



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1429731 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 9/14 (2006.01) **A61K 38/28** (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2002.09.19	(73) Titular(es): ELAN PHARMA INTERNATIONAL LIMITED WIL HOUSE, SHANNON BUSINESS PARK SHANNON, CLARE COUNTY	IE
(30) Prioridade(s): 2001.09.19 US 323459		
(43) Data de publicação do pedido: 2004.06.23	(72) Inventor(es): SIMON L. MCGURK ELAINE MERISKO-LIVERSIDGE DANIEL O'MAHONEY AMY WEIDERHOLD ARAZ RAOOF	US US IE US BE
(45) Data e BPI da concessão: 2007.01.03 004/2007	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **FORMULAÇÕES DE INSULINA NANOPARTICULADA**

(57) Resumo:

RESUMO

"FORMULAÇÕES DE INSULINA NANOPARTICULADA"

São descritas composições de insulina nanoparticulada tendo um tamanho de partícula médio inferior a 5 micrones. As composições exibem retenção da bioactividade de insulina e maior consistência da biodisponibilidade em comparação com anteriores composições de insulina de tamanho macro. Também são descritos métodos de fabricar composições de insulina nanoparticulada, formas de doseamento que as contenham e o uso de formulações desse tipo na terapia de insulina.

DESCRIÇÃO

"FORMULAÇÕES DE INSULINA NANOPARTICULADA"

Domínio da Invenção

A presente invenção visa composições nanoparticuladas compreendendo insulina, tendo pelo menos um estabilizador de superfície adsorvido à superfície das partículas de insulina.

Antecedentes da Invenção

A. Antecedentes Relativos a Composições Nanoparticuladas

As composições nanoparticuladas, descritas em primeiro lugar na Patente U.S. No. 5.145.684 ("a patente '684"), são partículas consistindo num agente activo pouco solúvel tendo adsorvido à sua superfície um estabilizador de superfície que não seja de ligação cruzada. A patente '684 também descreve métodos de fabricar essas composições nanoparticuladas. As composições nanoparticuladas são desejáveis porque, com a diminuição do tamanho de partícula e o conseqüente aumento da área superficial, uma composição é rapidamente dissolvida e absorvida a seguir à administração. A patente '684 não explica nem sugere composições nanoparticuladas compreendendo péptidos ou insulina.

Métodos de fabricar composições nanoparticuladas estão descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. No. 5.518.187 e 5.862.999, ambas para "Método de Triturar Substâncias Farmacêuticas"; a Patente U.S. No. 5.718.388, para "Método Contínuo de Triturar Substâncias Farmacêuticas"; e a Patente U.S. No. 5.510.118 para "Processo de Preparar Composições Terapêuticas Contendo Nanopartículas".

Composições nanoparticuladas estão também descritas, por exemplo, na Patente U.S. No. 5.298.262 para "Uso de Modificadores de Ponto de Nuvem Iônica para Evitar a Agregação de Partículas Durante a Esterilização"; 5.302.401 para "Método de Reduzir o Aumento do Tamanho de Partículas Durante a Liofilização"; 5.318.767 para "Composições para Contraste aos Raios X Úteis em Imagiologia Medicinal"; 5.326.552 para "Nova Formulação para Agentes Nanoparticulados para o Contraste de Colheitas de Sangue aos Raios X Usando Surfactantes Não Iônicos de Elevado Peso Molecular"; 5.328.404 para "Método de Imagiologia por Raios X Usando Propanodiodatos Aromáticos Iodados"; 5.336.507 para "Uso de Fosfolípidos Carregados para Reduzir a Agregação de Nanopartículas"; 5.340.564 para "Formulações Compreendendo Olinea 10-G para Evitar a Agregação de Partículas e Aumentar a Estabilidade"; 5.346.702 para "Uso de Modificadores de Ponto de Nuvem não Iônicos para Minimizar a Agregação Nanoparticulada Durante a Esterilização"; 5.349.957 para "Preparação e Propriedades Magnéticas de Partículas de Dextrano Magnético Muito Pequenas"; 5.352.459 para "Uso de

Modificadores de Superfície Purificados para Evitar a Agregação Particulada Durante a Esterilização"; 5.399.363 e 5.494.683, ambas para "Nanopartículas Anti-cancerígenas Modificadas à Superfície"; 5.401.492 para "Partículas de Manganês Não Magnéticas Insolúveis em Água como Agentes Potenciadores de Ressonância Magnética"; 5.429.824 para "Uso de Tiloxapol como um Estabilizador Nanoparticulada"; 5.447.710 para "Método para Fabricar Agentes Nanoparticulados para o Contraste aos Raios X de Colheitas de Sangue Usando Surfactantes Não Iônicos de Elevado Peso Molecular"; 5.451.393 para "Composições para o Contraste aos Raios X Úteis em Imagiologia Medicinal"; 5.466.440 para "Formulações de Agentes de Contraste para Diagnóstico Gastrointestinal Oral em Combinação com Argilas Farmaceuticamente Aceitáveis"; 5.470.583 para "Método de Preparar Composições Nanoparticuladas Contendo Fosfolípidos Carregados para Reduzir a Agregação"; 5.472.653 para "Anidridos Carbâmicos Mistos Nanoparticuladas de Diagnóstico como Agentes de Contraste aos Raios X para Imagiologia de Colheitas de Sangue e Sistema Linfático"; 5.500.204, para "Dímeros Nanoparticulados de Diagnóstico como Agentes de Contraste aos Raios X para Imagiologia de Colheitas de Sangue e Sistema Linfático"; 5.518.738 para "Formulações Nanoparticuladas NSAID"; 5.521.218 para "Derivados Nanoparticulados de Iododipamida para Uso como Agentes de Contraste aos Raios X"; 5.525.328 para "Agentes Nanoparticulados de Contraste aos Raios X no Diagnóstico de Éster Diatrizoxi para Imagiologia de Colheitas de Sangue e Sistema Linfático"; 5.543.133 para "Processo de Preparar

