasta 1,15 M, ión Ca^{2+} desde aproximadamente 0,849 M hasta 1,15 M o ión Ca^{2+} desde aproximadamente 1,035 M hasta 1,15 M. La solubilidad de ciertas sales de calcio (por ejemplo, carbonato de calcio, citrato de calcio) puede limitar la preparación de disoluciones. En tales situaciones, la formulación líquida puede estar en forma de una suspensión que contiene la cantidad equivalente de sal de calcio que se necesitaría para lograr la concentración molar deseada.

La concentración de ión Na^{+} en una formulación farmacéutica líquida dependerá de la concentración de ión Ca^{2+} en la formulación líquida, y la razón de Ca^{2+}:Na^{+} deseada. Por ejemplo, la formulación líquida puede contener ión Na^{+} desde aproximadamente 0,053 M hasta 0,3 M, ión Na^{+} desde aproximadamente 0,075 M hasta 0,3 M, ión Na^{+} desde aproximadamente 0,106 M hasta 0,3 M, ión Na^{+} desde aproximadamente 0,15 M hasta 0,3 M, ión Na^{+} desde aproximadamente 0,225 M hasta 0,3 M, ión Na^{+} desde aproximadamente 0,008 M hasta 0,3 M, ión Na^{+} desde aproximadamente 0,015 M hasta 0,3 M, ión Na^{+} desde aproximadamente 0,016 M hasta 0,3 M, ión Na^{+} desde aproximadamente 0,03 M hasta 0,3 M, ión Na^{+} desde aproximadamente 0,04 M hasta 0,3 M, ión Na^{+} desde aproximadamente 0,08 M hasta 0,3 M, ión Na^{+} desde aproximadamente 0,01875 M hasta 0,3 M, ión Na^{+} desde aproximadamente 0,0375 M hasta 0,3 M, ión Na^{+} desde aproximadamente 0,075 M hasta 0,6 M, ión Na^{+} desde aproximadamente 0,015 M hasta 0,6 M o ión Na^{+} desde aproximadamente 0,3 M hasta 0,6 M.

Las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden ser hipotónicas, isotónicas o hipertónicas según se desee. Las formulaciones líquidas acuosas pueden variar en tonicidad y en las concentraciones de sal de calcio y sal de sodio que están presentes en las formulaciones.

Las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden ser hipotónicas, isotónicas o hipertónicas según se desee. Por ejemplo, cualquiera de las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento puede tener una tonicidad de aproximadamente 0,1X, una tonicidad de aproximadamente 0,25X, una tonicidad de aproximadamente 0,5X, una tonicidad de aproximadamente 1X, una tonicidad de aproximadamente 2X, una tonicidad de aproximadamente 3X, una tonicidad de aproximadamente 4X, una tonicidad de aproximadamente 5X, una tonicidad de aproximadamente 6X, una tonicidad de aproximadamente 7X, una tonicidad de aproximadamente 8X, una tonicidad de aproximadamente 9X, una tonicidad de aproximadamente 10X, una tonicidad de al menos aproximadamente 1X, una tonicidad de al menos aproximadamente 2X, una tonicidad de al menos aproximadamente 3X, una tonicidad de al menos aproximadamente 4X, una tonicidad de al menos aproximadamente 5X, una tonicidad de al menos aproximadamente 6X, una tonicidad de al menos aproximadamente 7X, una tonicidad de al menos aproximadamente 8X, una tonicidad de al menos aproximadamente 9X, una tonicidad de al menos aproximadamente 10X, entre aproximadamente 0,1X y aproximadamente 1X, entre aproximadamente 0,1X y aproximadamente 0,5X, entre aproximadamente 0,5X y aproximadamente 2X, entre aproximadamente 1X y aproximadamente 4X, entre aproximadamente 1X y aproximadamente 2X, entre aproximadamente 2X y aproximadamente 10X, o entre aproximadamente 4X y aproximadamente 8X. Por ejemplo, formulaciones farmacéuticas a modo de ejemplo pueden contener $CaCl_2$ aproximadamente 0,053 M y NaCl aproximadamente 0,0066 M (tonicidad de 0,5X, a una razón de Ca^{2+}:Na^{+} de 8:1), $CaCl_2$ aproximadamente 0,106 M y NaCl aproximadamente 0,013 M (tonicidad de 1X (isotónica), a una razón de Ca^{2+}:Na^{+} de 8:1), $CaCl_2$ aproximadamente 0,212 M y NaCl aproximadamente 0,0265 M (tonicidad de 2X, a una razón de Ca^{2+}:Na^{+} de 8:1), $CaCl_2$ aproximadamente 0,424 M y NaCl aproximadamente 0,053 M (tonicidad de 4X, a una razón de Ca^{2+}:Na^{+} de 8:1), o $CaCl_2$ aproximadamente 0,849 M y NaCl aproximadamente 0,106 M (tonicidad de 8X, a una razón de Ca^{2+}:Na^{+} de 8:1).

Las sales de calcio preferidas para formulaciones líquidas incluyen, por ejemplo, cloruro de calcio, lactato de calcio, citrato de calcio o sulfato de calcio. Las sales de sodio preferidas para formulaciones líquidas incluyen, por ejemplo, cloruro de sodio, lactato de sodio, citrato de sodio o sulfato de sodio.

Las formulaciones farmacéuticas de polvo seco contienen generalmente al menos aproximadamente el 5% de sal de calcio en peso, el 10% de sal de calcio en peso, aproximadamente el 15% de sal de calcio en peso, al menos aproximadamente el 19,5% de sal de calcio en peso, al menos aproximadamente el 20% de sal de calcio en peso, al menos aproximadamente el 22% de sal de calcio en peso, al menos aproximadamente el 25,5% de sal de calcio en peso, al menos aproximadamente el 30% de sal de calcio en peso, al menos aproximadamente el 37% de sal de calcio en peso, al menos aproximadamente el 40% de sal de calcio en peso, al menos aproximadamente el 48,4% de sal de calcio en peso, al menos aproximadamente el 50% de sal de calcio en peso, al menos aproximadamente el 60% de sal de calcio en peso, al menos aproximadamente el 70% de sal de calcio en peso, al menos aproximadamente el 75% de sal de calcio en peso, al menos aproximadamente el 80% de sal de calcio en peso, al menos aproximadamente el 85% de sal de calcio en peso, al menos aproximadamente el 90% de sal de calcio en peso o al menos aproximadamente el 95% de sal de calcio en peso.

Alternativamente o además, las formulaciones de polvo seco pueden contener una sal de calcio que proporciona Ca^{+2} en una cantidad de al menos aproximadamente el 5% de Ca^{+2} en peso, al menos aproximadamente el 7% de Ca^{+2} en peso, al menos aproximadamente el 10% de Ca^{+2} en peso, al menos aproximadamente el 11% de Ca^{+2} en peso, al menos aproximadamente el 12% de Ca^{+2} en peso, al menos aproximadamente el 13% de Ca^{+2} en peso, al menos aproximadamente el 14% de Ca^{+2} en peso, al menos aproximadamente el 15% de Ca^{+2} en peso, al menos aproximadamente el 17% de Ca^{+2} en peso, al menos aproximadamente el 20% de Ca^{+2} en peso, al menos aproximadamente el 25% de Ca^{+2} en peso, al menos aproximadamente el 30% de Ca^{+2} en peso, al menos aproximadamente el 35% de Ca^{+2} en peso, al menos aproximadamente el 40% de Ca^{+2} en peso, al menos aproximadamente el 45% de Ca^{+2} en peso, al menos aproximadamente el 50% de Ca^{+2} en peso, al menos aproximadamente el 55% de Ca^{+2} en peso, al menos aproximadamente el 60% de Ca^{+2} en peso, al menos aproximadamente el 65% de Ca^{+2} en peso o al menos aproximadamente el 70% de Ca^{+2} en peso.

La cantidad de sal de sodio en la formulación farmacéutica de polvo seco dependerá de la cantidad de sal de calcio en la formulación y la razón de calcio:sodio deseada. Por ejemplo, la formulación de polvo seco puede contener al menos aproximadamente el 1,6% de sal de sodio en peso, al menos aproximadamente el 5% de sal de sodio en peso, al menos aproximadamente el 10% de sal de sodio en peso, al menos aproximadamente el 13% de sal de sodio en peso, al menos aproximadamente el 15% de sal de sodio en peso, al menos aproximadamente el 20% de sal de sodio en peso, al menos aproximadamente el 24,4% de sal de sodio en peso, al menos aproximadamente el 28% de sal de sodio en peso, al menos aproximadamente el 30% de sal de sodio en peso, al menos aproximadamente el 30,5% de sal de sodio en peso, al menos aproximadamente el 35% de sal de sodio en peso, al menos aproximadamente el 40% de sal de sodio en peso, al menos aproximadamente el 45% de sal de sodio en peso, al menos aproximadamente el 50% de sal de sodio en peso, al menos aproximadamente el 55% de sal de sodio en peso o al menos aproximadamente el 60% de sal de sodio en peso.

Alternativamente o además, las formulaciones farmacéuticas de polvo seco pueden contener una sal de sodio que proporciona Na^+ en una cantidad de al menos aproximadamente el 0,1% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 0,5% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 1% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 2% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 3% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 4% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 5% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 6% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 7% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 8% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 9% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 10% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 11% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 12% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 14% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 16% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 18% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 20% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 22% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 25% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 27% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 29% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 32% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 35% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 40% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 45% de Na^+ en peso, al menos aproximadamente el 50% de Na^+ en peso o al menos aproximadamente el 55% de Na^+ en peso.

Las sales de calcio preferidas para formulaciones de polvo seco incluyen, por ejemplo, cloruro de calcio, lactato de calcio, citrato de calcio o sulfato de calcio. Las sales de sodio preferidas para formulaciones de polvo seco incluyen, por ejemplo, cloruro de sodio, lactato de sodio, citrato de sodio o sulfato de sodio.

Excipientes preferidos para formulaciones farmacéuticas de polvo seco (tales como el aminoácido hidrófobo leucina) pueden estar presentes en las formulaciones en una cantidad de aproximadamente el 50% o menos (p/p). Por ejemplo, una formulación de polvo seco puede contener el aminoácido leucina en una cantidad de aproximadamente el 50% o menos en peso, aproximadamente el 45% o menos en peso, aproximadamente el 40% o menos en peso, aproximadamente el 35% o menos en peso, aproximadamente el 30% o menos en peso, aproximadamente el 25% o menos en peso, aproximadamente el 20% o menos en peso, aproximadamente el 18% o menos en peso, aproximadamente el 16% o menos en peso, aproximadamente el 15% o menos en peso, aproximadamente el 14% o menos en peso, aproximadamente el 13% o menos en peso, aproximadamente el 12% o menos en peso, aproximadamente el 11% o menos en peso, aproximadamente el 10% o menos en peso, aproximadamente el 9% o menos en peso, aproximadamente el 8% o menos en peso, aproximadamente el 7% o menos en peso, aproximadamente el 6% o menos en peso, aproximadamente el 5% o menos en peso, aproximadamente el 4% o menos en peso, aproximadamente el 3% o menos en peso, aproximadamente el 2% o menos en peso o aproximadamente el 1% o menos en peso. Los excipientes a modo de ejemplo pueden incluir leucina, maltodextrina, manitol, cualquier combinación de leucina, maltodextrina y manitol, o cualquier otro excipiente dado a conocer en el presente documento o comúnmente usado en la técnica.

Se preparan formulaciones de polvo seco con el diámetro de partícula, la rugosidad de superficie y la densidad de compactación apropiadas para la administración localizada a regiones seleccionadas del aparato respiratorio. Por ejemplo, pueden usarse partículas más grandes o de densidad superior para la administración a las vías respiratorias superiores. De manera similar, puede administrarse una mezcla de partículas de diferentes tamaños para seleccionar como diana diferentes regiones del pulmón en una administración. Por ejemplo, se ha encontrado que un polvo seco que comprende partículas aerodinámicamente ligeras son adecuadas para inhalación a los pulmones.

Formulaciones de polvo seco ("DPF", "*dry powder formulations*") con tamaño de partícula grande tienen características de fluidez mejoradas, tales como menos agregación (Visser, J., Powder Technology 58: 1-10 (1989)), aerosolización más fácil y posiblemente menos fagocitosis. Rudt, S. y R. H. Muller. J. Controlled Release, 22: 263-272 (1992); Tabata Y., e Y. Ikada. J. Biomed. Mater. Res. 22: 837-858 (1988). Se producen generalmente aerosoles de polvo seco para terapia por inhalación con diámetros medios principalmente en el intervalo de menos de 5 micrómetros, aunque pueden producirse polvos secos que tienen cualquier intervalo deseado en diámetro aerodinámico. Ganderton D., J. Biopharmaceutical Sciences, 3:101-105 (1992); Gonda, I. "Plysico-Chemical Principles in Aerosol Delivery" en Topics in Pharmaceutical Sciences 1991, Crommelin, D. J. y K. K. Midha, Eds., Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, págs. 95-115 (1992). Pueden administrarse conjuntamente partículas "vehículo" grandes (que no contienen formulación farmacéutica) con aerosoles terapéuticos para ayudar a lograr una aerosolización eficaz entre otros posibles beneficios. French, D. L., Edwards, D. A. y Niven, R. W., J. Aerosol Sci. 27: 769-783 (1996). Pueden diseñarse partículas con tiempos de liberación y degradación que oscilan entre segundos y meses y fabricarse mediante métodos establecidos en la técnica.

Generalmente, pueden producirse formulaciones farmacéuticas que son polvos secos mediante secado por pulverización, secado por congelación, molienda por chorro, evaporación de disolvente de emulsión simple y doble, y fluidos supercríticos. Preferiblemente, se producen formulaciones de polvo seco mediante secado por pulverización, lo que implica preparar una disolución que contiene la sal y otros componentes de la formulación, pulverizar la disolución en una cámara cerrada y eliminar el disolvente con una corriente de gas calentado.

Pueden prepararse fácilmente polvos secados por pulverización que contienen sales de calcio y sodio con suficiente solubilidad en agua o disolventes acuosos, tales como cloruro de calcio, lactato de calcio y cloruro de sodio, citrato

de sodio usando métodos convencionales. Algunas sales, tales como citrato de calcio y sulfato de calcio, tienen baja solubilidad en agua y otros disolventes acuosos. Pueden prepararse polvos secados por pulverización que contienen tales sales usando cualquier método adecuado. Un método adecuado implica combinar otras sales más solubles en disolución y permitir la reacción (reacción de precipitación) para producir la sal deseada para la formulación de polvo seco. Por ejemplo, si se desea una formulación de polvo seco que comprende citrato de calcio y cloruro de sodio, puede prepararse una disolución que contiene las sales de alta solubilidad cloruro de calcio y citrato de calcio. La reacción de precipitación que conduce a citrato de calcio es $3\ CaCl_2 + 2\ Na_3Cit \rightarrow Ca_3Cit_2 + 6\ NaCl$. Adicionalmente, por ejemplo, si se desea una formulación de polvo seco que comprende sulfato de calcio y cloruro de sodio, puede prepararse una disolución que contiene las sales de alta solubilidad cloruro de calcio y sulfato de sodio. La reacción de precipitación que conduce a sulfato de calcio es $CaCl_2 + Na_2SO_4 \rightarrow CaSO_4 + 2\ NaCl$. Es preferible que la sal de sodio se disuelva completamente antes de añadirse la sal de calcio y que la disolución se agite de manera continua. Puede dejarse que la reacción de precipitación llegue hasta el final o detenerse antes del final, por ejemplo secando por pulverización la disolución, según se desee.

Alternativamente, se alimentan dos disoluciones saturadas o subsaturadas en una mezcladora estática con el fin de obtener una disolución saturada o supersaturada tras el mezclado estático. Preferiblemente, la disolución tras el secado por pulverización está supersaturada. Las dos disoluciones pueden ser acuosas u orgánicas, aunque son preferiblemente sustancialmente acuosas. La disolución tras el mezclado estático se alimenta entonces a la unidad de atomización de una secadora por pulverización. En una realización preferida, la disolución tras el mezclado estático se alimenta inmediatamente a la unidad atomizadora. Algunos ejemplos de una unidad atomizadora incluyen una boquilla de dos fluidos, un atomizador rotatorio o una boquilla de presión. Preferiblemente, la unidad atomizadora es una boquilla de dos fluidos. En una realización, la boquilla de dos fluidos es una boquilla de mezclado interno, lo que significa que el gas incide sobre la alimentación líquida antes de salir por el orificio más externo. En otra realización, la boquilla de dos fluidos es una boquilla de mezclado externo, lo que significa que el gas incide sobre la alimentación líquida tras salir por el orificio más externo.

La disolución resultante puede tener un aspecto transparente con sales completamente disueltas o puede formarse un precipitado. Dependiendo de las condiciones de reacción, puede formarse un precipitado rápidamente o a lo largo del tiempo. Disoluciones que contienen un precipitado claro que da como resultado la formación de una suspensión homogénea estable pueden secarse por pulverización.