Composições para Contraste aos Raios X Contendo Nanopartículas"; 5.552.160 para "Nanopartículas *NSAID* Modificadas à Superfície"; 5.560.931 para "Formulações de Compostos como Dispersões Nanoparticuladas em Óleos ou Ácidos Gordos Digeríveis"; 5.565.188 para "Copolímeros em Bloco de Polialquileno como Modificadores de Superfície para Nanopartículas": 5.571.536 para "Formulações de Compostos como Dispersões Nanoparticuladas em Óleos ou Ácidos Gordos Digeríveis"; 5.573.749 para "Anidridos Carboxílicos Mistos Nanoparticulados de Diagnóstico como Agentes de Contraste aos Raios X para Imagiologia de Colheitas de Sangue e Sistema Linfático"; 5.573.750 para "Agentes de Contraste aos Raios X no Diagnóstico por Imagiologia"; 5.573.783 para "Matrizes de Película Nanoparticulada Redispersível com Revestimentos Protectores"; 5.580.579 para "Adesão a um Ponto Específico no Tracto GI Usando Nanopartículas Estabilizadas por Polímeros Lineares de Poli(Óxido de Etileno) de Elevado Peso Molecular"; 5.585.108 para "Formulações de Agentes Terapêuticos Gastrointestinais Orais em Combinação com Argilas Farmaceuticamente Aceitáveis"; 5.587.143 para "Surfactantes de Copolímeros em Bloco de Óxido de Butileno-Óxido de Etileno) como Revestimentos Estabilizadores para Composições Nanoparticuladas"; 5.591.456 para "Naproxeno Moído com Hidroxipropilcelulose como Estabilizador de Dispersão"; 5.593.657 para "Novas Formulações de Sal de Bário Estabilizadas por Estabilizadores não iónicos e Aniónicos"; 5.622.938 para "Surfactante à Base de Açúcar para Nanocristais"; 5.628.981 para "Formulações Melhoradas de Agentes de Contraste aos Raios X no Diagnóstico Gas-

trintestinal Oral e Agentes Terapêuticos Gastrintestinais"; 5.643.552 para "Anidridos Carbônicos Mistos Nanoparticulados de Diagnóstico como Agentes de Contraste aos Raios X para Imagiologia de Colheitas de Sangue e Sistema Linfático"; 5.718.388 para "Método Contínuo de Triturar Substâncias Farmacêuticas"; 5.718.919 para "Nanopartículas Contendo o Enantiômero R(-) de Ibuprofeno"; 5.747.001 para "Aerossóis Contendo Dispersões de Nanopartículas de Beclometasona"; 5.834.025 para "Redução de Reações Fisiológicas Adversas Induzidas por Formulação Nanoparticulada Administrada Intravenosamente"; 6.045.829 e WO 99/02665 "Formulações Nanocristalinas de Inibidores da Protease do Vírus de Imuno-deficiência Humana (HIV) Usando Estabilizadores de Superfície Celulósicos"; 6.068.858 para "Métodos de Fabricar Formulações Nanocristalinas de Inibidores da Protease do Vírus de Imunodeficiência Humana (HIV) Usando Estabilizadores de Superfície Celulósicos"; 6.153.225 para "Formulações Injectáveis de Naproxeno Nanoparticulada"; 6.165.506 para "Nova Forma de Toma Sólida de Naproxeno Nanoparticulada"; 6.221.400 para "Métodos de Tratar Mamíferos Usando Formulações Nanocristalinas de Inibidores da Protease do Vírus de Imunodeficiência Humana (HIV)"; 6.264.922 para "Aerossóis Nebulizados Contendo Dispersões de Nanopartículas"; 6.267.989 para "Métodos de Evitar o Crescimento de Cristais e a Agregação de Partículas em Composições de Nanopartículas"; 6.270.806 para "Uso de Lípidos Derivados de PEG como Estabilizadores de Superfície em Composições Nanoparticuladas"; 6.316.029 para "Forma Sólida para Toma Oral de Rápida Desintegração"; 6.375.986

para "Composições Nanoparticuladas de Dose Sólida Compreendendo uma Combinação Sinérgica de um Estabilizador de Superfície Polimérico e Dioctil-Sulfo-succinato de sódio"; 6.428.814 para "Composições Nanoparticuladas Bioadesivas Tendo Estabilizadores de Superfície Catiônicos"; e 6.432.381 para "Métodos de Determinar o Alvo da Entrega do Fármaco no Tracto Gastrointestinal Superior e/ou Inferior", sendo que todas elas estão especificamente incorporadas como referência. Além destas, o Pedido de Patente U.S. No. 20020012675 A1, publicado a 31 de Janeiro de 2002, para "Composições Nanoparticuladas de Libertação Controlada" descreve composições nanoparticuladas.

Péptidos nanoparticulados e proteínas estão referenciados na Patente U.S. No. 6.375.986 para "Composições Nanoparticuladas em Dose Sólida Compreendendo uma Combinação Sinérgica de um Estabilizador de Superfície Polimérico e Dioctil-Sulfossuccinato de Sódio", as Patentes U.S. No. 6.428.814 e WO 01/26635 para "Composições Nanoparticuladas Bioadesivas Tendo Estabilizadores de Superfície Catiônicos", o Pedido de Patente U.S. No. 20020012675 A1 para "Composições Nanoparticuladas de Libertação Controlada", WO 00/51572 para "Uso de Lípidos Derivados de PEG como Estabilizadores de Superfície para Composições de Nanopartículas", publicado a 8 de Setembro de 2000, e WO 00/53164 para "Métodos de Evitar o Crescimento de Cristais e a Agregação de Partículas em Composições Nanoparticuladas", publicado a 14 de Setembro de 2000. Além disso, o pedido WO 00/27363 divulga formulações nanoparticuladas

para aerossol e métodos de fabricar essas formulações e o pedido EP 0.499.299 refere-se a nanopartículas de fármaco modificadas à superfície. Contudo, nenhuma destas referências explica ou sugere que o péptido ou proteína possa ser insulina.

Composições amorfas de pequenas partículas estão descritas, por exemplo, na Patente U.S. No. 4.783.484 para "Composição Particular e Seu Uso como Agente Antimicrobiano"; 4.826.689 para "Método de Fabricar Partículas de Tamanho Uniforme a partir de Compostos Orgânicos Insolúveis em Água"; 4.997.454 para "Método de Fabricar Partículas de Tamanho Uniforme a partir de Compostos Insolúveis"; 5.741.522 para "Partículas Porosas Ultra-pequenas, Não agregadas, de Tamanho Uniforme, para Reterem Bolhas de Gás no Seu Interior e Métodos"; e 5.776.496 para "Partículas Porosas Ultra-pequenas para Potenciarem a Dispersão Posterior por Ultra-sons". Nenhuma destas referências diz respeito a uma composição de insulina nanoparticulada.

A entrega de péptidos e de proteínas tem, desde há muito, sido um problema devido à elevada toxicidade, fraca biodisponibilidade e degradação do péptido ou proteína quando formulados para administração ou aplicação. Têm sido desenvolvidas muitas maneiras de formular composições de péptidos e de proteínas. Por exemplo, a Patente U.S. No. 5.889.110 divulga micropartículas compreendendo um sal formado a partir de um catião derivado de um péptido contendo um ou mais grupos básicos e um anião

derivado de um poliéster terminado por carboxi. A composição é preparada a partir de um equivalente estequiométrico dos grupos terminais do ácido carboxílico de poliéster relativos aos grupos de péptido básicos, susceptíveis de serem obtidos por um processo complicado e caro.

Um tal processo compreende: (i) dissolver o péptido básico e o poliéster terminado por carboxi num primeiro solvente em que tanto o péptido como o poliéster são solúveis para formarem uma primeira solução; (ii) congelar a primeira solução a alta velocidade para formar uma mistura congelada; (iii) liofilizar a mistura congelada para remover o primeiro solvente para formar um produto liofilizado; (iv) dispersar o produto liofilizado num segundo solvente que é um solvente para o poliéster e um não solvente para o péptido para formar uma segunda solução contendo o sal de péptido/poliéster: e (v) remover o segundo solvente da segunda solução por secagem por vaporização, congelamento por vaporização, evaporação ou co-acervação da separação de fases para formar um produto sólido microparticular.

A Patente U.S. No. 5.354.562 divulga um processo para preparar medicamentos de polipéptido micronizado numa forma de pó adequada à administração por aerossol ou para uso em suspensões injectáveis por meio de liofilização seguida de moagem a jacto. A Patente U.S. No. 6.051.694 divulga um método de redução de tamanho de proteínas compreendendo colocar a proteína sólida em contacto com um

fluido crítico no qual a proteína é essencialmente insolúvel, seguida por despressurização da proteína e mistura fluida crítica.

Nenhum dos métodos da técnica anterior produz composições de insulina nanoparticulada. Com efeito, tentativas para moer péptidos tais como insulina resultaram numa alteração da conformação dos péptidos. Por exemplo, Leung et al., *J. Pharm. Sci.*, 87: 501-7 (1998), divulgam a transformação da estrutura cristalina de hemi-hidrato de aspartame num polimorfo diferente pela moagem do péptido por esferas. Isto não é surpreendente, visto os péptidos e as proteínas poderem ser lábeis a condições de moagem, por exemplo, corte, pressão e temperatura.

Continuam a ser necessárias na técnica formulações de insulina nanoparticulada que facilitem a entrega de insulina em doses elevadas com actividade consistente e eficaz e outras vantagens em comparação com quaisquer preparações convencionais actualmente disponíveis. De acordo com a presente invenção, é fornecida essa preparação de insulina.

Sumário da Invenção

A presente invenção visa a descoberta surpreendente e inesperada de se poderem fabricar composições nanoparticuladas estáveis de insulina. As composições nanoparticuladas, que compreendem insulina e pelo menos um

estabilizador de superfície adsorvido à sua superfície, são vantajosas em comparação com preparações de insulina da técnica anterior pelo facto de possuírem tanto um rápido início de actividade como uma actividade prolongada.

A invenção visa ainda métodos de fabricar composições de insulina nanoparticulada e formas de doseamento farmacêutico que as contenham. O método de preparar as composições de insulina compreende colocar a insulina, por exemplo a insulina bovina insolúvel ou a insulina recombinante, em contacto com pelo menos um estabilizador de superfície durante um tempo e sob condições suficientes para produzir uma composição nanoparticulada estável. O tamanho de partícula da insulina é reduzido por moagem ou homogeneização. O(s) estabilizador(es) de superfície pode(m) ser colocado(s) em contacto com a insulina quer antes, durante ou depois da sua redução de tamanho.

A presente invenção refere-se ainda a preparações a serem usadas no tratamento de condições que exijam a terapia de insulina.