También pueden prepararse formulaciones de polvo seco combinando componentes individuales en la formulación farmacéutica final. Por ejemplo, un primer polvo seco que contiene una sal de calcio puede combinarse con un segundo polvo seco que contiene una sal de sodio para producir una formulación farmacéutica que contiene una sal de calcio y una sal de sodio. Si se desea, pueden incluirse en la combinación polvos secos adicionales que contienen excipientes (por ejemplo, lactosa) y/u otros principios activos (por ejemplo, antibióticos, antivirales). La combinación puede contener cualquier razón o cantidad relativa deseada de sal de calcio, sal de sodio, excipientes y otros componentes (por ejemplo, antibióticos, antivirales).

Si se desea, pueden prepararse polvos secos usando polímeros que se adaptan para optimizar las características de las partículas incluyendo: i) interacciones entre el agente (por ejemplo, sal, otro principio activo tal como un antibiótico o antiviral) que va a administrarse y el polímero para proporcionar estabilización del agente y retención de la actividad tras la administración; ii) velocidad de degradación de polímeros y por tanto perfil de liberación del agente; iii) características de superficies y capacidades de direccionamiento mediante modificación química; y iv) porosidad de las partículas. Pueden prepararse partículas poliméricas usando evaporación de disolvente de emulsión simple y doble, secado por pulverización, extracción de disolvente, evaporación de disolvente, separación de fases, coacervación simple y compleja, polimerización interfacial, molienda por chorro y otros métodos bien conocidos por los expertos habituales en la técnica. Pueden prepararse partículas usando métodos para preparar microesferas o microcápsulas conocidos en la técnica.

Si se desea, las formulaciones farmacéuticas pueden incluir uno o más agentes adicionales, tales como agentes mucoactivos o mucolíticos, tensioactivos, antibióticos, antivirales, antihistaminas, antitusivos, broncodilatadores, agentes antiinflamatorios, esteroides, vacunas, adyuvantes, expectorantes, macromoléculas, agentes terapéuticos que son útiles para el mantenimiento crónico de FQ.

Los ejemplos de agentes mucoactivos o mucolíticos adecuados incluyen mucinas MUC5AC y MUC5B, ADNasa, N-acetilcisteína (NAC), cisteína, nacistelina, dornasa alfa, gelsolina, heparina, sulfato de heparina, antagonistas de P2Y2 (por ejemplo UTP, INS365), solución salina hipertónica y manitol.

Los tensioactivos adecuados incluyen L-alfa-dipalmitoilfosfatidilcolina (“DPPC”), difosfatidilglicerol (DPPG), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (DPPS), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC), alcoholes grasos, polioxietilen-9-lauril éter, ácidos grasos tensioactivos, trioleato de sorbitano (Span 85), glicocolato, surfactina, poloxomeros, ésteres de ácidos grasos de sorbitano, tiloxapol, fosfolípidos y azúcares alquilados.

Si se desea, la formulación de sal puede contener un antibiótico. Por ejemplo, formulaciones de sal para tratar neumonía bacteriana o VAT pueden comprender adicionalmente un antibiótico, tal como un macrólido (por ejemplo,

azitromicina, claritromicina y eritromicina), una tetraciclina (por ejemplo, doxiciclina, tigeciclina), una fluoroquinolona (por ejemplo, gemifloxacino, levofloxacino, ciprofloxacino y mocifloxacino), una cefalosporina (por ejemplo, ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima, cefepima), una penicilina (por ejemplo, amoxicilina, amoxicilina con clavulanato, ampicilina, piperacilina y ticarcilina) opcionalmente con un inhibidor de β-lactamasa (por ejemplo, sulbactam, tazobactam y ácido clavulánico), tal como ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam y ticarcilina con clavulanato, un aminoglucósido (por ejemplo, amikacina, arbekacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, rodoestreptomicina, estreptomicina, tobramicina y apramicina), un penem o carbapenem (por ejemplo doripenem, ertapenem, imipenem y meropenem), una monobactama (por ejemplo, aztreonam), una oxazolidinona (por ejemplo, linezolid), vancomicina, antibióticos de glicopéptido (por ejemplo telavancina), antibióticos contra tuberculosis-*Mycobacterium* y similares.

Si se desea, la formulación de sal puede contener un agente para tratar infecciones con micobacterias, tal como *Mycobacterium tuberculosis*. Los agentes adecuados para tratar infecciones con micobacterias (por ejemplo, *M. tuberculosis*) incluyen un aminoglucósido (por ejemplo capreomicina, kanamicina, estreptomicina), una fluoroquinolona (por ejemplo ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino), isozianida y análogos de isozianida (por ejemplo etionamida), aminosalicilato, cicloserina, diarilquinolina, etambutol, pirazinamida, protionamida, rifampina y similares.

Si se desea, la formulación de sal puede contener un agente antiviral adecuado, tal como oseltamivir, zanamavir amantidina o rimantadina, ribavirina, ganciclovir, valganciclovir, foscavir, Cytogam® (inmunoglobulina frente a citomegalovirus), pleconaril, rupintrivir, palivizumab, motavizumab, citarabina, docosanol, denotivir, cidofovir y aciclovir. La formulación de sal puede contener un agente antigripal adecuado, tal como zanamivir, oseltamivir, amantadina o rimantadina.

Las antihistaminas adecuadas incluyen clemastina, asalastina, loratadina, fexofenadina y similares.

Los antitusivos adecuados incluyen benzonatato, benproperina, clobutinal, difenhidramina, dextrometorfano, dibunato, fedrilato, glaucina, oxalamina, piperidiona, opioides tales como codina y similares.

Los broncodilatadores adecuados incluyen agonistas $beta_2$ de acción corta, agonistas $beta_2$ de acción prolongada (LABA), anagonistas muscarínicos de acción prolongada (LAMA), combinaciones de LABA y LAMA, metilxantinas y similares. Los agonistas $beta_2$ de acción corta adecuados incluyen albuterol, epinefrina, pirbuterol, levalbuterol, metaproteronol, maxair y similares. Los LABA adecuados incluyen salmeterol, formoterol e isómeros (por ejemplo arformoterol), clenbuterol, tulobuterol, vilanterol (Revolair™), indacaterol y similares. Los ejemplos de LAMA incluyen tiotroprio, glicopirrolato, aclidinio, ipratropio y similares. Los ejemplos de combinaciones de LABA y LAMA incluyen indacaterol con glicopirrolato, indacaterol con tiotropio y similares. Los ejemplos de metilxantina incluyen teofilina y similares.

Los agentes antiinflamatorios adecuados incluyen inhibidores de leucotrienos, inhibidores de PDE4, otros agentes antiinflamatorios y similares. Los inhibidores de leucotrienos adecuados incluyen montelukast (inhibidores de cisteinil leucotrienos), masilukast, zafirleukast (inhibidores del receptor de leucotrienos D4 y E4), zileutón (inhibidores de 5-lipoxigenasa) y similares. Los inhibidores de PDE4 adecuados incluyen cilomilast, roflumilast y similares. Otros agentes antiinflamatorios incluyen omalizumab (inmunoglobulina anti-IgE), inhibidores del receptor de IL-13 e IL-13 (tal como AMG-317, MILR1444A, CAT-354, QAX576, IMA-638, Anrukinzumab, IMA-026, MK-6105,DOM-0910 y similares), inhibidores del receptor de IL-4 e IL-4 (tal como Pitrakinra, AER-003, AIR-645, APG-201, DOM-0919 y similares), inhibidores de IL-1 tales como canakinumab, antagonistas del receptor CRTh2 tales como AZD 1981 (de AstraZeneca), inhibidor de la elastasa de neutrófilos tal como AZD9668 (de AstraZeneca), inhibidor de P38 cinasa tal como losmapimed y similares.

Los esteroides adecuados incluyen corticosteroides, combinaciones de corticosteroides y LABA, combinaciones de corticosteroides y LAMA, y similares. Los corticosteroides adecuados incluyen budesonida, fluticasona, flunisolida, triamcinolona, beclometasona, mometasona, ciclesonida, dexametasona y similares. Las combinaciones de corticosteroides y LABA incluyen salmeterol con fluticasona, formoterol con budesonida, formoterol con fluticasona, formoterol con mometasona, indacaterol con mometasona y similares.

Los expectorantes adecuados incluyen guaifenesina, guaiacolsulfonato, cloruro de amonio, yoduro de potasio, tiloxapol, pentasulfuro de antimonio y similares.

Vacunas adecuadas tales como vacunas contra la gripe inhaladas por vía nasal y similares.

Las macromoléculas adecuadas incluyen proteínas y péptidos grandes, polisacáridos y oligosacáridos, y moléculas de ácido nucleico de ADN o ARN y sus análogos que tienen actividades terapéuticas, profilácticas o de diagnóstico. Las proteínas pueden incluir anticuerpos tales como un anticuerpo monoclonal. Las moléculas de ácido nucleico incluyen genes, moléculas antisentido tales como ARNip que se unen a ARN, ADN complementario o ribosomas que inhiben la transcripción o traducción.

Agentes terapéuticos seleccionados que son útiles para el mantenimiento crónico de la fibrosis quística incluyen antibióticos/antibióticos macrólidos, broncodilatadores, LABA inhalados y agentes para promover la eliminación de

secreciones de las vías respiratorias. Los ejemplos adecuados de antibióticos/antibióticos macrólidos incluyen tobramicina, azitromicina, ciprofloxacino, colistina y similares. Los ejemplos adecuados de broncodilatadores incluyen agonistas beta$_2$ de acción corta inhalados tales como albuterol y similares. Los ejemplos adecuados de LABA inhalados incluyen salmeterol, formoterol y similares. Los ejemplos de agentes adecuados para promover la eliminación de secreciones de las vías respiratorias incluyen dornasa alfa, solución salina hipertónica y similares.

Pueden encontrarse algunos ejemplos no limitativos de las formulaciones farmacéuticas de la invención en la tabla 1.

Tabla 1.						
Formulaciones líquidas de cloruro de calcio						
Formulación n.º	Tonicidad (1X = isotónica)	$CaCl_2$ (% p/v)	$CaCl_2$ (M)	NaCl (% p/v)	NaCl (M)	Razón de Ca:Na (molar)
1	8X	9,0	0,81	0,90	0,15	5,4
2	11X	13	1,2	0,90	0,15	8,0
3	0,5X	0,59	0,053	0,040	0,0070	7,6
4	1X	1,2	0,11	0,080	0,013	8,5
5	2X	2,4	0,21	0,16	0,027	7,8
6	4X	4,7	0,42	0,31	0,053	7,9
7	8X	9,4	0,85	0,62	0,11	7,7
Formulaciones líquidas de lactato de calcio						
Formulación	Tonicidad (1X = isotónica)	Lactato de Ca (%)	Lactato de Ca (M)	NaCl (%)	NaCl (M)	
8	0,5X	1,4	0,065	0,048	0,0082	7,9
9	1X	2,9	0,13	0,10	0,016	8,1
10	2X	5,7	0,26	0,19	0,033	7,9
11	3X	9,0	0,41	0,30	0,052	7,9
12	4X	11	0,52	0,38	0,065	8,0
13	8X	23	1,0	0,77	0,13	7,7
Formulaciones de polvo						

Formulación n.º	Composición de la formulación						
	Excipiente	Excipiente (% en peso)	Sal de calcio	Sal de calcio (% en peso)	Sal de sodio	Sal de sodio (% en peso)	Razón de Ca:Na (molar)
14	10,0	Cloruro de calcio	83,3	Sulfato de sodio	6,7	10,0	8
15	67,6	Cloruro de calcio	30,0	Sulfato de sodio	2,4	67,6	8
16	10,0	Cloruro de calcio	82,0	Citrato de sodio	8,0	10,0	8
17	67,1	Cloruro de calcio	30,0	Citrato de sodio	2,9	67,1	8
18	10,0	Lactato de calcio	87,1	Cloruro de sodio	2,9	10,0	8
19	69,0	Lactato de calcio	30,0	Cloruro de sodio	1,0	69,0	8
20	10,0	Cloruro de calcio	77,6	Sulfato de sodio	12,4	10,0	4
21	65,2	Cloruro de calcio	30,0	Sulfato de sodio	4,8	65,2	4
22	10,0	Cloruro de calcio	75,4	Citrato de sodio	14,6	10,0	4
23	64,2	Cloruro de calcio	30,0	Citrato de sodio	5,8	64,2	4
24	10,0	Lactato de calcio	84,4	Cloruro de sodio	5,6	10,0	4
25	68,0	Lactato de calcio	30,0	Cloruro de sodio	2,0	68,0	4

4. Tratamiento de enfermedades pulmonares o infecciones del aparato respiratorio

También se describen métodos para el tratamiento (incluyendo tratamiento profiláctico) de enfermedades pulmonares, tales como asma (por ejemplo, alérgica/crónica, infantil, de aparición tardía, con tos variante u obstructiva crónica), hiperreactividad del aparato respiratorio, rinitis alérgica (estacional o no estacional), bronquiectasia, bronquitis crónica, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, sibilancia en los primeros años de vida y similares, y para el tratamiento (incluyendo tratamiento profiláctico) de agravamientos

agudos de estas enfermedades crónicas, tales como agravamientos provocados por una infección viral (por ejemplo, virus influenza tales como virus influenza A o virus influenza B, virus parainfluenza, virus respiratorio sincitial, rinovirus, adenovirus, metapneumovirus, virus de coxsackie, echovirus, coronavirus, virus del herpes simple, citomegalovirus y similares), infecciones bacterianas (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae*, que se denomina comúnmente neumococo, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, una bacteria de la familia Citrobacter, una bacteria de la familia Ecinetobacter, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis* y similares), infecciones fúngicas (por ejemplo, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jiroveci*, *Coccidioides immitis*, *Candida albicans*, *Pneumocystis jirovecii* (que provoca neumonía por *Pneumocystis* (PCP), también denominada neumocistosis) y similares), infecciones parasitarias (por ejemplo, *Toxoplasma gondii*, *Strongyloides stercoralis* y similares), o irritantes y alérgenos medioambientales (por ejemplo, aeroalérgenos, incluyendo polen, ácaros del polvo doméstico, caspa de animales tal como caspa del gato, mohos, cucarachas, materiales particulados transportados por el aire y similares).

También se describen métodos para el tratamiento (incluyendo tratamiento profiláctico) de enfermedades infecciosas del aparato respiratorio, por ejemplo, infecciones virales o infecciones bacterianas del aparato respiratorio.

Las infecciones del aparato respiratorio a modo de ejemplo incluyen neumonía (incluyendo neumonía adquirida en la comunidad, neumonía nosocomial (neumonía adquirida en el hospital, NAH; neumonía asociada a cuidados sanitarios, NACS), neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVM)), traqueobronquitis asociada a ventilación mecánica (TAVM), bronquitis, laringotraqueobronquitis (por ejemplo, laringotraqueobronquitis tras intubación y laringotraqueobronquitis infecciosa), tuberculosis, gripe, resfriado común e infecciones virales (por ejemplo, virus influenza (por ejemplo, virus influenza A, virus influenza B), virus parainfluenza (por ejemplo, VPIh-1, VPIh-2, VPIh-3, VPIh-4), virus respiratorio sincitial, rinovirus, adenovirus, metapneumovirus, virus de coxsackie, echovirus, coronavirus, virus del herpes simple, citomegalovirus, enterovirus, SARS-coronavirus y viruela, y similares), infecciones bacterianas (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae*, que se denomina comúnmente neumococo, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Serratia marcescens*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, una bacteria de la familia Citrobacter, una bacteria de la familia Ecinetobacter), infecciones fúngicas (por ejemplo, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jiroveci*, *Coccidioides immitis*, *Candida albicans*, *Pneumocystis jirovecii* (que provoca neumonía por *Pneumocystis* (PCP), también denominada neumocistosis) y similares), infecciones parasitarias (por ejemplo, *Toxoplasma gondii*, *Strongyloides stercoralis* y similares).

En ciertas realizaciones, la infección del aparato respiratorio es una infección bacteriana, tal como neumonía bacteriana. En ciertas realizaciones, la infección bacteriana está provocada por una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *Streptococcus pneumoniae* (también denominado neumococo), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bordatella pertussis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, una bacteria de la familia Citrobacter, una bacteria de la familia Ecinetobacter y *Mycobacterium tuberculosis*.

En ciertas realizaciones, la infección del aparato respiratorio es una infección viral, tal como gripe o neumonía viral. En ciertas realizaciones, la infección viral está provocada por un virus seleccionado del grupo que consiste en virus influenza (por ejemplo, virus influenza A, virus influenza B), virus respiratorio sincitial, adenovirus, metapneumovirus, citomegalovirus, virus parainfluenza (por ejemplo, VPIh-1, VPIh-2, VPIh-3, VPIh-4), rinovirus, adenovirus, virus de coxsackie, echovirus, coronavirus, virus del herpes simple, SARS-coronavirus y viruela.