Breve Descrição das Figuras

FIG 1: São imagens microscópicas de varrimento electrónico, a um aumento de 5000, de partículas de insulina antes e depois da moagem de acordo com o método da presente invenção;

FIG. 2: Mostra os resultados de um gel de redução *SDS PAGE* do sobrenadante e do pelete de uma amostra de insulina nanoparticulada em duas concentrações para determinar se a moagem provocou uma perda de insulina;

FIG. 3: Mostra os resultados de um gel de redução *SDS PAGE* do pelete de uma amostra de insulina nanoparticulada em duas concentrações para determinar se a moagem provocou uma perda de insulina;

FIG. 4: Mostra os parâmetros farmacocinéticos da insulina resultantes da injeção de amostras de insulina nanoparticulada pelas vias intramuscular, subcutânea e intraperitoneal em comparação com uma solução de insulina de controlo;

FIG. 5: É um gráfico de barras ilustrando o *AUC* ($\mu\text{U/ml.h}$) de insulina a partir da injeção de amostras de insulina nanoparticulada através das vias subcutânea, intramuscular e intraperitoneal em comparação com uma solução de insulina de controlo;

FIG. 6: É um gráfico que mostra a concentração de insulina no sangue durante o tempo a seguir à injeção de amostras de insulina nanoparticulada através das vias subcutânea, intramuscular e intraperitoneal em comparação com uma solução de insulina de referência;

FIG. 7: É um gráfico mostrando a concentração

de glicose no sangue durante o tempo a seguir à injeção de amostras de insulina nanoparticulada através das vias subcutânea, intramuscular e intraperitoneal em comparação com uma solução de insulina de referência; e

FIG. 8: É um gráfico mostrando a alteração da concentração de glicose no sangue durante o tempo a seguir à injeção de amostras de insulina nanoparticulada através das vias subcutânea, intramuscular e intraperitoneal em comparação com uma solução de insulina de referência.

Descrição Pormenorizada da Invenção

A presente invenção visa composições de insulina nanoparticulada e métodos para a sua preparação e uso em terapia de insulina. Antes da presente invenção sabia-se que os medicamentos cristalinos podiam ser formulados em composições nanoparticuladas pelo método explicado na patente '684. Contudo, tal como atrás referimos, não eram contempladas as formulações de insulina nanoparticulada, em parte devido à dificuldade em reter a estrutura conformacional da insulina quando moída até um tamanho de partícula na região dos nanómetros. Isto é significativo, porque uma alteração na conformação da insulina pode estar correlacionada com uma perda de actividade.

A insulina nanoparticulada, preparada de acordo com a presente invenção, compreende pelo menos um estabilizador de superfície que está adsorvido nas partículas de

insulina. O estabilizador de superfície actua como uma barreira estérica para outras partículas de insulina evitando assim a aglomeração e o crescimento do tamanho de partícula. Isto resulta numa composição nanoparticulada estável, na qual o tamanho de partícula da composição não aumenta significativamente com o tempo por meio de solubilização e recristalização ou aglomeração. As moléculas individualmente adsorvidas do estabilizador de superfície estão essencialmente isentas de ligações cruzadas intermoleculares.

A insulina é uma hormona da proteína 5,8 kD importante na regulação do metabolismo de combustível. A secreção de insulina pelas células β do pâncreas é estimulada pela glicose e pelo sistema nervoso parassimpático. A insulina promove a desfosforilação de enzimas interconvertíveis chave. Uma consequência é estimular a síntese do glicogénio tanto nos músculos como no fígado e suprimir a gliconeogénese pelo fígado. A insulina também acelera a glicólise no fígado que, por sua vez, aumenta a síntese dos ácidos gordos. A entrada de glicose no músculo e nas células adiposas é promovida pela insulina. A abundância de ácidos gordos e de glicose no tecido adiposo resulta na síntese e armazenamento de triacilgliceróis. A acção da insulina também abrange o metabolismo dos aminoácidos e das proteínas. A insulina promove a absorção de aminoácidos de cadeia ramificada pelos músculos, o que favorece o desenvolvimento de uma proteína muscular. Em suma, a insulina tem um efeito de estimulação geral sobre a síntese das proteínas.

Existem três composições diferentes de insulina: solúveis, insolúveis e uma mistura das mesmas. A diferença entre estas composições está na observada biodisponibilidade a condições fisiológicas. A insulina insolúvel e uma mistura de insulina solúvel e insolúvel têm um início de actividade lento, de cerca de 2 horas, mas uma duração prolongada que vai até cerca de 24 e 13-14 horas, respectivamente. A insulina solúvel tem um início de actividade mais rápido, cerca de 30 minutos, mas com uma actividade que dura apenas cerca de seis horas. A insulina de nanopartículas da presente invenção é superior às composições de insulina da técnica anterior pelo facto de exhibir um rápido início de actividade, como o que é encontrado com a insulina solúvel, e exhibir uma actividade de duração prolongada, tal como a que é encontrada em misturas de insulina insolúvel e solúvel-insolúvel.

A composição de insulina pode ser formulada para administração via, por exemplo, administração oral, pulmonar, nasal, parentérica, rectal, local, bucal ou tópica.

As partículas de insulina podem estar na forma de partículas cristalinas, partículas semi-cristalinas, partículas semi-amorfas, partículas amorfas, ou uma mistura das mesmas.

A concentração de insulina nas composições da invenção podem variar desde cerca de 99,5% até cerca de

0,001%, desde cerca de 95% até cerca de 0,1%, ou desde cerca de 90% até cerca de 0,5%, em peso, baseado no peso seco combinado total da insulina e pelo menos um estabilizador de superfície, não incluindo outros excipientes.

A. Estabilizadores de Superfície Úteis

Estabilizadores de superfície apropriados utilizados na preparação da insulina de nanopartículas em assunto são preferivelmente seleccionados a partir de excipientes farmacêuticos orgânicos e inorgânicos conhecidos. Podem ser usados dois ou mais estabilizadores de superfície em combinação. Os estabilizadores de superfície protegem a insulina da degradação e da potencial clivagem da protease além de evitarem a aglomeração e o crescimento do tamanho de partícula como atrás descrevemos.