En ciertas realizaciones, la infección del aparato respiratorio es una infección fúngica. En ciertas realizaciones, la infección fúngica está provocada por un hongo seleccionado del grupo que consiste en *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jiroveci*, *Coccidioides immitis*, *Candida albicans* y *Pneumocystis jirovecii* (que provoca neumonía por *Pneumocystis* (PCP), también denominada neumocistosis).

En ciertas realizaciones, la infección del aparato respiratorio es una infección parasitaria. En ciertas realizaciones, la infección parasitaria está provocada por un parásito seleccionado del grupo que consiste en *Toxoplasma gondii* y *Strongyloides stercoralis*.

También se describe un método para tratar (incluyendo tratar profilácticamente) un individuo con una enfermedad pulmonar (por ejemplo, un individuo que tiene una enfermedad pulmonar, que presenta síntomas de una enfermedad pulmonar, o propenso a una enfermedad pulmonar), que comprende administrar al aparato respiratorio del individuo una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende una sal de calcio y una sal de

sodio como principios activos, en la que la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol).

También se describe un método para tratar (incluyendo tratar profilácticamente) un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar crónica en un individuo, que comprende administrar al aparato respiratorio del individuo que lo necesita (por ejemplo, un individuo que tiene un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar, que presenta síntomas de un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar, o propenso a un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar) una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende una sal de calcio y una sal de sodio como principios activos, en la que la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de desde aproximadamente 4:1 (mol:mol) hasta aproximadamente 16:1 (mol:mol). Las enfermedades pulmonares a modo de ejemplo incluyen asma (por ejemplo, alérgica/atópica, infantil, de aparición tardía, con tos variante u obstructiva crónica), hiperreactividad del aparato respiratorio, rinitis alérgica (estacional o no estacional), bronquiectasia, bronquitis crónica, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, sibilancia en los primeros años de vida y similares.

En cierta realización, la gripe está provocada por o bien el virus influenza A o bien el virus influenza B.

En ciertas realizaciones, una enfermedad similar a gripe está provocada por VRS, rinovirus, adenovirus, parainfluenza, coronavirus humanos (incluyendo el virus que provoca síndrome respiratorio agudo grave) y metapneumovirus.

En ciertas realizaciones, la neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVM), la traqueobronquitis asociada a ventilación mecánica (TAVM) o la neumonía adquirida en el hospital (NAH) está provocada por *pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *S.aureus*, *Haemophilus influenzae* no tipificable (NTHI), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp*., *E coli*, *Candida spp* (un hongo), *Serratia*, *Enterobacter spp* y *Stenotrophomonas*. Alternativamente, NAVM o TAVM pueden estar provocadas por bacterias Gram-positivas o Gram-negativas asociadas con la provocación de neumonía.

En ciertas realizaciones, la neumonía asociada a la comunidad (NAC) está provocada por al menos una de las siguientes bacterias: *Moraxella catarralis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophilia pneumoniae* o *Chlamydia pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *chlamydophia*, *mycoplasma*, y *Legionella*. Alternativamente, o además de las bacterias mencionadas anteriormente, NAC también puede estar provocada por al menos uno de los siguientes hongos: *Coccidiomycosis*, histoplasmosis y *Cryptococcocus*. Alternativamente, NAC puede estar provocada por bacterias Gram-positivas o Gram-negativas asociadas con la provocación de neumonía.

En ciertas realizaciones, un agravamiento agudo de un paciente con asma está provocado por una infección viral del aparato respiratorio superior o bacterias Gram-positivas o Gram-negativas asociadas con neumonía, incluyendo NAC. Alternativamente, o además, un agravamiento agudo puede estar provocado por alérgenos o factores medioambientales tales como ácaros del polvo doméstico, huevos o polen. Un agravamiento agudo de un paciente con EPOC está provocado por las mismas causas que para el asma, y adicionalmente por *Haemophilus influenzae*, neumococo y *Moraxella*. Agravamientos leves de FQ pueden estar provocados por todos los anteriores, además de los patógenos bacterianos oportunistas, tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei* y similares, que caracterizan la colonización de las vías respiratorias en FQ, y también por micobacterias atípicas y *Stenotrophomonas*.

Una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica tal como se describe en el presente documento puede administrarse al aparato respiratorio de un individuo (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano u otro primate, o animal domesticado, tal como cerdos, vacas, ovejas, pollos) que lo necesita. Preferiblemente, la formulación farmacéutica puede administrarse mediante inhalación de un aerosol.

Las formulaciones farmacéuticas pueden administrarse para alterar las propiedades biofísicas y/o biológicas del revestimiento mucoso del aparato respiratorio (por ejemplo, el fluido de revestimiento de las vías respiratorias) y el tejido subyacente (por ejemplo, epitelio del aparato respiratorio). Estas propiedades incluyen, por ejemplo, gelificación en la superficie de la mucosa, tensión superficial del revestimiento mucoso, viscosidad y/o elasticidad superficial del revestimiento mucoso, viscosidad y/o elasticidad volumétrica del revestimiento mucoso, hidratación de las vías respiratorias o batido ciliar.

Se describe en el presente documento: un método para tratar (incluyendo tratar profilácticamente) a un individuo con una infección bacteriana del aparato respiratorio, un individuo que presenta síntomas de una infección bacteriana del aparato respiratorio, o un individuo que corre el riesgo de contraer una infección bacteriana del aparato respiratorio, que comprende administrar al aparato respiratorio del individuo una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica tal como se describe en el presente documento.

En ciertas realizaciones, el individuo que se está tratando está infectado, o corre el riesgo de infectarse por una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Legionella pneumophila*, todas las cuales podrían provocar neumonía. En realizaciones particulares, el individuo está infectado,

o corre el riesgo de infectarse, por *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* o *Pseudomonas aeruginosa*. En una realización más particular, el individuo está infectado o corre el riesgo de infectarse por *Streptococcus pneumoniae*.

También se describe un método para tratar (incluyendo tratar profilácticamente) a un individuo con una infección viral del aparato respiratorio, un individuo que presenta síntomas de una infección viral del aparato respiratorio o un individuo que corre el riesgo de contraer una infección viral del aparato respiratorio, que comprende administrar al aparato respiratorio del individuo una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica tal como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, el individuo que se está tratando está infectado, o corre el riesgo de infectarse, por un virus seleccionado del grupo que consiste en virus influenza (por ejemplo, virus Influenza A, virus Influenza B), virus respiratorio sincitial, adenovirus, metapneumovirus, citomegalovirus, virus parainfluenza (por ejemplo, VPIh-1, VPIh-2, VPIh-3, VPIh-4), rinovirus, coronavirus (por ejemplo, SARS-coronavirus), poxvirus (por ejemplo, viruela), enterovirus y virus del herpes simple.

Un individuo que corre el riesgo de una infección del aparato respiratorio por un patógeno (por ejemplo, una bacteria, un virus) puede tratarse profilácticamente administrando una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica tal como se describe en el presente documento. El método puede usarse para prevenir o disminuir la tasa o incidencia de infección por un patógeno (por ejemplo, una bacteria, un virus) que produce una infección del aparato respiratorio.

Generalmente, los individuos corren el riesgo de infección por un patógeno (por ejemplo, un virus, una bacteria) que produce una infección del aparato respiratorio cuando se exponen a un patógeno de este tipo con más frecuencia que la población general, o tienen una capacidad disminuida para resistir a la infección. Los individuos que corren el riesgo de una infección de este tipo incluyen, por ejemplo, profesionales sanitarios, individuos que están inmunosuprimidos (por ejemplo, médicamente, debido a otras infecciones, o por otros motivos), individuos ancianos y jóvenes (por ejemplo, bebés), y cuidadores y miembros de la familia de personas infectadas.

En realizaciones a modo de ejemplo, la formulación farmacéutica usada para tratar (incluyendo tratar profilácticamente) una infección del aparato respiratorio comprende una sal de calcio y una sal de sodio, en la que la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de aproximadamente 8:1 (mol:mol), o aproximadamente 16:1.(mol:mol).

También se describe un método para tratar (incluyendo tratar profilácticamente) a un individuo con una enfermedad pulmonar (por ejemplo, un individuo que tiene una enfermedad pulmonar, que presenta síntomas de una enfermedad pulmonar, o propenso a una enfermedad pulmonar), que comprende administrar al aparato respiratorio del individuo una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica tal como se describe en el presente documento. Las enfermedades pulmonares a modo de ejemplo que pueden tratarse incluyen asma (por ejemplo, alérgica/atópica, infantil, de aparición tardía, con tos variante u obstructiva crónica), sibilancia en los primeros años de vida, rinitis alérgica (estacional o no estacional), hiperreactividad del aparato respiratorio, bronquiectasia, bronquitis crónica, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística y similares.

También se describe un método para tratar (incluyendo tratar profilácticamente) un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar crónica en un individuo, que comprende administrar al aparato respiratorio del individuo que lo necesita (por ejemplo, un individuo que tiene un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar, que presenta síntomas de un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar, o propenso a un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar) una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica tal como se describe en el presente documento. Las enfermedades pulmonares a modo de ejemplo que pueden tratarse incluyen asma (por ejemplo, alérgica/atópica, infantil, de aparición tardía, con tos variante u obstructiva crónica), sibilancia en los primeros años de vida, rinitis alérgica (estacional o no estacional), hiperreactividad del aparato respiratorio, bronquiectasia, bronquitis crónica, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística y similares.

Generalmente, un individuo es propenso a una enfermedad pulmonar o un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar cuando se ha determinado, por ejemplo, mediante historia del individuo o de la familia, o pruebas genéticas, que tiene una probabilidad significativamente superior a la normal de tener la aparición o recaída de una enfermedad pulmonar o un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar o están expuesto a un patógeno pulmonar o respiratorio con más frecuencia que la población general, o tienen una capacidad disminuida para resistir la infección. Los individuos que corren el riesgo de una infección por un patógeno de este tipo incluyen, por ejemplo, profesionales sanitarios, individuos que están inmunosuprimidos (por ejemplo, médicamente, debido a otras infecciones, o por otros motivos), pacientes en una unidad de cuidados intensivos, individuos ancianos y jóvenes (por ejemplo, bebés), individuos con enfermedad respiratoria subyacente crónica (por ejemplo, asma, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística) que se han sometido a cirugía o con lesión por traumatismo y cuidadores y miembros de la familia de personas infectadas.

Las formulaciones farmacéuticas administradas según cualquiera de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento pueden ser hipotónicas, isotónicas o hipertónicas según se desee. Por ejemplo, la formulación farmacéutica administrada según cualquier método descrito en el presente documento puede tener una tonicidad de

aproximadamente 0,1X, una tonicidad de aproximadamente 0,25X, una tonicidad de aproximadamente 0,5X, una tonicidad de aproximadamente 1X, una tonicidad de aproximadamente 2X, una tonicidad de aproximadamente 3X, una tonicidad de aproximadamente 4X, una tonicidad de aproximadamente 5X, una tonicidad de aproximadamente 6X, una tonicidad de aproximadamente 7X, una tonicidad de aproximadamente 8X, una tonicidad de aproximadamente 9X, una tonicidad de aproximadamente 10X, una tonicidad de al menos aproximadamente 1X, una tonicidad de al menos aproximadamente 2X, una tonicidad de al menos aproximadamente 3X, una tonicidad de al menos aproximadamente 4X, una tonicidad de al menos aproximadamente 5X, una tonicidad de al menos aproximadamente 6X, una tonicidad de al menos aproximadamente 7X, una tonicidad de al menos aproximadamente 8X, una tonicidad de al menos aproximadamente 9X, una tonicidad de al menos aproximadamente 10X, entre aproximadamente 0,1X y aproximadamente 1X, entre aproximadamente 0,1X y aproximadamente 0,5X, entre aproximadamente 0,5X y aproximadamente 2X, entre aproximadamente 1X y aproximadamente 4X, entre aproximadamente 1X y aproximadamente 2X, entre aproximadamente 2X y aproximadamente 10X, o entre aproximadamente 4X y aproximadamente 8X

5. Reducción del contagio

También se describen métodos para reducir el contagio (por ejemplo, reducir la transmisión o propagación) de una infección del aparato respiratorio (por ejemplo, una infección viral, una infección bacteriana) que comprende administrar al aparato respiratorio (por ejemplo, pulmones, cavidad nasal) de un individuo infectado con un patógeno que produce una infección del aparato respiratorio, que presenta síntomas de una infección del aparato respiratorio, o que corre el riesgo de contraer una infección del aparato respiratorio por un patógeno (por ejemplo, una bacteria, un virus), una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica tal como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, el individuo puede tener una infección del aparato respiratorio producida por una bacteria, presentar síntomas de una infección del aparato respiratorio producida por una bacteria, o correr el riesgo de una infección de este tipo tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el individuo puede estar infectado, o correr el riesgo de infectarse, por una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Haemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Moraxella catarrhalis, Chlamydophila pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, Legionella pneumophila, Bacillus anthracis, Mycobacterium tuberculosis, Bordetella pertussis, Burkholderia cepacia, Burkholderia pseudomallei, Bacillus anthracis, Bacillus cereus, Stenotrophomonas maltophilia*, una bacteria de la familia Citrobacter, y una bacteria de la familia Ecinetobacter. En realizaciones particulares, el individuo está infectado o corre el riesgo de infectarse por *Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae* o *Pseudomonas aeruginosa*. En una realización más particular, el individuo está infectado, o corre el riesgo de infectarse por *Streptococcus pneumoniae*.

En otras realizaciones, el individuo puede estar infectado por o correr el riesgo de infectarse por, un virus seleccionado del grupo que consiste en virus influenza (por ejemplo, virus influenza A, virus influenza B), virus respiratorio sincitial, adenovirus, metapneumovirus, citomegalovirus, virus parainfluenza (por ejemplo, VPIh-1, VPIh-2, VPIh-3, VPIh-4), rinovirus, coronoavirus (por ejemplo, SARS-coronavirus), poxvirus (por ejemplo, viruela), enterovirus y virus del herpes simple.

En realizaciones a modo de ejemplo, la formulación farmacéutica usada para reducir el contagio/propagación de una infección del aparato respiratorio comprende una sal de calcio y una sal de sodio, en la que la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de aproximadamente 8:1 (mol:mol), o aproximadamente 16:1 (mol:mol).

Las formulaciones farmacéuticas administradas según cualquiera de los métodos de reducción del contagio en el presente documento pueden ser hipotónicas, isotónicas o hipertónicas, según se desee. Por ejemplo, la formulación farmacéutica administrada según cualquier método descrito en el presente documento puede tener una tonicidad de aproximadamente 0,1X, una tonicidad de aproximadamente 0,25X, una tonicidad de aproximadamente 0,5X, una tonicidad de aproximadamente 1X, una tonicidad de aproximadamente 2X, una tonicidad de aproximadamente 3X, una tonicidad de aproximadamente 4X, una tonicidad de aproximadamente 5X, una tonicidad de aproximadamente 6X, una tonicidad de aproximadamente 7X, una tonicidad de aproximadamente 8X, una tonicidad de aproximadamente 9X, una tonicidad de aproximadamente 10X, una tonicidad de al menos aproximadamente 1X, una tonicidad de al menos aproximadamente 2X, una tonicidad de al menos aproximadamente 3X, una tonicidad de al menos aproximadamente 4X, una tonicidad de al menos aproximadamente 5X, una tonicidad de al menos aproximadamente 6X, una tonicidad de al menos aproximadamente 7X, una tonicidad de al menos aproximadamente 8X, una tonicidad de al menos aproximadamente 9X, una tonicidad de al menos aproximadamente 10X, entre aproximadamente 0,1X y aproximadamente 1X, entre aproximadamente 0,1X y aproximadamente 0,5X, entre aproximadamente 0,5X y aproximadamente 2X, entre aproximadamente 1X y aproximadamente 4X, entre aproximadamente 1X y aproximadamente 2X, entre aproximadamente 2X y aproximadamente 10X, o entre aproximadamente 4X y aproximadamente 8X.

6. Administración de las formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas tal como se describe en el presente documento están destinadas para su administración al aparato respiratorio (por ejemplo, a la superficie de la mucosa del aparato respiratorio), y pueden

administrarse de cualquier forma adecuada, tal como una disolución, una suspensión, una pulverización, una vaporización, una espuma, un gel, un vapor, gotitas, partículas o una forma de polvo seco. Preferiblemente, una formulación farmacéutica tal como se describe en el presente documento se aerosoliza para su administración. Pueden usarse muchos métodos y dispositivos adecuados que son convencionales y bien conocidos en la técnica para aerosolizar la formulación.