Esses excipientes farmacêuticos orgânicos e inorgânicos incluem vários polímeros, oligómeros de baixo peso molecular, produtos naturais e surfactantes. Estabilizadores de superfície preferidos incluem surfactantes não iónicos e iónicos (por exemplo, surfactantes catiónicos e aniónicos). Exemplos representativos de estabilizadores de superfície incluem cloreto de cetilpiridínio, gelatina, lecitina (fosfatídeos), dextrano, glicerol, colesterol, tragacanto, ácido esteárico, os seus sais e os seus ésteres, cera emulsionante de cetomacrogol, ésteres de sorbitano, alquiléteres de polioxietileno, derivados de óleo de rícino de polioxietileno, ésteres de ácido gordo de

polioxietileno-sorbitano, por exemplo, os Tweens® disponíveis no comércio, tais como Tween 80® (ICI Specialty Chemicals); polietileno-glicóis, por exemplo, Carbowaxs 3350® e 1450®, e Carbopol 934® (Union Carbide), Brometo de dodeciltrimetilamônio, estearatos de polioxietileno, dióxido de silício coloidal, dodecilsulfato de sódio, carboximetilcelulose cálcica, hidroxipropilceluloses (por exemplo, HPC, HPC-SL e HPC-L), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), carboximetilcelulose sódica, metilcelulose, hidroxietilcelulose, ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, celulose não cristalina, alumino-silicato de magnésio, trietanolamina, álcool polivinílico (PVA), polivinil-pirrolidona (PVP), polímero de 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol com óxido de etileno e formaldeído (também conhecido como tiloxapol), poloxâmeros, por exemplo, Pluronic F68® e F108® que são copolímeros em bloco do óxido de etileno e óxido de propileno; poloxaminas, por exemplo, Tetronic 908®, também conhecido como Poloxamina 908®, que é um copolímero em bloco tetrafuncional derivado da adição sequencial de óxido de propileno e óxido de etileno a etilenodiamina (BASF Corporation, Parsippany, N.J.)); um fosfolípido carregado tal como glicerol de dimiristoíl-fosfatidilo, dioctilsulfossuccinato (DOSS); Tetronic 1508® (T-1508) (BASF Corporation), dialquilésteres do ácido sulfossuccínico sódico (por exemplo, Aerosol OT®, que é um éster de dioctilo do ácido sulfossuccínico sódico (American Cyanamid)); lauril-sulfato de sódio (SLS), tal como Duponol p® (DuPont); Tritons X-200®, que é um alquil-aril-poliéter-sulfonato (Rohm e Haas); Crodestas F-110®, que é uma mistura de

estearato de sacarose e distearato de sacarose (Croda Inc.); p-isononilfenoxipoli-(glicidol), também conhecido como Olin-IOG® ou Surfactante 10-G® (Olin Chemicals, Stamford, CT); Crodestas SL-40® (Croda, Inc.); poli(brometo de 2-metacriloxietiltrimetilamônio) (S1001); poli(metacrilato de N-vinilpirrolidona/2-dimetilaminoetil)-di-metilsulfato quaternário (S1002); poli(cloreto de 2-metilacriloxiamidopropiltrimetilamônio) (S1004); ácido desoxicólico de sódio; vitamina E derivada com polietileno-glicol (PEG), um fosfolípido derivado com PEG, colesterol derivado com PEG, um derivado de colesterol derivado com PEG, vitamina A derivada com PEG, cloreto de benzalcônio (BKC), centrimida (um composto de amônio quaternário), Span® 20 (sorbitano monolaurato), Plasdane® S630, (um copolímero aleatório de polivinilpirrolidona (PVP) e acetato de vinilo numa proporção de 60:40), brometo de hexildeciltrimetilamônio (HDMAB), copolímeros tribloco da estrutura $\text{--}(\text{--PEO})\text{--}(\text{--PBO})\text{--}(\text{--PEO})\text{--}$ (conhecidos como B20-5000), poli(brometo de 2-metacriloxietiltrimetilamônio) (S1001), poli(metacrilato de N-vinilpirrolidona/2-dimetilaminoetil) di-metilsulfato quaternário (S1002), poli(cloreto de 2-metilacriloxiamidopropiltrimetilamônio) (S1004), copolímeros aleatórios de PVP e acetato de vinilo, lisozima e afins.

Exemplos de estabilizadores de superfície catiónicos úteis incluem, mas não se limitam a, polímeros, biopolímeros, polissacarídeos, celulósicos, alginatos, fosfolípidos e compostos não poliméricos tais como estabilizadores zwitteriônicos, poli-n-metilpiridínio, cloreto de

piridínio de antriol, fosfolípidos catiónicos, quitosano, polilisina, polivinilimidazole, polibreno, brometo de trimetilamóniobrometo de polimetilmetacrilato (PMMTMABr), brometo de hexildesiltrimetilamónio (HDMAB) e dimetil-sulfato de metacrilato de polivinilpirrolidona-2-dimetil-aminoetilo.

Outros estabilizadores catiónicos úteis incluem, mas não se limitam a, lípidos catiónicos, sulfónio, fosfónio e compostos de amónio quaternário tais como cloreto de esteariltrimetilamónio, brometo de benzil-di(2-cloroetil)etilamónio, cloreto ou brometo de trimetilamónio de coco, cloreto ou brometo de metil-di-hidroxietilamónio de coco, cloreto de deciltriethylamónio, cloreto ou brometo de decildimetil-hidroxietilamónio, cloreto ou brometo de C₁₂₋₁₅-dimetil-hidroxietilamónio, cloreto ou brometo de coco-dimetil-hidroxietilamónio, metil-sulfato de miristiltrimetilamónio, cloreto ou brometo de lauril-dimetilbenzilamónio, cloreto ou brometo de lauril-dimetil(etenoxy)₄-amónio, cloreto de N-alquil(C₁₂₋₁₈)di-metilbenzilamónio, cloreto de N-alquil(C₁₄₋₁₈)dimetil-benzilamónio, mono-hidrato de cloreto de N-tetradecildimetilbenzilamónio, cloreto de dimetildidecilamónio, cloreto de N-alquil e (C₁₂₋₁₄)dimetil-1-naftilmetilamónio, haleto de trimetilamónio, sais de alquiltrimetilamónio e sais de dialquildimetilamónio, cloreto de lauriltrimetilamónio, sal de alquilamidoalquildialquilamónio etoxilado e/ou um sal de trialquilamónio etoxilado, cloreto de dialquilbenzeno-dialquilamónio, cloreto de N-didecildimetilamónio, mono-hidrato de cloreto de N-

tetradecildimetilbenzilamónio, cloreto de N-alquil(C₁₂₋₁₄)-dimetil-1-naftilmetilamónio e cloreto de dodecildimetilbenzilamónio, cloreto de dialquilbenzenoalquilamónio, cloreto de lauriltrimetil-amónio, cloreto de alquilbenzilmetilamónio, brometo de alquilbenzildimetilamónio, brometos de C₁₂, C₁₅, C₁₇-trimetilamónio, cloreto de dodecilbenziltriethylamónio, cloreto de poli-dialildimetilamónio (DADMAC), cloretos de dimetil-amónio, halogenetos de alquildimetilamónio, cloreto de tricetilmetilamónio, brometo de deciltrimetilamónio, brometo de dodeciltriethylamónio, brometo de tetradecil-trimetilamónio, cloreto de metiltriethylamónio (ALQUAT 336™), POLYQUAT 10™, brometo de tetrabutylamónio, brometo de benziltrimetilamónio, ésteres de colina (tais como ésteres de colina de ácidos gordos), cloreto de benzalcónio, compostos de cloreto de estearalcónio (tais como cloreto de esteariltrimónio e cloreto de Di-estearildimónio), brometo ou cloreto de cetilpiridínio, sais de haleto de polioxietilalquilaminas quaternizadas, MIRAPOL™ e ALKAQUAT™ (Alkaril Chemical Company), sais de alquilpiridínio; aminas, tais como alquilaminas, dialquilaminas, alcanolaminas, polietilenopoliaminas, acrilatos de N,N-dialquilaminoalquilo, e vinilpiridino, sais de amina, tais como acetato de laurilamina, acetato de estearilamina, sal de alquilpiridínio e sal de alquilimidazólio, e óxidos de amina; sais de imida-azolínio; acrilamidas quaternárias protonadas; polímeros quaternários metilados, tais como poli[cloreto de dialildimetilamónio] e poli-[cloreto de N-metilvinil-piridínio]; e guar catiónico.

Estes exemplos de estabilizadores de superfície catiónicos e outros estabilizadores de superfície catiónicos estão descritos em J. Cross e E. Singer, *Cationic Surfactants: Analytical and Biological Evaluation* (Marcel Dekker, 1994); P. e D. Rubingh (Editor), *Cationic Surfactants: Physical Chemistry* (Marcel Dekker, 1991); e J. Richmond, *Cationic Surfactants: Organic Chemistry I*, (Marcel Dekker, 1990)).

Estabilizadores primários não poliméricos particularmente preferidos são qualquer composto não polimérico, tal como cloreto de benzalcónio, um composto de carbónio, um composto de fosfónio, um composto de oxónio, um composto de halónio, um composto organometálico catiónico, um composto fosforoso quaternário, um composto de piridínio, um composto de amónio secundário, um composto de amónio terciário e compostos de amónio quaternário da fórmula $NR_1R_2R_3R_4^{(+)}$. Para compostos da fórmula $NR_1R_2R_3R_4^{(+)}$:

(i) nenhum de R_1-R_4 é CH_3 ;

(ii) um de R_1-R_4 é CH_3 ;

(iii) três de R_1-R_4 são CH_3 ;

(iv) todos de R_1-R_4 são CH_3 ;

(v) dois de R_1-R_4 são CH_3 , um de R_1-R_4 é $C_6H_5CH_2$, e um de R_1-R_4 é uma cadeia de alquilo de sete átomos de carbono ou menos;

(vi) dois de R_1-R_4 são CH_3 , um de R_1-R_4 é $C_6H_5CH_2$, e um de R_1-R_4 é uma cadeia de alquilo de dezanove átomos de carbono ou mais;

(vii) dois de R_1-R_4 são CH_3 , um de R_1-R_4 é o grupo $C_6H_5(CH_2)_n$, onde $n > 1$;

(viii) dois de R_1-R_4 são CH_3 , um de R_1-R_4 é $C_6H_5CH_2$, e um de R_1-R_4 compreende pelo menos um heteroátomo;

(ix) dois de R_1-R_4 são CH_3 , um de R_1-R_4 é $C_6H_5CH_2$, e um de R_1-R_4 compreende pelo menos um halogénio;

(x) dois de R_1-R_4 são CH_3 , um de R_1-R_4 é $C_6H_5CH_2$, e um de R_1-R_4 compreende pelo menos um fragmento cíclico;

(xi) dois de R_1-R_4 são CH_3 , um de R_1-R_4 é um anel de fenilo; ou

(xii) dois de R_1-R_4 são CH_3 , e dois de R_1-R_4 são puramente fragmentos de alifático.