Por ejemplo, la formulación farmacéutica puede aerosolizarse para su administración a través de las vías respiratorias orales usando un inhalador de dosis dosificada (por ejemplo, inhaladores de dosis dosificada presurizados (pMDI) que incluye un propelente de HFA, o un propelente distinto de HFA) con o sin una cámara espaciadora o de retención, un nebulizador, un atomizador, un pulverizador continuo, un pulverizador oral o un inhalador de polvo seco (DPI). La formulación farmacéutica puede aerosolizarse para su administración a través de las vías respiratorias nasales usando un pulverizador o bomba nasal, un inhalador de dosis dosificada (por ejemplo, un inhalador de dosis dosificada presurizado (pMDI) que incluye un propelente de HFA, propelente distinto de HFA) con o sin una cámara espaciadora o de retención, un nebulizador con o sin un adaptador o cánulas nasales, un atomizador, un pulverizador continuo o un inhalador de polvo seco (DPI). La formulación farmacéutica también puede administrarse a la superficie de la mucosa nasal a través de, por ejemplo, lavado nasal y a las superficies de la mucosa orales a través de, por ejemplo, un lavado oral. La formulación farmacéutica puede administrarse a las superficies de la mucosa de los senos paranasales a través de, por ejemplo, nebulizadores con adaptadores nasales y nebulizadores nasales con flujos de aire oscilantes o pulsátiles.

La geometría de las vías respiratorias es una consideración importante cuando se selecciona un método adecuado para producir y administrar aerosoles de formulaciones farmacéuticas a los pulmones. Los pulmones están diseñados para atrapar partículas de materia extraña que se aspiran, tal como polvo. Hay tres mecanismos básicos de deposición: impacto, sedimentación y movimiento browniano (J. M. Padfield. 1987. In: D. Ganderton & T. Jones eds. Drug Delivery to the Respiratory Tract, Ellis Harwood, Chicherster, R.U.). El impacto se produce cuando las partículas no pueden permanecer dentro de la corriente de aire, particularmente en las ramificaciones de las vías respiratorias. Las partículas que impactan se adsorben en la capa de mucosidad que cubre las paredes bronquiales y finalmente se aclara de los pulmones mediante la acción mucociliar. El impacto en las vías respiratorias superiores se produce principalmente con partículas de más de 5 μm de diámetro aerodinámico. Las partículas más pequeñas (las de menos de aproximadamente 3 μm de diámetro aerodinámico) tienden a permanecer dentro de la corriente de aire y canalizarse hacia la parte profunda de los pulmones mediante sedimentación. La sedimentación a menudo se produce en la parte inferior del sistema respiratorio en la que el flujo de aire es más lento. Pueden depositarse partículas muy pequeñas (las de menos de aproximadamente 0,6 μm) mediante movimiento browniano.

Para la administración, se selecciona un método adecuado (por ejemplo, nebulización, inhalador de polvo seco) para producir aerosoles con el tamaño de partícula apropiado para la administración preferente a la región deseada del aparato respiratorio, tal como la parte profunda de los pulmones (generalmente partículas de entre aproximadamente 0,6 micrómetros y 5 micrómetros de diámetro), las vías respiratorias superiores (generalmente partículas de aproximadamente 3 micrómetros de diámetro o superior), o la parte profunda de los pulmones y las vías respiratorias superiores.

Una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica tal como se describe en el presente documento se administra a un individuo que lo necesita, tal como un individuo que tiene una infección del aparato respiratorio, que muestra síntomas de una infección del aparato respiratorio, o que corre el riesgo de contraer una infección del aparato respiratorio. Los individuos que están hospitalizados, y particularmente sometidos a ventilación mecánica, corren el riesgo de infección por patógenos que producen una infección del aparato respiratorio.

Una “cantidad eficaz” es una cantidad que es suficiente para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado, tal como una cantidad suficiente para reducir síntomas de infección (por ejemplo, fiebre, tos, estornudos, secreción nasal, diarrea y similares), para reducir el tiempo hasta la recuperación, para reducir los patógenos en un individuo, para inhibir los patógenos que pasan a través de la mucosa pulmonar o el fluido de revestimiento de las vías respiratorias, para disminuir la incidencia o la tasa de infección con patógenos que producen infección del aparato respiratorio, y/o para disminuir la proliferación de partículas exhaladas que contienen patógenos que producen una infección del aparato respiratorio. Más específicamente, una cantidad eficaz puede ser una cantidad que es suficiente para aumentar la viscoelaticidad superficial y/o volumétrica de la mucosa del aparato respiratorio (por ejemplo, fluido de revestimiento de las vías respiratorias), para aumentar la gelificación de la mucosa del aparato respiratorio (por ejemplo, en la gelificación superficial y/o volumétrica), para aumentar la tensión superficial de la mucosa del aparato respiratorio, para aumentar la elasticidad de la mucosa del aparato respiratorio (por ejemplo, la elasticidad superficial y/o la elasticidad volumétrica), para aumentar la viscosidad superficial de la mucosa del aparato respiratorio (por ejemplo, la viscosidad de superficie y/o la viscosidad en masa), para reducir la cantidad de partículas exhaladas, para reducir la carga de patógenos (por ejemplo, bacterianos, virales) (por ejemplo reduciendo la captación de patógenos en el interior del organismo, destruyendo o inactivando los patógenos existentes encontrados en el organismo, aumentando el aclaramiento de patógenos del organismo tal como aumentando la hidratación de las vías respiratorias, aumentando el batido ciliar, aumentando el aclaramiento mucociliar (Groth *et al*, Thorax, 43(5):360-365 (1988) y similares). Dado que las formulaciones farmacéuticas se administran al aparato respiratorio, generalmente mediante inhalación, la dosis que se administra se refiere a la composición de la formulación (por ejemplo, concentración de sal de calcio, concentración de sal de sodio), a la tasa y a la eficacia de

aerosolización (por ejemplo, tasa y eficacia de nebulización), y al tiempo de exposición (por ejemplo, tiempo de nebulización). Por ejemplo, pueden administrarse dosis sustancialmente equivalentes usando una formulación farmacéutica líquida concentrada y un tiempo de nebulización corto (por ejemplo, 5 minutos), o usando una formulación farmacéutica líquida diluida y un tiempo de nebulización largo (por ejemplo, 30 minutos o más), o usando una formulación de polvo seco y un inhalador de polvo seco. El médico experto habitual puede determinar la dosificación apropiada basándose en estas consideraciones y en otros factores, por ejemplo, la edad, sensibilidad, tolerancia y bienestar global del individuo. Una formulación farmacéutica tal como se describe en el presente documento puede administrarse en una dosis única o en múltiples dosis, según se indique.

Puesto que la cantidad de cationes proporcionados puede variar dependiendo de la sal de calcio o sal de sodio particular seleccionada, la dosificación puede basarse en la cantidad de cationes deseada que debe administrarse a los pulmones. Por ejemplo, un mol de cloruro de calcio ($CaCl_2$) se disocia para proporcionar un mol de Ca^{2+}, pero un mol de fosfato de tricalcio ($Ca_3(PO_4)_2$) puede proporcionar tres moles de Ca^{2+}.

Generalmente, una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica administrará una dosis de aproximadamente 0,001 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,002 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,005 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 60 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 50 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 40 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 30 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 20 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 5 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,02 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,03 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,04 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,05 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,1 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,1 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 1 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,1 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 0,5 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 0,5 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,18 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,001 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,005 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,02 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 0,5 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis.

La cantidad de sodio administrada al aparato respiratorio depende de la cantidad de sal de calcio presente en la formulación, y de la razón de calcio:sodio deseada. En algunas realizaciones, la cantidad de sodio administrada al aparato respiratorio es de aproximadamente 0,001 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 0,01 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 0,1 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 1,0 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 0,001 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 1 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 0,01 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 1 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,1 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 1 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,2 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 0,8 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,3 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 0,7 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 0,4 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 0,6 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis.

En algunas realizaciones, la cantidad de calcio administrada al aparato respiratorio (por ejemplo, pulmones, vías respiratorias) es de aproximadamente 0,001 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,002 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,005 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 60 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 50 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 40 mg de

Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 30 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 20 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 5 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,02 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,03 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,04 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,05 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,1 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,1 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 1 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,1 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 0,5 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 0,5 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,18 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,001 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,005 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,02 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 0,5 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis.

En otras realizaciones, la cantidad de calcio administrada al aparato respiratorio superior (por ejemplo, cavidad nasal) es de aproximadamente 0,001 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,002 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,005 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 60 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 50 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 40 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 30 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 20 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 5 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,02 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,03 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,04 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,05 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,1 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,1 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 1 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,1 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 0,5 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,2 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 0,5 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,18 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,001 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,005 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,01 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,02 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 0,5 mg de Ca^{+2}/kg de peso corporal/dosis.

En algunas realizaciones, la cantidad de sodio administrada al aparato respiratorio (por ejemplo, pulmones, vías respiratorias) es de aproximadamente 0,001 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 0,01 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 0,1 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 1,0 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 0,001 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 1 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 0,01 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 1 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,1 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 1 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,2 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 0,8 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,3 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 0,7 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 0,4 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 0,6 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis.

En otras realizaciones, la cantidad de sodio administrada al aparato respiratorio superior (por ejemplo, cavidad nasal) es de aproximadamente 0,001 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 0,01 mg de Na^{+}/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg de

Na^+/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 0,1 mg de Na^+/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg de Na^+/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 1,0 mg de Na^+/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 10 mg de Na^+/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 0,001 mg de Na^+/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 1 mg de Na^+/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 0,01 mg de Na^+/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 1 mg de Na^+/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,1 mg de Na^+/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 1 mg de Na^+/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,2 mg de Na^+/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 0,8 mg de Na^+/kg de peso corporal/dosis, de aproximadamente 0,3 mg de Na^+/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 0,7 mg de Na^+/kg de peso corporal/dosis, o de aproximadamente 0,4 mg de Na^+/kg de peso corporal/dosis a aproximadamente 0,6 mg de Na^+/kg de peso corporal/dosis.

Las formulaciones farmacéuticas pueden administrarse al aparato respiratorio superior (por ejemplo, fosas nasales, cavidad nasal, garganta, faringe), a las vías respiratorias (por ejemplo, laringe, tráquea, bronquios, bronquiolos) o a los pulmones (por ejemplo, bronquiolos respiratorios, conductos alveolares, sacos alveolares, alvéolos).

Generalmente, los dispositivos de inhalación (por ejemplo, DPI) deben poder administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición descrita en el presente documento en una única inhalación. En algunos casos, sin embargo, para lograr los resultados terapéuticos deseados, pueden requerirse múltiples inhalaciones y/o administración frecuente. Por ejemplo, la dosis deseada de calcio y sodio puede administrarse con dos o más inhalaciones (por ejemplo, a partir de un inhalador de tipo cápsula o de tipo blister). Preferiblemente, cada dosis que se administra a un sujeto que lo necesita contiene una cantidad eficaz de una composición descrita en el presente documento y se administra usando no más de aproximadamente 4 inhalaciones. Por ejemplo, cada dosis de una composición descrita en el presente documento puede administrarse en una única inhalación o 2, 3 ó 4 inhalaciones. Las composiciones se administran preferiblemente en una única etapa activada por la respiración usando un DPI activado por la respiración.

Los intervalos adecuados entre dosis que proporcionan el efecto terapéutico deseado pueden determinarse basándose en la gravedad del estado (por ejemplo, infección), el bienestar global del sujeto y la tolerancia del sujeto a las formulaciones farmacéuticas y en otras consideraciones. Basándose en éstas y otras consideraciones, un médico puede determinar los intervalos apropiados entre dosis. Generalmente, una formulación farmacéutica se administra una vez, dos veces o tres veces al día, según sea necesario.

Si se desea o está indicado, la formulación farmacéutica puede administrarse con uno o más de otros agentes terapéuticos. Los otros agentes terapéuticos pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada, tal como vía oral, parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, intraarterial, intramuscular o subcutánea), tópica, mediante inhalación (por ejemplo, inhalación intrabronquial, intranasal u oral, gotas intranasales), rectal, vaginal y similares. La formulación farmacéutica puede administrarse antes, de manera sustancialmente concurrente con, o posteriormente a la administración del otro agente terapéutico. Preferiblemente, la formulación farmacéutica y el otro agente terapéutico se administran de modo que proporcionen un solapamiento sustancial de sus actividades farmacológicas.

Ejemplificación

Habiéndose descrito hasta ahora la invención de manera general, se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen únicamente para fines de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1: Razones de calcio con respecto a sodio

En este ejemplo, se sometieron a prueba formulaciones que comprendían calcio y sodio a diferentes razones con el fin de determinar si ciertas concentraciones y razones proporcionan actividades terapéuticas superiores (por ejemplo, reducción en títulos virales). Se identificó que las formulaciones con razones de Ca^{+2}:Na^+ de desde aproximadamente 4:1 hasta aproximadamente 16:1 de (mol:mol) tenían actividades terapéuticas superiores.

Métodos:

Se usó un modelo de cultivo celular de infección por influenza para estudiar los efectos de diferentes disoluciones nebulizadas sobre la infección viral. Se cultivaron células Calu-3 sobre membranas permeables (Transwells de 12 mm; tamaño de poro de 0,4 μm, Coming Lowell, MA) hasta que se establecieron cultivos confluentes (la membrana está completamente cubierta con células) y en interfase aire-líquido (ALI) eliminando los medios apicales y cultivando a 37ºC / 5% de CO_2. Las células se cultivaron durante >2 semanas en ALI antes de cada experimento.

Antes de cada experimento, se lavó la superficie apical de cada Transwell 3X con PBS. Posteriormente se expusieron las células a formulaciones nebulizadas usando una cámara de sedimentación y nebulizadores de la serie 8900. Inmediatamente tras la exposición, se sustituyeron los medios basolaterales (medios en el lado inferior de la membrana Transwell) por medios nuevos. Se expusieron pocillos por triplicado a cada formulación en cada prueba. Se expuso una segunda placa de cultivo celular a las mismas formulaciones para cuantificar la administración de calcio o sal total a las células.

Una hora tras la exposición, se infectaron las células con 10 μl de Influenza A/WSN/33/1 a una multiplicidad de infección de 0,1-0,01 (0,1-0,01 viriones por célula). Cuatro horas tras el tratamiento con aerosol, se lavaron las superficies apicales para eliminar la formulación en exceso y virus no unidos y se cultivaron las células durante otras 20 horas a 37ºC más 5% de CO_2. Al día siguiente (24 horas tras la infección) se recogió el virus liberado sobre la superficie apical de las células infectadas en medios de cultivo o PBS y se cuantificó la concentración de virus en el lavado apical mediante ensayo de $TCID_{50}$ (dosis infecciosa en el 50% del cultivo tisular). El ensayo de $TCID_{50}$ es un ensayo de dilución de punto final convencional que se usa para cuantificar un virus en una muestra.

Resultados:

(a) Razones de calcio con respecto a sodio.

Estudios *in vitro* previos han demostrado que las formulaciones que contienen una sal de sodio y una sal de calcio pueden suprimir las partículas exhaladas. Para determinar si ciertas concentraciones y/o razones de los dos cationes y/o sales podrían proporcionar actividades terapéuticas superiores, se sometió a prueba un panel de formulaciones que comprendían diversas concentraciones de cloruro de calcio y cloruro de sodio para determinar sus actividades respectivas en la reducción de la replicación viral de influenza. La concentración de sal total en las formulaciones sometidas a prueba oscilaba entre 0,115 M y 1,3 M. Se incluyó un control sin tratar (aire) en cada estudio y se normalizaron los títulos virales (Log $TCID_{50}$/ml) de los pocillos tratados con respecto al control de aire de cada estudio.

La figura 1 muestra el efecto de diversas concentraciones de sodio y calcio sobre la replicación viral. Para normalizar los datos de todos los experimentos, se determinó para cada experimento la tasa de cambio de la replicación viral en cada condición tratada, en comparación con la condición de nada de sal. Suponiendo que la replicación viral avanza según la ecuación $N_t=N_0*e^{(kt)}$ (en la que N_0 es el número original de partículas virales a tiempo 0, k es la constante de tasa de replicación y N_t es el número de partículas virales a tiempo t), entonces puede determinarse t(k-k') cuando t es fijo (todos los experimentos terminan en t) y k' es la nueva constante de tasa de replicación (por ejemplo, la constante de tasa de replicación en presencia de una formulación de sal particular). A través de este análisis, un valor superior representa una k' más pequeña y, por tanto, una mayor disminución en la tasa de infectividad viral (o mayor actividad en la reducción de la infección viral). Se generó un gráfico de contorno con el software de análisis JMP. El eje X representa la concentración de $CaCl_2$ creciente y el eje Y representa la concentración de NaCl creciente. Cada punto representa una formulación sometida a prueba con al menos tres pocillos por prueba. Se muestra la reducción de la infectividad viral mediante oscuridad creciente (es decir, números superiores y tonos más oscuros representan formulaciones con mayores efectos sobre la reducción de la replicación viral de influenza).