Esses compostos incluem, mas não se limitam a, cloreto de benalcónio, cloreto de benzetónio, cloreto de cetilpiridínio, cloreto de bentrímónio, cloreto de laralcónio, cloreto de cetalcónio, brometo de cetrímónio, cloreto de cetrímónio, hidrofluoreto de cetilamina, cloreto

de cloralilmetenamina (Quatérnio-15), cloreto de distearil-dimónio (Quatérnio-5), cloreto de dodecildimetil-etilbenzilamónio (Quatérnio-14), Quatérnio 22, Quater-nium-26, hectorreto de Quatérnio-18, hidrocloreto de dimetil-aminoetilcloreto, hidrocloreto de cisteína, fosfato de oleil-éter de dietanolamónio POE (10), fosfato de oleil-éter de dietanolamónio POE (3), cloreto de seboalcónio, dimetil-dioctadecilamónio-bentonite, cloreto de estearalcónio, brometo de domifeno, benzoato de denatónio, cloreto de miristalcónio, cloreto de laurtrimónio, di-hidrocloreto de etilenodiamina, hidrocloreto de guanidina, HCl de piridoxina, hidrocloreto de iofetamina, hidrocloreto de meglumina, cloreto de metilbenzetónio, brometo de mirtrimónio, cloreto de oleil-trimónio, poliquatérnio-1, hidrocloreto de procaína, cocobetaína, bentonita de estearalcónio, hecтонita de estearalcónio, di-hidrofluoreto de tri-hidroxietilpropilenodiamina de estearilo, cloreto de sebo-trimónio, e brometo de hexadeciltrimetilamónio.

Na sua maioria estes estabilizadores de superfície são excipientes farmacêuticos conhecidos e estão descritos em pormenor no "Handbook of Pharmaceutical Excipients", publicado em parceria pela American Pharmaceutical Association e a The Pharmaceutical Society of Great Britain (The Pharmaceutical Press, 2000). Os estabilizadores de superfície estão disponíveis no comércio e/ou podem ser preparados por processos conhecidos na técnica a partir de materiais conhecidos.

A concentração do pelo menos um estabilizador de superfície pode variar desde cerca de 0,001 até cerca de 99,5%, desde cerca de 0,1% até cerca de 95%, e desde cerca de 0,5% até cerca de 90%, em peso, baseado no peso seco total combinado da insulina e pelo menos de um estabilizador de superfície, não incluindo outros excipientes.

B. Tamanho de Partícula das Partículas de Insulina

Preferivelmente, as nanopartículas de insulina da invenção têm um tamanho de partícula médio eficaz inferior a cerca de 5 micrones, inferior a cerca de 4 micrones, inferior a cerca de 3 micrones, inferior a cerca de 2 micrones, inferior a cerca de 1500 nm, inferior a cerca de 1 micron, inferior a cerca de 800 nm, inferior a cerca de 700 nm, inferior a cerca de 600 nm, inferior a cerca de 500 nm, inferior a cerca de 400 nm, inferior a cerca de 300 nm, inferior a cerca de 200 nm, inferior a cerca de 100 nm, inferior a cerca de 75 nm, ou inferior a cerca de 50 nm, tal como medido por métodos de dispersão de luz ou outros métodos aceites na técnica. Por "um tamanho de partícula médio eficaz inferior a cerca de 5 micrones" pretende-se dizer que pelo menos cerca de 50% das partículas de insulina têm, em média ponderada, um tamanho de partícula inferior a cerca de 5 micrones quando medido por dispersão de luz ou outras técnicas convencionais. Além disso, noutros modelos de realização da invenção, pelo menos cerca de 70%, cerca de 90% ou cerca de 95% das partículas de

insulina têm um tamanho de partícula médio eficaz inferior a 5 micrones, inferior a cerca de 4 micrones, inferior a cerca de 3 micrones, inferior a cerca de 3 micrones, inferior a cerca de 1500 nm, inferior a cerca de 1 micron, inferior a cerca de 800 nm, inferior a cerca de 700 nm, inferior a cerca de 600 nm, inferior a cerca de 500 nm, inferior a cerca de 400 nm, inferior a cerca de 300 nm, inferior a cerca de 200 nm, inferior a cerca de 100 nm, inferior a cerca de 75 nm, ou inferior a cerca de 50 nm.

C. Métodos de Fabricar Composições de Insulina Nanoparticulada

Podem ser feitas composições de agente activo nanoparticulada usando, por exemplo, técnicas de moagem ou de homogeneização. Métodos exemplares de fabricar composições nanoparticuladas estão descritos na Patent U.S. No. 5.145.684. Métodos de fabricar composições nanoparticuladas também estão descritos na Patente U.S. No. 5.518.187 para "Método de Triturar Substâncias Farmacêuticas"; a Patente U.S. No. 5.718.388 para "Método Contínuo de Triturar Substâncias Farmacêuticas"; Patente U.S. No. 5.862.999 para "Método de Triturar Substâncias Farmacêuticas"; Patente U.S. No. 5.543.133 para "Processo de Preparar Composições para Contraste aos Raios X Contendo Nanopartículas"; Patente U.S. No. 5.534.270 para "Método de Preparar Nanopartículas de Fármaco Estáveis"; Patente U.S. No. 5.510.118 para "Processo de Preparar Composições Terapêuticas Contendo Nanopartículas"; e Patente U.S. No.

5.470.583 para "Método de Preparar Composições de Nanopartículas Contendo Fosfolípidos Carregados para Reduzir a Agregação".

O tamanho de partícula médio eficaz óptimo da invenção pode ser obtido controlando o processo da redução do tamanho de partícula, tal como controlando o tempo de moagem e a quantidade de estabilizador de superfície adicionada. O crescimento do tamanho de partícula e a agregação de partículas também podem ser minimizados por moagem e/ou armazenamento da composição a temperaturas inferiores.

As dispersões de insulina nanoparticulada fabricadas por meio de, por exemplo, moagem ou homogeneização, podem ser utilizadas em formulações para tomas sólidas, semi-sólidas ou líquidas, tais como formulações de libertação controlada, formulações para doses sólidas de rápida fusão, formulações para aerossol, formulações liofilizadas, comprimidos, drageias sólidas, cápsulas, pós, líquidos para injeção, etc.