A medida que se aumentaba la concentración de calcio, se observó una disminución correspondiente en la infectividad viral, lo que concordaba con estudios anteriores que demostraban un efecto sensible a la dosis de calcio en este modelo. Además, estos estudios destacaron un intervalo de concentraciones de calcio con respecto a sodio que mostraban actividades antivirales superiores. Las concentraciones de calcio oscilaban entre 0,575 M y 1,15 M y las concentraciones de sodio oscilaban entre 0,075 M y 0,3 M, lo que daba como resultado razones de calcio con respecto a sodio de entre aproximadamente 4:1 y aproximadamente 16:1 (mol:mol), y un punto medio de 8:1 (mol:mol).

(b) Las formulaciones con una razón de 8:1 o una razón de 16:1 de calcio con respecto a sodio redujeron la infectividad viral de una manera sensible a la dosis.

A partir de las pruebas de varias formulaciones diferentes que comprendían calcio y sodio a diferentes razones, se identificaron formulaciones con razones de Ca^{+2}:Na^{+} a 8:1 o 16:1 (mol:mol) como particularmente eficaces en la reducción de la replicación viral. Para determinar si las formulaciones a estas razones eran eficaces a lo largo de un intervalo de concentraciones de sal, se realizaron estudios de respuesta a la dosis. Se formularon disoluciones concentradas de cloruro de calcio a una razón de 8:1 o una razón de 16:1 con respecto a cloruro de sodio y posteriormente se diluyeron en agua. A través de este enfoque, las razones de calcio con respecto a sodio se mantuvieron constantes, pero se redujo la concentración de cada ion. Las formulaciones de ambas razones redujeron la infección viral de una manera dependiente de la dosis (figuras 2A, 2B) y mostraron efectos comparables entre sí a concentraciones de calcio similares. En ambos casos, se aumentaron las dosis aumentando la tonicidad de la formulación líquida, mientras se mantenía constante el tiempo de dosificación.

<u>Ejemplo 2: Las formulaciones de calcio:sodio redujeron la infectividad de múltiples cepas de influenza *in vitro*</u>

En este ejemplo, se sometieron a prueba las actividades terapéuticas *in vitro* de formulaciones de calcio:sodio (con una razón de Ca^{2+}:Na^{+} a 8:1 (mol:mol)) usando múltiples cepas de virus influenza. Las formulaciones variaban en tonicidad (o bien 0,5X, 2X o bien 8X la tonicidad de una disolución isotónica). Se demostró que las formulaciones reducían eficazmente la infectividad de una amplia variedad de virus influenza.

Métodos:

Se cultivaron células Calu-3 en membranas permeables (Transwells de 12 mm; tamaño de poro de 0,4 μm, Coming

Lowell, MA) hasta que se establecieron cultivos confluentes (la membrana está completamente cubierta con células) y en interfase aire-líquido (ALI) eliminando los medios apicales y cultivando a 37ºC / 5% de CO_2. Las células se cultivaron durante >2 semanas en ALI antes de cada experimento. Se sembraron células epiteliales bronquiales humanas normales (NHBE) en el pase 2 sobre membranas permeables (Millicell de 12 mm, tamaño de poro de 0,4 μm; Millipore Billerica, MA) y se incubaron (37ºC, 5% de CO_2, HR del 95%) hasta la confluencia en condiciones de cultivo cubierto por líquido. Una vez alcanzada la confluencia, se eliminaron los medios apicales y se establecieron cultivos en ALI. Se cultivaron las células durante ≥4 semanas en ALI antes de cada experimento.

Antes de cada experimento, se lavó la superficie apical de cada tipo celular 3X con PBS. Posteriormente se expusieron las células a formulaciones nebulizadas con una cámara de sedimentación y nebulizadores de la serie 8900. En los experimentos realizados sobre células Calu-3, se expusieron las membranas Transwell a formulaciones de calcio:sodio a una razón molar de 8:1 (tonicidad de 0,5X, 2X y 8X; 1X = isotónica) por triplicado.

Los experimentos realizados sobre células NHBE implicaban exponer las membranas Millicell a formulaciones nebulizadas de calcio:sodio a una razón molar de 8:1 (tonicidad de 0,5X, 2X u 8X; 1X = isotónica). Inmediatamente tras la exposición, se sustituyeron los medios basolaterales (medios en el lado inferior de la membrana Transwell o Millicell) por medios nuevos.

Para los experimentos realizados tanto sobre células Calu-3 como células NHBE, se expusieron pocillos por triplicado para cada tipo celular a cada formulación en cada prueba. Se expuso una segunda placa de cultivo celular a las mismas formulaciones para cuantificar la administración de calcio o sal total a las células. Una hora tras la exposición, se infectaron las células con 5-10 μl de virus influenza a una multiplicidad de infección de 0,1-0,001 (0,1-0,001 viriones por célula). Cuatro horas tras el tratamiento con aerosol, se lavaron las superficies apicales para eliminar la formulación en exceso y el virus no unido y se cultivaron las células durante 20 horas adicionales a 37ºC más 5% de CO_2. Al día siguiente, se recogieron los virus que se liberaron sobre la superficie apical de las células infectadas en medios de cultivo o PBS y se cuantificó la concentración de virus en el lavado apical mediante ensayo de $TCID_{50}$ (dosis infecciosa en el 50% del cultivo tisular) (un ensayo de dilución de punto final convencional usado para cuantificar títulos virales). En la tabla 2 se enumeran las cepas de influenza usadas en este estudio.

Tabla 2. Cepas de influenza usadas en el ejemplo 2

Influenza A H1N1	Influenza A H3N2	Influenza B
A/WSN/33	A/Aichi/2/68	B/Mass/3/66
A/Puerto Rico/8/34	A/Panama/2007/99	
A/FM/1/47	A/Port Chalmers/1/73	
A/Weiss/43		
A/Swine/IA/40776/92		

Resultados:

(a) Las formulaciones de calcio:sodio redujeron la infectividad de una cepa de Influenza H3N2 in vitro.

El ejemplo 1 muestra que las formulaciones de calcio:sodio reducían eficazmente la replicación viral de la cepa de Influenza A/WSN/33/1 (H1N1). En este ejemplo, se sometieron a prueba las actividades de las formulaciones sobre una cepa de influenza diferente, A/Panama/2007/99 (H3N2). Además, puesto que las células Calu-3 son células inmortalizadas de origen pulmonar, también se sometieron a prueba cultivos de células epiteliales bronquiales humanos normales (NHBE). Estos cultivos son multicelulares y se someten mínimamente a pases *in vitro* antes de las pruebas.

Se expusieron células NHBE a formulaciones de calcio:sodio (razón de Ca:Na de 8:1) a diferentes tonicidades, y luego se infectaron con Influenza A/Panama/2007/99. Puesto que las células NHBE son células primarias, los cultivos se veían sometidos a variabilidad de donante a donante que no estaba presente en los cultivos de Calu-3. Para explicar esta variabilidad, se sometieron a prueba cultivos de NHBE de cuatro donantes diferentes. El tratamiento de los cultivos de células NHBE dio como resultado títulos de influenza reducidos en todos los donantes sometidos a prueba, con una reducción máxima de más de 100 veces en cada caso (figura 3). Por tanto, las formulaciones de calcio:sodio fueron eficaces en la reducción de la infectividad viral en células Calu-3 así como en cultivos de células NHBE primarias, lo que apoya adicionalmente los valores terapéuticos de las formulaciones para tratar (incluyendo tratar profilácticamente) la infección por influenza.

(b) Las formulaciones de calcio:sodio redujeron la infectividad de múltiples cepas de influenza in vitro.

Se demostró que las formulaciones de calcio:sodio a una razón molar de Ca^{2+}:Na^{+} de 8:1 reducían la infectividad de múltiples cepas de influenza H1N1 y una cepa de influenza H3N2 (ejemplos 1 y 2(a), datos adicionales no mostrados). Entonces se sometieron a prueba dos cepas de H3N2 adicionales y una cepa de influenza B. Además, se sometieron aprueba cuatro cepas H1N1 adicionales, incluyendo una aislada de cerdo. Se encontró que las formulaciones de calcio:sodio reducían la infectividad de todos los virus sometidos a prueba de una manera sensible a la dosis (figura 4). Se observó la mayor reducción en el título viral usando la formulación de 8X, que redujo los títulos virales entre 32 y 12.589 veces dependiendo de la cepa viral específica sometida a prueba. Por tanto, las formulaciones de calcio:sodio (razón molar de Ca^{2+}:Na^{+} a 8:1) puede reducir eficazmente la infectividad de una amplia variedad de virus influenza.

Ejemplo 3: Actividades terapéuticas *in vivo* de formulaciones de calcio:sodio en la reducción de la infectividad del virus influenza en un modelo de gripe de hurón

En este ejemplo, se sometieron a prueba las actividades terapéuticas *in vivo* de dos formulaciones líquidas con una razón molar de Ca^{2+}:Na^{+} a 8:1 (mol:mol) usando un modelo de gripe de hurón. Las formulaciones eran hipertónicas (o bien 4X o bien 8X la tonicidad de una disolución isotónica). Se demostró que los tratamientos mejoraban la evolución clínica de la infección por influenza y disminuían la respuesta inflamatoria a la infección por influenza en hurones.

Métodos:

El modelo de gripe de hurón es un modelo convencional para la evaluación de vacunas o antivirales contra la gripe. Usando este modelo, se sometieron a prueba las actividades terapéuticas de la formulación A y dos formulaciones a una razón molar de 8:1 que tenían una actividad potenciada frente a la replicación de influenza *in vitro*. En la tabla 3 se muestran las formulaciones sometidas a prueba. Se expusieron hurones control a agua de calidad para inhalación durante el mismo periodo (6,5 minutos) y en las mismas condiciones de exposición. Se generaron formulaciones en aerosol a partir de dos nebulizadores PariLC Sprint y se expusieron los hurones a formulaciones nebulizadas usando un sistema de exposición FlowPast (TSE systems). Se dosificaron los hurones 1 hora antes de la infección, 4 horas tras la infección y luego cada dos días durante 6 días hasta la terminación del estudio. Se recogieron muestras de lavado nasal una vez al día comenzando en el día 1 del estudio y se determinaron las temperaturas corporales y los pesos corporales dos veces al día comenzando en el día 0 del estudio. Se determinaron el número de células inflamatorias y el título viral en las muestras de lavado nasal.

Tabla 3: Formulaciones de calcio:sodio que se sometieron a prueba en un modelo de gripe de hurón

Formulación	Concentración de cloruro de calcio (M)	Concentración de cloruro de sodio (M)	Razón de Ca:Na	Dosis administrada (mg de $CaCl_2$/kg)*
FORMULACIÓN A	0,116	0,15	1:1,3	0,56
4X	0,424	0,053	8:1	1,99
8X	0,849	0,106	8:1	3,44

* La dosis administrada se determinó a partir de mediciones realizadas en el punto de toma de muestras del sistema de exposición sólo nasal y la concentración de calcio se determinó mediante métodos de HPLC.

Resultados:

(a) Las formulaciones de calcio:sodio previnieron la aparición y redujeron la gravedad de la fiebre.

En comparación con los hurones control, los hurones tratados 4X y 8X mostraron una aparición retrasada de la fiebre y un pico reducido de temperatura corporal, en comparación con el grupo control (figura 5). En el momento del pico de fiebre (36 horas tras la infección), los grupos de tratamiento 4X mostraron temperaturas corporales significativamente reducidas en comparación con el grupo control (aumento medio de 3,4ºC en el grupo control en comparación con 0,4ºC en el grupo 4X; $p<0,05$ y $p<0,01$, respectivamente, prueba de la U de Mann-Whitney; figura 5). El grupo de tratamiento 8X también mostró temperaturas corporales reducidas en comparación con los animales control (aumento medio de 1,45ºC). Estos datos muestran que las formulaciones de calcio:sodio reducían la gravedad y retrasaban la aparición de la fiebre tras la infección por influenza en hurones.

(b) Las formulaciones de calcio:sodio prevenían la pérdida de peso corporal.

Los hurones control perdieron peso más rápidamente y mostraron un mayor porcentaje de pérdida de peso corporal 48 horas tras la infección, en comparación con los animales tratados (figura 6). Las diferencias en la pérdida de peso

corporal entre los grupos 4X y 8X y el grupo control fueron estadísticamente significativas (4,0% de pérdida de peso en el grupo control, en comparación con el 3,1% y el 2,4% en los grupos 4X y 8X, respectivamente; figura 6). Los datos también mostraron una prevención sensible a la dosis de la pérdida de peso, ya que los animales tratados 8X perdían la menor cantidad de peso.

(c) Las formulaciones de calcio:sodio reducían los recuentos de células inflamatorias nasales.

La infección por influenza en las vías respiratorias superiores está asociada con una infiltración de células inflamatorias. Esta inflamación también es una causa principal de los síntomas clínicos asociados con la infección. Para determinar si el tratamiento con formulaciones de calcio:sodio podía reducir la inflamación tras la infección por influenza, se determinó el número de células inflamatorias en cada lavado nasal de hurones control o tratados. Los recuentos de células inflamatorias fueron significativamente inferiores en los grupos tratados en comparación con el grupo control durante el transcurso del estudio (figura 7; $p<0,0001$ ANOVA de dos vías). Los números totales de células inflamatorias recuperadas a partir de hurones tratados 4X y 8X fueron significativamente inferiores que los de los hurones control a las 72 horas tras la infección ($p<0,01$ para 4X; $p<0,001$ para el tratamiento 8X; prueba de la U de Mann-Whitney). Además, los tratamientos 4X y 8X dieron como resultado una diferencia estadísticamente significativa en los recuentos de células inflamatorias a las 120 horas tras la infección ($p<0,05$ prueba de la U de Mann-Whitney). En contraposición, la formulación A fue menos eficaz en la reducción del número de células inflamatorias a las 120 horas tras la infección (figura 7C). Los resultados muestran que a dosis superiores, puede inhibirse la inflamación durante periodos de tiempo más largos. Colectivamente, estos datos demuestran que las formulaciones de calcio:sodio reducían los síntomas clínicos y disminuían la respuesta inflamatoria asociada con la infección por influenza.

Estos datos *in vivo* demostraron que los tratamientos con formulaciones de calcio:sodio mejoran la evolución clínica de la infección por influenza y disminuyen la respuesta inflamatoria a la infección por influenza en hurones (por ejemplo, pérdida de peso corporal reducida, recuentos de células inflamatorias reducidos, etc.).

Las infecciones por influenza son infecciones comunes del aparato respiratorio que normalmente se tratan mediante fármacos/agentes antivirales específicos para influenza o se tratan profilácticamente mediante vacunas contra influenza. Los agentes antivirales son limitados porque se requiere un diagnóstico específico de gripe y el tratamiento debe comenzar poco después de la aparición de la infección o los síntomas para que sea efectivo. Además, hay varias infecciones del aparato respiratorio, denominadas colectivamente enfermedades similares a la gripe (ILI) producidas por otros virus que provocan una sintomatología similar a la infección por influenza, lo que dificulta un diagnóstico preciso. Las vacunas contra influenza sólo tienen cobertura limitada cada año, ya que se dirigen únicamente a un subconjunto de virus influenza que circulan entre la población en un año dado. Tanto para los agentes antivirales como para las vacunas, también es preocupante la aparición de virus resistentes que no responden al tratamiento.

Las formulaciones descritas en el presente documento podrían administrarse cuando aparecen por primera vez los síntomas sin un diagnóstico preciso del agente infeccioso y/o podrían administrarse profilácticamente a sujetos que corren el riesgo de exposición a infecciones del aparato respiratorio.

Ejemplo 4: Actividades de las formulaciones de calcio:sodio en la reducción de la infectividad de VPIh

En este ejemplo, se examinó la eficacia de las formulaciones de calcio:sodio 8:1 en la reducción de la infectividad del virus parainfluenza humano (VPIh). Los datos mostraron que las formulaciones de calcio:sodio 8:1 reducían la replicación viral de VPIh-3 tanto en células Calu-3 como NHBE.

El virus parainfluenza humano es un virus envuelto de ARN monocatenario, distinto de influenza. Estos virus tienen un diámetro de 150-300 nm y están cubiertos por espinas de hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y proteínas de fusión. A diferencia del virus influenza, el genoma no está segmentado y tras la unión del virus a la célula diana a través de tetrámeros de HN, se cree que el virus se fusiona directamente con la membrana plasmática (Moscona, A. (2005). “Entry of parainfluenza virus cells as a target for interrupting childhood respiratory disease.” J Clin Invest 115(7): 1688-98). VPIh-3 está asociado con enfermedad del aparato respiratorio superior e inferior y frecuentemente es una causa de enfermedad similar a la gripe (ILI).

Métodos:

Se usó un modelo de cultivo celular de infección por virus parainfluenza humano 3 (VPIh-3) para estudiar los efectos de diferentes disoluciones nebulizadas sobre la infección viral. Se cultivaron células Calu-3 sobre membranas permeables (Transwells de 12 mm; tamaño de poro de 0,4 μm, Coming Lowell, MA) hasta que se establecieron cultivos confluentes (la membrana está completamente cubierta con células) y en interfase aire-líquido (ALI) eliminando los medios apicales y cultivando a 37ºC / 5% de CO_2. Las células se cultivaron durante >2 semanas en ALI antes de cada experimento. Se sembraron células epiteliales bronquiales humanas normales (NHBE) en el pase 2 sobre membranas permeables (Millicell de 12 mm, tamaño de poro de 0,4 μm; Millipore Billerica, MA) y se incubaron (37ºC, 5% de CO_2, HR del 95%) hasta la confluencia en condiciones de cultivo cubierto por líquido. Una vez alcanzada la confluencia, se eliminaron los medios apicales y se establecieron cultivos en ALI. Se cultivaron las células durante ≥4 semanas en ALI antes de cada experimento. Antes de cada experimento, se lavó la superficie

apical de cada tipo celular 3X con PBS.

Posteriormente se expusieron las células a formulaciones nebulizadas usando una cámara de sedimentación y nebulizadores de la serie 8900. En los experimentos realizados sobre células Calu-3, se expusieron las membranas Transwell a formulaciones nebulizadas de Ca^{2+}:Na^{+} a una razón molar de 8:1 (0,5X, 2X y 8X) por triplicado. Los experimentos realizados sobre células NHBE implicaron exponer las membranas Millicell a formulaciones nebulizadas de Ca^{2+}:Na^{+} a una razón molar de 8:1 (0,5X, 2X y 8X) por duplicado. Inmediatamente tras la exposición, se sustituyeron los medios basolaterales (medios en el lado inferior de la membrana Transwell) por medio nuevo. Se expusieron los pocillos por triplicado a cada formulación en cada prueba. Se expuso una segunda placa de cultivo celular a las mismas formulaciones para cuantificar la administración de calcio o sal total a las células. Una hora tras la exposición, se infectaron las células con 10 μl de VPIh-3 (cepa C242) a una multiplicidad de infección de 0,3-0,1 (0,3-0,1 viriones por célula). Cuatro horas tras el tratamiento con aerosol, se lavaron las superficies apicales para eliminar la formulación en exceso y el virus no unido. Al día siguiente (24 horas tras la exposición a la formulación) se recogió el virus liberado sobre la superficie apical de células infectadas en medios de cultivo o PBS y se cuantificó la concentración de virus en el lavado apical mediante ensayo de $TCID_{50}$ (dosis infecciosa en el 50% del cultivo tisular).

Resultados:

Los ejemplos anteriores mostraron que la replicación del virus influenza se reducía significativamente de una manera sensible a la dosis mediante formulaciones de calcio:sodio, e identificaron una razón molar preferida de Ca^{+2}:Na^{+} a 8:1. Para examinar adicionalmente las actividades terapéuticas de las formulaciones de calcio:sodio en la reducción del título viral y para determinar la naturaleza de amplio espectro del tratamiento *in vitro*, se sometieron a prueba los efectos de las formulaciones de calcio:sodio sobre la replicación del virus parainfluenza humano 3 (VPIh-3).

Para determinar si las formulaciones de calcio:sodio podían reducir eficazmente la infección por VPIh-3, se expusieron células Calu-3 o células NHBE a las formulaciones de calcio:sodio 8:1 a diferentes tonicidades (0,5X, 2X y 8X). Se usaron células sin tratar como controles. De manera similar a los hallazgos con influenza, la infección por VPIh-3 se redujo mediante las formulaciones de calcio:sodio de una manera sensible a la dosis (figura 8). Tanto en células Calu-3 como en NHBE, el tratamiento con la formulación de Ca^{2+}:Na^{+} 8X dio como resultado la mayor disminución en el título en comparación con el control sin tratar ($p<0,001$, en comparación con el control sin tratar respectivo; ANOVA de una vía con prueba posterior de comparaciones múltiples de Tukey), sin embargo, los tres tratamientos tuvieron un efecto significativo sobre la infección. La formulación 0,5X redujo la infección por VPIh-3 en 15,8 y 79,4 veces en células Calu-3 y NHBE, respectivamente, y la formulación 2X redujo la infección por VPIh-3 en 631 y 5011 veces, respectivamente.

Estos datos amplían los hallazgos realizados con influenza, y demuestran que las formulaciones de calcio:sodio son ampliamente eficaces en la reducción de infecciones virales producidas por virus no relacionados.

Ejemplo 5: Actividades de formulaciones de calcio:sodio en la reducción de la infectividad de rinovirus

Los ejemplos anteriores mostraron que la replicación del virus influenza y el virus parainfluenza (VPIh) se reducía significativamente de una manera sensible a la dosis mediante formulaciones de calcio:sodio, e identificaron una razón molar preferida de Ca^{+2}:Na^{+} a 8:1. Para examinar adicionalmente las actividades terapéuticas de formulaciones de calcio:sodio en la reducción del título viral y para determinar la naturaleza de amplio espectro del tratamiento *in vitro*, se examinó la eficacia de formulaciones de calcio:sodio 8:1 en la reducción de la infectividad de rinovirus humano. Los datos mostraron que las formulaciones de calcio:sodio 8:1 reducían la replicación de rinovirus en células Calu-3.

Se expusieron células Calu-3 a formulación de calcio:sodio 8X (razón molar de Ca^{2+}:Na^{+} de 8:1). Se usaron células sin tratar como controles. El tratamiento de las células con la formulación 8X redujo la infección por rinovirus en 1,5 Log_{10} $TCID_{50}$/ml, en comparación con el control sin tratar (figura 9; $p<0,01$ en comparación con el control sin tratar; prueba de la t).

Estos datos amplían los hallazgos realizados con influenza y parainfluenza, y demuestran que las formulaciones de calcio:sodio también son eficaces en la reducción de infecciones virales producidas por virus no envueltos tales como rinovirus. Junto con los datos obtenidos con formulaciones de calcio:sodio en modelos de influenza y parainfluenza, este resultado demuestra que las formulaciones de calcio:sodio son ampliamente eficaces en la reducción de la infectividad de múltiples virus respiratorios no relacionados.

Ejemplo 6: Actividades terapéuticas de las formulaciones de calcio:sodio en el tratamiento de infecciones bacterianas

En este ejemplo, se examinaron las actividades terapéuticas de las formulaciones de calcio:sodio en el tratamiento de infecciones bacterianas usando un modelo de ratón. Los datos mostraron que las formulaciones de calcio:sodio eran eficaces en el tratamiento de la infección por *Streptococcus pneumoniae* en el modelo de ratón.

Métodos:

Se prepararon bacterias haciendo crecer cultivos sobre placas de agar sangre de tripticasa y soja (TSA) durante la noche a 37ºC más 5% de CO_2. Se resuspendieron colonias individuales a una DO_{600} ~ 0,3 en PBS estéril y posteriormente se diluyeron 1:4 en PBS estéril (~$2x10^7$ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml). Se infectaron ratones con 50 μl de suspensión bacteriana (~$1x10^6$ UFC) mediante instilación intratraqueal mientras se mantenían anestesiados.

Se expusieron ratones C57BL6 a formulaciones líquidas aerosolizadas en un sistema de exposición de cuerpo completo usando nebulizadores Pari LC Sprint conectados a una jaula con cámaras en forma de cuña que contenía individualmente hasta 11 animales. Se realizaron los tratamientos 2 horas antes de la infección con *Streptococcus pneumoniae* serotipo 3. A menos que se indique lo contrario, los tiempos de exposición fueron de 3 minutos de duración. Veinticuatro horas tras la infección, se sacrificaron los ratones mediante inyección con pentobarbital y se recogieron los pulmones y se homogeneizaron en PBS estéril. Se diluyeron en serie muestras de homogeneizado de pulmón en PBS estéril y se sembraron en placas de agar sangre TSA. Al día siguiente se enumeraron las UFC.

Resultados:

(a) Las formulaciones de calcio:sodio (Ca^{2+}:Na^+ a una razón molar de 8:1) reducían la carga bacteriana de una manera sensible a la dosis.

Se evaluaron las actividades terapéuticas de las formulaciones de calcio:sodio en el mismo modelo y a lo largo de un amplio intervalo de dosis. Manteniendo constante el tiempo de dosificación mediante nebulización, se administraron diferentes dosis usando formulaciones que consistían en diferentes concentraciones de Ca^{2+}:Na^+ y por tanto diferentes tonicidades. Las formulaciones de Ca^{2+}:Na^+ 8:1 reducían la carga bacteriana de una manera sensible a la dosis, observándose la mayor reducción a dosis inferiores de calcio (aproximadamente una reducción de 4 veces a una dosis de 0,32 mg de Ca^{2+}/kg y una tonicidad de 0,5X, y aproximadamente una reducción de 5 veces a una dosis de 0,72 mg de Ca^{2+}/kg y una tonicidad de 1,0X) (figura 10). Resulta interesante que estas reducciones eran comparables a la reducción observada para la formulación A, sin embargo a dosis significativamente inferiores. La formulación de tonicidad 2X, que es equivalente en tonicidad a la formulación A, tenía un efecto relativamente moderado sobre la reducción de los títulos bacterianos (reducción de ~1,6 veces) cuando se administraba a una dosis de 1,58 mg de Ca^{2+}/kg.

(b) El aumento de la dosis a través de nebulizaciones más largas no afectó significativamente a las actividades terapéuticas de las formulaciones de calcio:sodio.

La figura 10 muestra que las formulaciones de calcio:sodio a una razón molar de 8:1 de calcio con respecto a sodio reducían la gravedad de las infecciones bacterianas a dosis inferiores a 1,58 mg de Ca^{2+}/kg. Específicamente, aunque todas las formulaciones sometidas a prueba eran eficaces, la formulación 1X (~0,72 mg de Ca^{2+}/kg) mostró la mayor actividad terapéutica. El estudio cuyos resultados se presentan en la figura 10 sometió a prueba un tiempo de dosis de 3 minutos. Para examinar adicionalmente el efecto de la dosificación, se sometió a prueba un intervalo de dosis de Ca^{2+} aumentando la duración de la dosificación. Se trataron animales con una formulación de Ca^{2+}:Na^+ (tonicidad 1X = isotónica; razón molar de 8:1) durante diferentes cantidades de tiempo (de 1,5 minutos a 12 minutes). Estos tiempos de dosis dieron como resultado dosificaciones de Ca^{2+} de aproximadamente 0,36, 0,72, 1,44 y 2,88 mg de Ca^{2+}/kg durante los tiempos de dosificación de 1,5, 3, 6 y 12 minutos, respectivamente. Tal como se muestra en la figura 11, en el tiempo de dosificación más corto, no se observó disminución en el título bacteriano en comparación con los animales control (que se dosificaron 3 minutos con solución salina), mientras que las dosis de 3, 6 y 12 minutos redujeron cada una los títulos bacterianos hasta niveles estadísticamente significativos.

<u>Ejemplo 7: Actividades terapéuticas *in vivo* de formulaciones de calcio:sodio en la reducción de la infectividad del virus influenza en un modelo de gripe de ratón</u>

En este ejemplo, se sometieron a prueba las actividades terapéuticas *in vivo* de cuatro formulaciones líquidas con una razón molar de Ca^{2+}:Na^+ a 8:1 (mol:mol) usando un modelo de gripe de ratón. Las formulaciones eran isotónicas o hipertónicas (1X, 2X, 4X o 8X la tonicidad de una disolución isotónica). Se demostró que los tratamientos mejoraban la evolución clínica de la infección por influenza en ratones.

Métodos:

Se trataron ratones (Balb/c) con las formulaciones indicadas comenzando 3 horas antes de la infección, 3 horas tras la infección y luego cada dos días durante hasta 11 días. Para las infecciones por influenza, se anestesiaron ligeramente los ratones con ketamina/xilazina y se administró una dosis letal del virus (Influenza A/PR/8) por vía intranasal. El criterio de valoración primario del estudio fue la supervivencia de los animales durante hasta 21 días tras la infección. Se monitorizaron las temperaturas corporales y los pesos corporales de los animales durante todo el estudio. Se sacrificaron los animales con temperaturas corporales inferiores a 95ºF.

Resultados:

Los ejemplos 3 y 6 demuestran que las formulaciones de calcio:sodio descritas en el presente documento eran eficaces en el tratamiento de la neumonía bacteriana en un modelo de ratón y de la gripe en un modelo de hurón. En

el modelo bacteriano, se encontró que la formulación 1X y dosis inferiores a 1,5 mg de Ca^{2+}/kg eran las más eficaces. En el modelo de gripe de hurón, dosis superiores eran más eficaces en la mejora de la evolución de la infección. En este caso, se sometieron a prueba los intervalos de dosificación de las formulaciones 1X, 2X, 4X o 8X, cada una a una razón molar de Ca^{2+}:Na^{+} de 8:1, en un modelo de gripe de ratón.

Para estudiar los efectos de las formulaciones de calcio:sodio sobre la infección por influenza, se realizaron estudios de supervivencia. Se administró a los ratones una dosis letal de virus influenza y se trataron con las formulaciones de calcio:sodio a diferentes tonicidades. El tiempo de dosis para cada formulación fue constante, dando como resultado dosis aumentadas de calcio a medida que se aumentaba la tonicidad de la formulación. Se usaron como controles animales tratados con solución salina. La figura 12 muestra los datos de supervivencia para cada grupo a lo largo del tiempo. En este estudio, el 75% de los animales control murieron antes del final del estudio en el día 21. Por el contrario, murieron el 50% de los animales tratados 4X y el 42,9% de los tratados 8X, lo que demuestra que el tratamiento con formulaciones 4X y 8X mejoraba la tasa de supervivencia de los animales.

REIVINDICACIONES

1. Formulación farmacéutica que comprende una sal de calcio y una sal de sodio, en la que la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de desde 4:1 (mol:mol) hasta 16:1 (mol:mol).

2. Formulación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de desde 4:1 (mol:mol) hasta 12:1 (mol:mol), de 4:1 (mol:mol) a 10:1 (mol:mol) o de 4:1 (mol:mol) a 8:1 (mol:mol).

3. Formulación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{-} es de desde 4:1 (mol:mol) hasta 7:1 (mol:mol) o de 4:1 (mol:mol) a 6:1 (mol:mol).

4. Formulación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de 4:1 (mol:mol), o 4,5:1 (mol:mol), o 5:1 (mol:mol), o 5,5:1 (mol:mol), o 6:1 (mol:mol).

5. Formulación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de 7:1 (mol:mol), 8:1 (mol:mol), 9:1(mol:mol); 10:1 (mol:mol), 11:1 (mol:mol), o 12:1 (mol:mol).

6. Formulación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la razón de Ca^{+2} con respecto a Na^{+} es de 13:1 (mol:mol), 14:1 (mol:mol), 15:1 (mol:mol), o 16:1 (mol:mol).

7. Formulación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, siendo la formulación farmacéutica una formulación líquida, opcionalmente, en la que el ión Ca^{2+} está presente en una concentración de desde 0,115 M hasta 1,15 M, o en la que el ión Ca^{2+} está presente en una concentración de desde 0,575 M hasta 1,15 M.

8. Formulación farmacéutica según la reivindicación 7, en la que el ión Na^{+} está presente en una concentración de desde 0,053 M hasta 0,3 M, o en la que el ión Na^{+} está presente en una concentración de desde 0,075 M hasta 0,3 M.

9. Formulación farmacéutica según la reivindicación 7 u 8, en la que la sal de calcio se selecciona del grupo que consiste en cloruro de calcio, carbonato de calcio, acetato de calcio, fosfato de calcio, alginato de calcio; estearato de calcio, sorbato de calcio, sulfato de calcio, gluconato de calcio, lactato de calcio y citrato de calcio, opcionalmente en la que la sal de calcio es lactato de calcio, citrato de calcio o sulfato de calcio, o en la que la sal de calcio es cloruro de calcio o lactato de calcio.

10. Formulación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en la que la sal de sodio se selecciona del grupo que consiste en cloruro de sodio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, sulfato de sodio, estearato de sodio, ascorbato de sodio, benzoato de sodio, bifosfato de sodio, fosfato de sodio, bisulfito de sodio, citrato de sodio, borato de sodio, gluconato de sodio, metasilicato de sodio y lactato de sodio, opcionalmente, en la que la sal de sodio es cloruro de sodio, o en la que la sal de sodio es lactato de sodio, citrato de sodio o sulfato de sodio.

11. Formulación farmacéutica según la reivindicación 1-6, en la que la formulación farmacéutica es una formulación de polvo seco.

12. Formulación farmacéutica según la reivindicación 11, en la que la sal de calcio está presente en una cantidad de desde el 19,5% hasta el 90% (p/p).

13. Formulación farmacéutica según la reivindicación 11 ó 12, en la que la sal de calcio se selecciona del grupo que consiste en cloruro de calcio, carbonato de calcio, acetato de calcio, fosfato de calcio, alginato de calcio, estearato de calcio, sorbato de calcio, sulfato de calcio, gluconato de calcio, lactato de calcio y citrato de calcio, opcionalmente, en la que la sal de calcio es lactato de calcio, citrato de calcio, sulfato de calcio o cloruro de calcio.

14. Formulación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en la que la sal de sodio se selecciona del grupo que consiste en cloruro de sodio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, sulfato de sodio, estearato de sodio, ascorbato de sodio, benzoato de sodio, bifosfato de sodio, fosfato de sodio, bisulfito de sodio, citrato de sodio, borato de sodio, gluconato de sodio, metasilicato de sodio y lactato de sodio, opcionalmente, en la que la sal de sodio es cloruro de sodio, o en la que la sal de sodio es lactato de sodio, citrato de sodio o sulfato de sodio.

15. Formulación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, formulándose la formulación farmacéutica para administrar una dosis de Ca^{+2} de 0,001 mg/kg de peso corporal/dosis a 10 mg/kg de peso corporal/dosis al aparato respiratorio, y/o que comprende además un excipiente, opcionalmente en la que el excipiente se selecciona del grupo que consiste en lactosa, glicina, alanina, leucina, isoleucina, trehalosa, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), difosfatidilglicerol (DPPG), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (DPPS), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC), polioxietilen-9-lauril éter, trioleato de sorbitano (Span 85), glicocolato, surfactina, tiloxapol, fosfato de sodio, dextrano, dextrina, manitol, maltodextrina, albúmina sérica humana, albúmina sérica humana recombinante y polímeros biodegradables, opcionalmente en la que el excipiente es leucina, maltodextrina o manitol.

16. Formulación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, siendo la formulación farmacéutica una formulación de dosis unitaria.

17. Cantidad eficaz de la formulación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, para su uso en el tratamiento de una infección del aparato respiratorio en un individuo que tiene una infección del aparato respiratorio, que presenta síntomas de una infección del aparato respiratorio, o que corre el riesgo de contraer una infección del aparato respiratorio.

18. Cantidad eficaz de la formulación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, para su uso en la reducción de la propagación de una infección del aparato respiratorio en un individuo que tiene una infección del aparato respiratorio, que presenta síntomas de una infección del aparato respiratorio o que corre el riesgo de contraer una infección del aparato respiratorio.

19. Formulación farmacéutica según la reivindicación 17 ó 18, en la que la infección del aparato respiratorio es gripe, opcionalmente (i) en la que la gripe está provocada por el virus influenza A o el virus influenza B, o (ii) en la que la infección del aparato respiratorio está provocada por un virus parainfluenza humano, opcionalmente en la que el virus parainfluenza humano es virus parainfluenza humano 3 (VPIh-3), o (iii) en la que la infección del aparato respiratorio está provocada por un rinovirus, o (iv) en la que la infección del aparato respiratorio está provocada por un virus respiratorio sincitial (VRS), o (v) en la que la infección del aparato respiratorio es neumonía, opcionalmente en la que la neumonía es neumonía bacteriana, opcionalmente en la que la neumonía bacteriana está provocada por *S. pneumoniae*, o (vi) en la que la infección del aparato respiratorio es una infección bacteriana, opcionalmente, en la que la infección bacteriana está provocada por una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bordatella pertussis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, una bacteria de la familia Citrobacter, una bacteria de la familia Ecinetobacter y *Mycobacterium tuberculosis*.

20. Cantidad eficaz de la formulación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, para su uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar en un individuo que tiene una enfermedad pulmonar, que presenta síntomas de una enfermedad pulmonar, o propenso a una enfermedad pulmonar.

21. Cantidad eficaz de la formulación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, para su uso en el tratamiento de un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar en un individuo que tiene un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar, que presenta síntomas de un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar, o propenso a un agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar.

22. Formulación farmacéutica según las reivindicaciones 20 ó 21, en la que la enfermedad pulmonar es asma, hiperreactividad de las vías respiratorias, rinitis alérgica, alergia alérgica estacional, bronquiectasia, bronquitis crónica, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o fibrosis quística.

23. Formulación farmacéutica según la reivindicación 21, en la que el agravamiento agudo de una enfermedad pulmonar crónica está provocado por una infección viral, una infección bacteriana, una infección fúngica, una infección parasitaria, un alérgeno medioambiental o un irritante medioambiental.

24. Formulación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, que comprende además un agente terapéutico adicional.

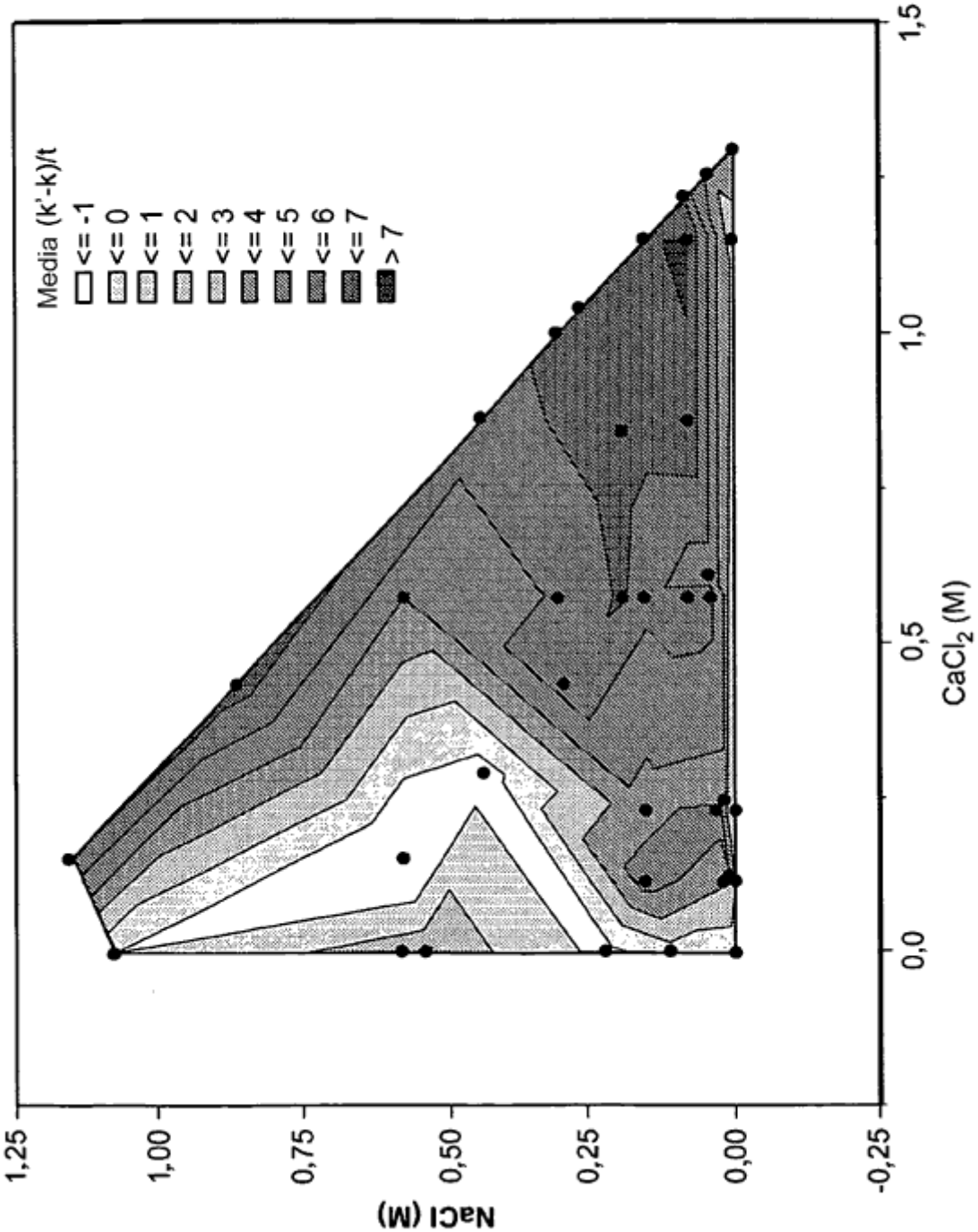
Media (k'-k)/t
<= -1
<= 0
<= 1
<= 2
<= 3
<= 4
<= 5
<= 6
<= 7
> 7
NaCl (M)
1,25
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
-0,25
0,0
0,5
1,0
1,5
CaCl2 (M)

FIG. 1

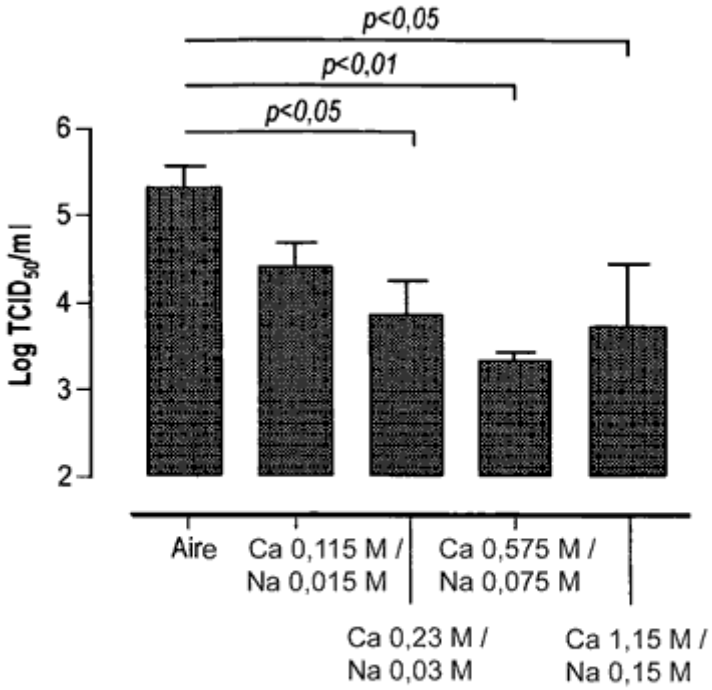
p<0,05
p<0,01
p<0,05
Log TCID50/ml
6
5
4
3
2
Aire
Ca 0,115 M /
Na 0,015 M
Ca 0,575 M /
Na 0,075 M
Ca 0,23 M /
Na 0,03 M
Ca 1,15 M /
Na 0,15 M

FIG. 2A

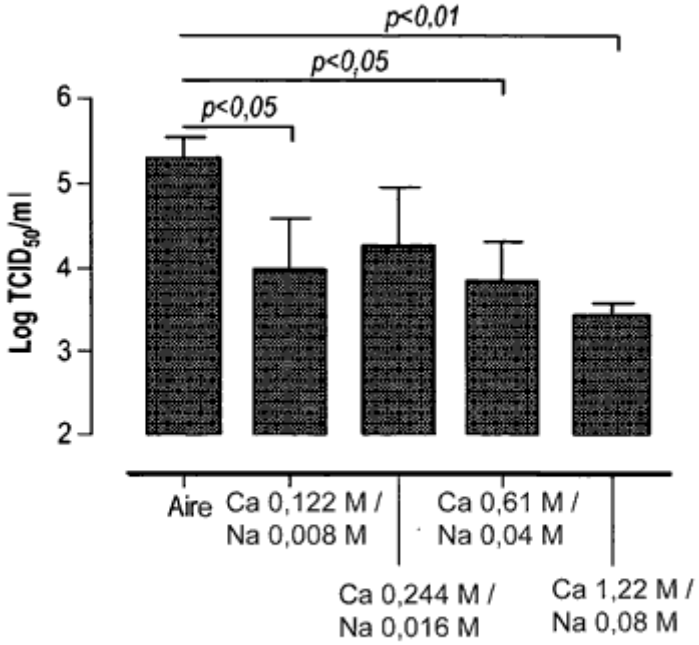
p<0,01
p<0,05
p<0,05
Log TCID50/ml
6
5
4
3
2
Aire
Ca 0,122 M /
Na 0,008 M
Ca 0,61 M /
Na 0,04 M
Ca 0,244 M /
Na 0,016 M
Ca 1,22 M /
Na 0,08 M

FIG. 2B

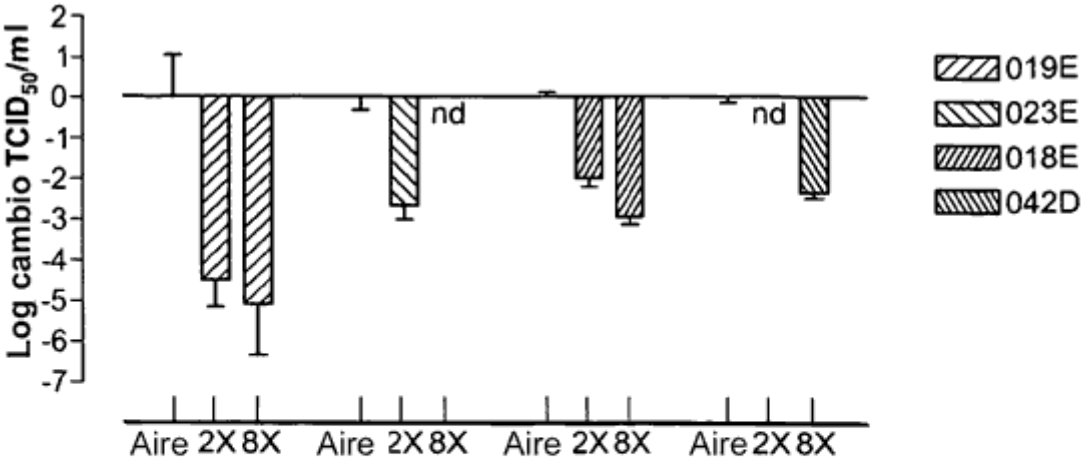
Log cambio TCID50/ml
2
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
-6
-7
nd
nd
Aire 2X 8X
Aire 2X 8X
Aire 2X 8X
Aire 2X 8X
019E
023E
018E
042D

FIG. 3

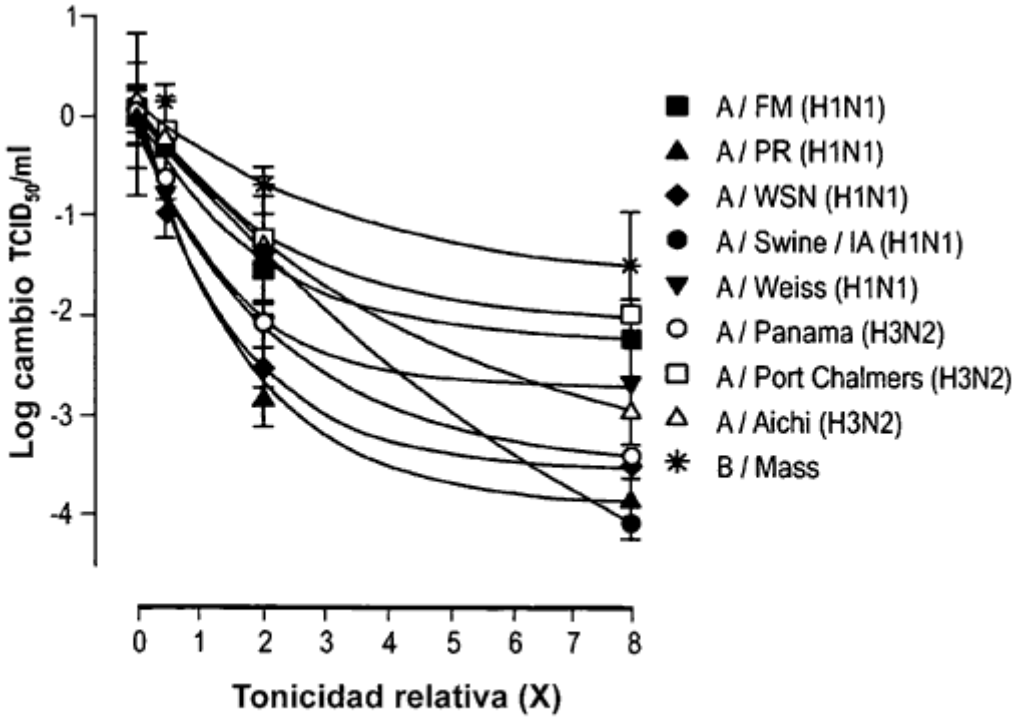
Log cambio TCID50/ml
1
0
-1
-2
-3
-4
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Tonicidad relativa (X)
A / FM (H1N1)
A / PR (H1N1)
A / WSN (H1N1)
A / Swine / IA (H1N1)
A / Weiss (H1N1)
A / Panama (H3N2)
A / Port Chalmers (H3N2)
A / Aichi (H3N2)
B / Mass

FIG. 4

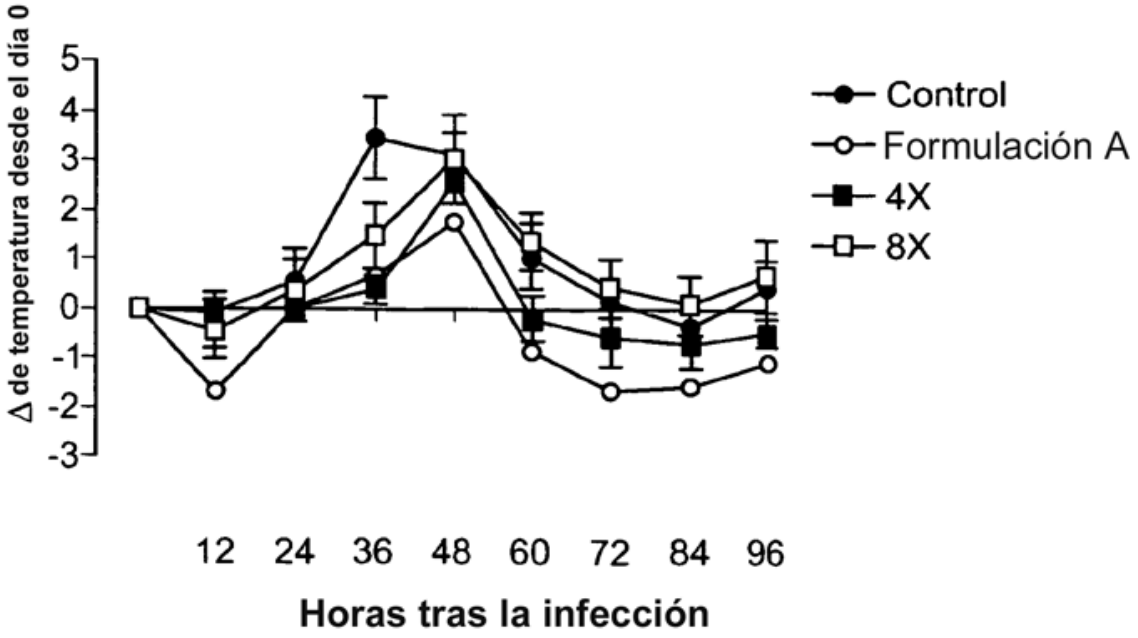
Δ de temperatura desde el día 0
5
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
Control
Formulación A
4X
8X
12
24
36
48
60
72
84
96
Horas tras la infección

FIG. 5A

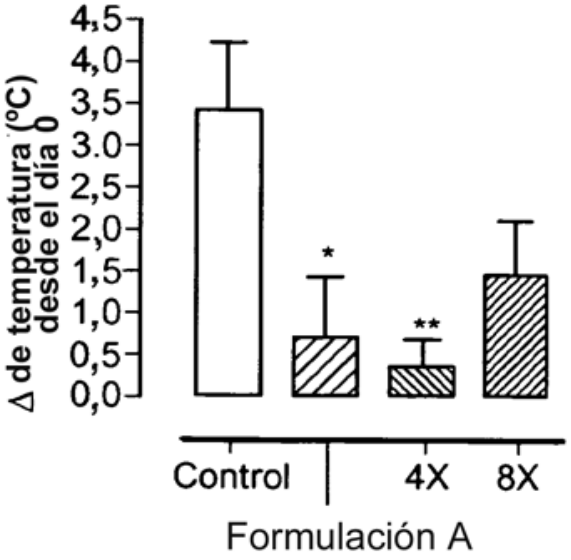
Δ de temperatura (°C) desde el día 0
4,5
4,0
3,5
3.0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
*
**
Control
4X
8X
Formulación A

FIG. 5B

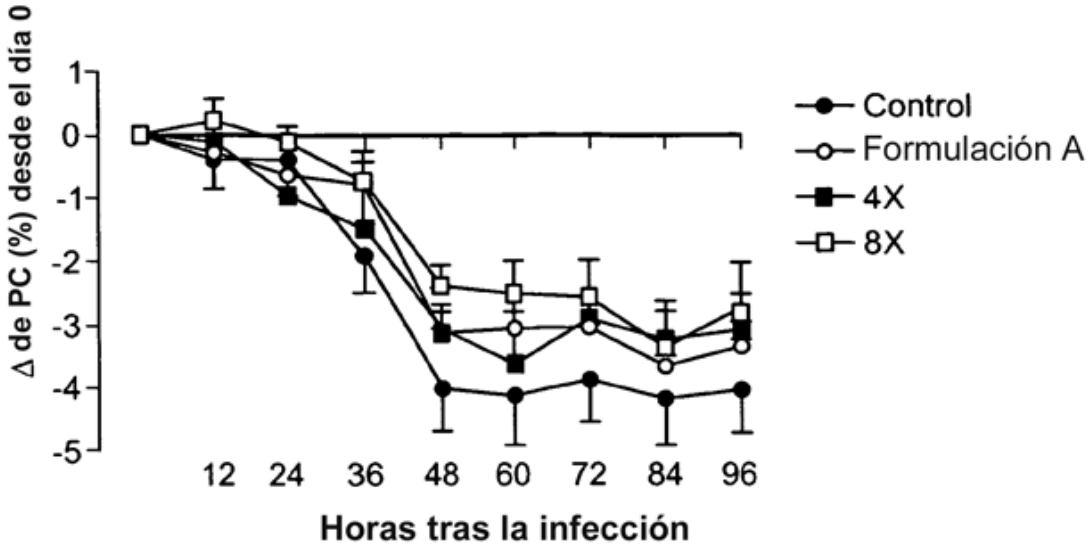
Δ de PC (%) desde el día 0
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
12
24
36
48
60
72
84
96
Horas tras la infección
Control
Formulación A
4X
8X

FIG. 6A

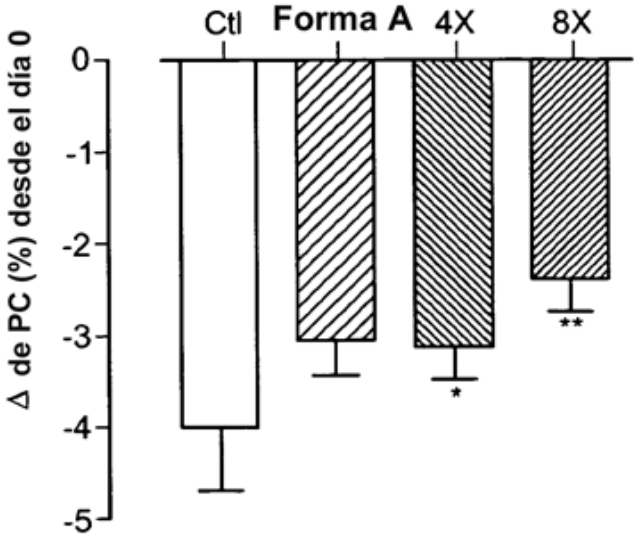
Ctl
Forma A
4X
8X
Δ de PC (%) desde el día 0
0
-1
-2
-3
-4
-5
*
**

FIG. 6B

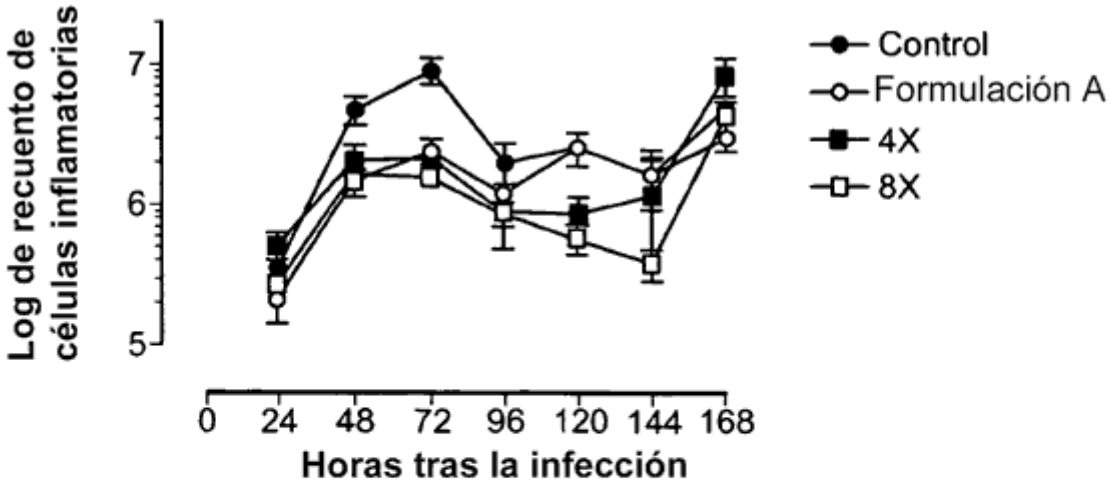

FIG. 7A

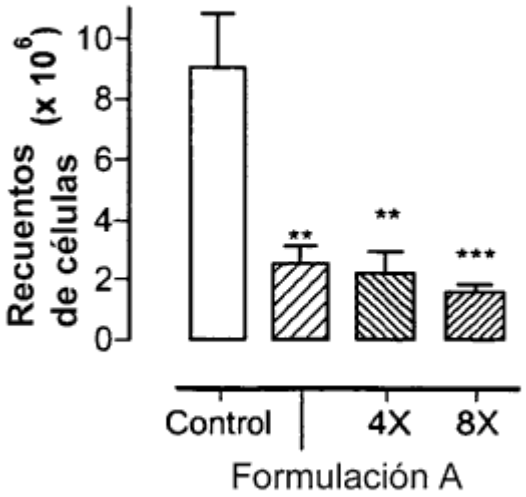

FIG. 7B

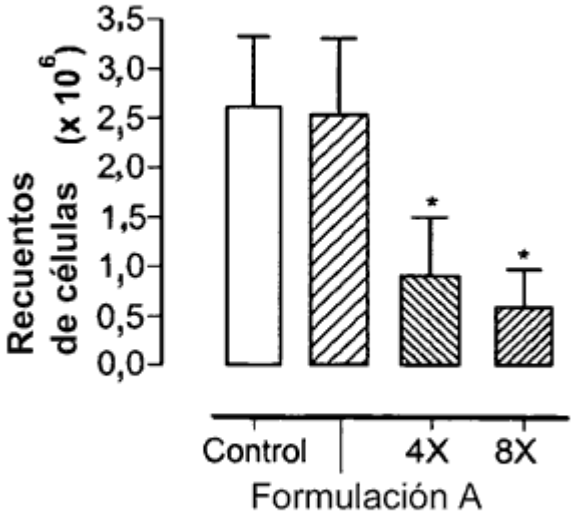

FIG. 7C

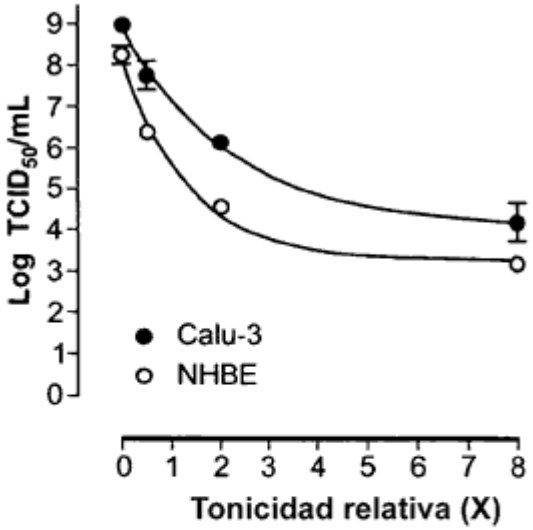

FIG. 8

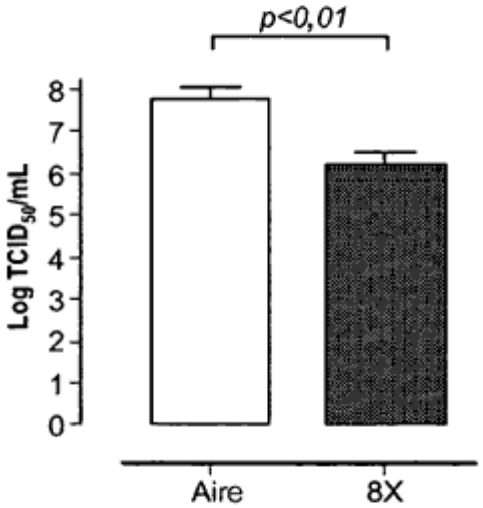

FIG. 9

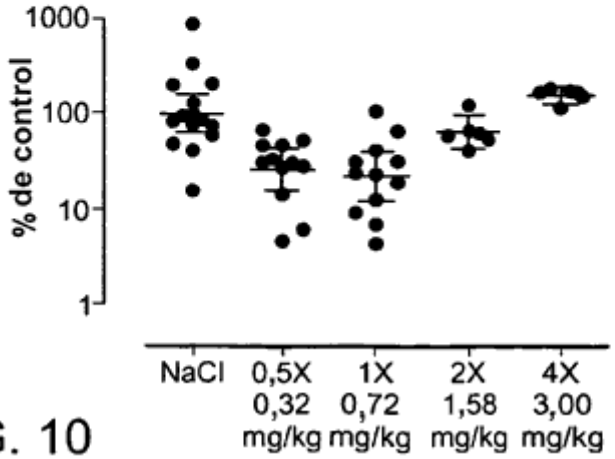

FIG. 10

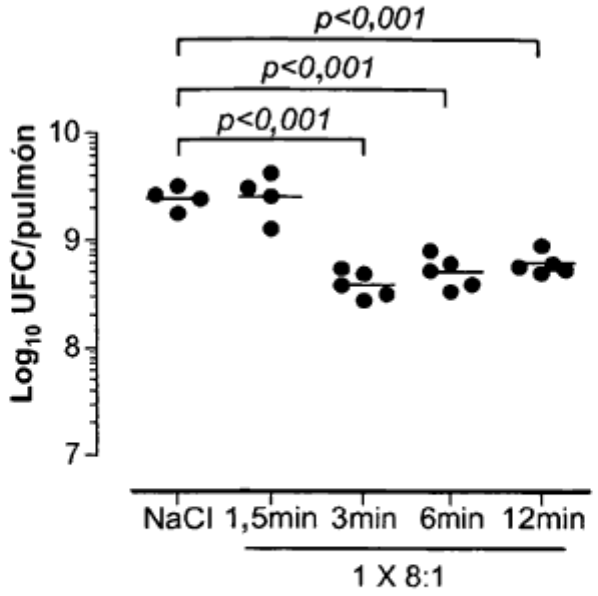
p<0,001
p<0,001
p<0,001
Log10 UFC/pulmón
10
9
8
7
NaCl
1,5min
3min
6min
12min
1 X 8:1

FIG. 11

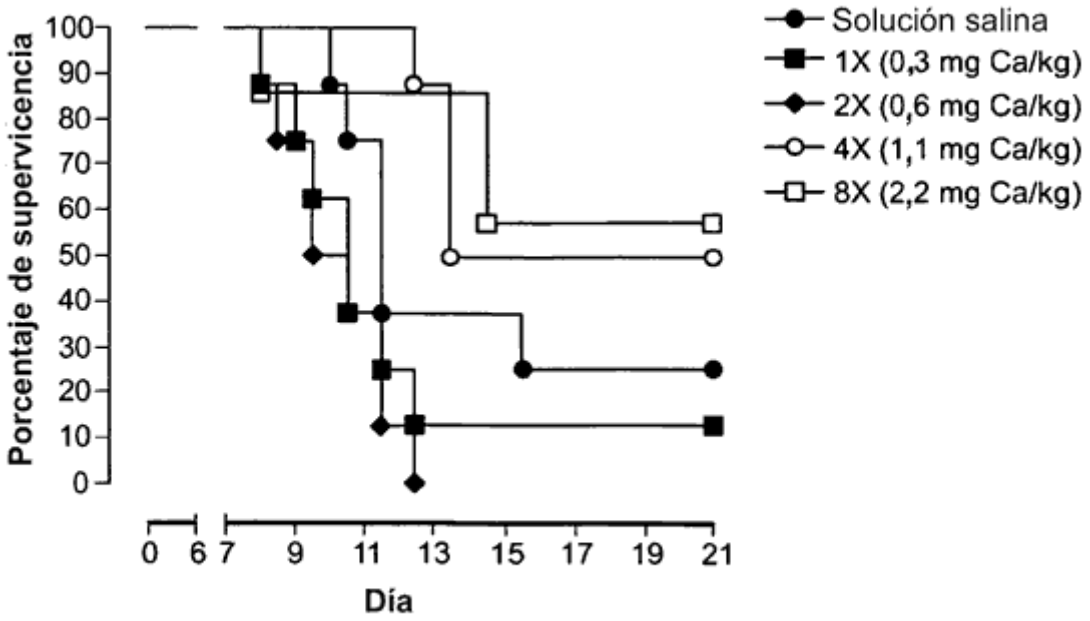
Porcentaje de supervicencia
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
6
7
9
11
13
15
17
19
21
Día
Solución salina
1X (0,3 mg Ca/kg)
2X (0,6 mg Ca/kg)
4X (1,1 mg Ca/kg)
8X (2,2 mg Ca/kg)

FIG. 12