1. Moagem para Obter Composições de Insulina Nanoparticulada

Moer a insulina para obter uma composição nanoparticulada compreende dispersar partículas de insulina num meio de dispersão líquido em que a insulina é pouco solúvel, seguido da aplicação de meios mecânicos na

presença de meios de trituração para reduzir o tamanho de partícula da insulina até ao desejado tamanho médio de partícula eficaz. O meio de dispersão pode ser, por exemplo, água, óleo de açafrão, etanol, t-butanol, glicerina, polietilenoglicol (PEG), hexano ou glicol.

O tamanho das partículas de insulina pode ser reduzido na presença de pelo menos um estabilizador de superfície. Alternativamente, as partículas de insulina podem ser colocadas em contacto com um ou mais estabilizadores de superfície depois do atrito. Contudo, é preferido dispersar a insulina no meio líquido de dispersão na presença de pelo menos um estabilizador de superfície como auxiliar no humedecimento das partículas de insulina. Outros compostos, tais como um diluente, podem ser adicionados à composição de insulina/estabilizador de superfície durante o processo de redução de tamanho. As dispersões podem ser fabricadas continuamente ou por lotes.

2. Homogeneização para se Obterem Composições Nanoparticuladas de Insulina

Métodos de homogeneização exemplares para preparar composições nanoparticuladas de agente activo estão descritas na Patente U.S. No. 5.510.118, para "Processo de Preparar Composições Terapêuticas Contendo Nanopartículas".

Um método desse tipo compreende dispersar partículas de insulina num meio líquido de dispersão,

seguindo-se submeter a dispersão a homogeneização para reduzir o tamanho de partícula da insulina até ao desejado tamanho de partícula médio eficaz. As partículas de insulina podem ser reduzidas em tamanho na presença de pelo menos um estabilizador de superfície. Alternativamente, as partículas de insulina podem ser colocadas em contacto com um ou mais estabilizadores de superfície quer antes quer depois da redução do tamanho de partícula. Contudo, é preferido dispersar a insulina no meio de dispersão líquida na presença do pelo menos um estabilizador de superfície como auxiliar para humedecer as partículas de insulina. Outros compostos, tais como um diluente, podem ser adicionados à composição de insulina/estabilizador de superfície quer antes, durante ou depois do processo de redução de tamanho. As dispersões podem ser fabricadas continuamente ou por lotes.

D. Excipientes

As composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção incluem composições de insulina nanoparticulada formulada em conjunto com um ou mais suportes não-tóxicos, fisiologicamente aceitáveis, adjuvantes ou veículos, colectivamente referidos como suportes. Esses suportes podem compreender soluções, dispersões, suspensões ou emulsões aquosas ou não aquosas, estéreis, fisiologicamente aceitáveis e pós estéreis para reconstituição nesse tipo de preparações. Exemplos de suportes, diluentes, solventes ou veículos aquosos e não aquosos adequados

incluem água, etanol, polióis (propilenoglicol, polietilenoglicol, glicerol e afins), misturas adequadas dos mesmos, óleos vegetais (tal como azeite) e ésteres orgânicos injectáveis tais como oleato de etilo. Pode ser mantida uma fluidez apropriada, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do necessário tamanho de partícula no caso de dispersões e pelo uso de surfactantes.

As composições nanoparticuladas também podem conter adjuvantes tais como agentes de preservação, humedecimento, emulsão e administração. A prevenção do crescimento de microrganismos pode ser assegurada por vários agentes anti-bacterianos e anti-fúngicos tais como sorbato de potássio, metilparabeno, propilparabeno, ácido benzóico e seus sais, outros ésteres de ácido parahidroxibenzóico como butilparabeno, álcoois como álcool etílico ou benzílico, compostos fenólicos como fenol, ou compostos quaternários como cloreto de benzalcónio, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico e afins. Também pode ser desejável incluir agentes isotónicos tais como açúcares, cloreto de sódio e afins. A absorção prolongada da forma farmacêutica injectável pode ser conseguida pelo uso de agentes que retardem a absorção, tais como monoestearato de alumínio e gelatina.

Num modelo de realização da invenção, as composições nanoparticuladas da invenção destinam-se a

administração parentérica a seres humanos e animais por vias conhecidas de administração parentérica, isto é, intravenosa, intramuscular, subcutânea ou intraperitoneal. Também podem ser utilizadas outras formas de doseamento, tais como aerossóis, comprimidos, etc.

Os níveis de doseamento real das composições de insulina nanoparticulada da invenção estão indicados como unidades normalizadas de insulina, como acontece com as preparações de insulina convencional, e a dose administrada dependerá de factores reconhecidos como o prazo de administração e o peso corporal, e do estado geral de saúde, idade, sexo e dieta do paciente.

Os exemplos que se seguem estão indicados para ilustrar a presente invenção. Contudo, entenda-se que a invenção não deverá ser limitada pelas condições ou pormenores específicos descritos nestes exemplos.

Exemplo 1

O objectivo deste exemplo foi preparar formulações de insulina nanoparticulada usando técnicas de moagem de baixa energia.

A insulina e um ou mais estabilizadores de superfície, nas quantidades indicadas na Tabela 1, foram misturados com água para formar uma lama de pré-moagem.

Esta lama foi então adicionada a um vaso selável e girou de 1 até 4 dias a uma velocidade rotacional predeterminada (tipicamente 100-200 rpm) num moinho a cilindros usando zircónia de alta resistência como meio de trituração (Tosoh Corporation, Tóquio, Japão) com um diâmetro de 0,8 mm. Esta técnica de moagem de baixa energia depende dos mecanismos de trituração gravitacional para reduzir o tamanho de partícula, donde o uso de meios cerâmicos pesados.

A distribuição dos tamanhos de partícula das resultantes composições de insulina foi determinada usando-se um analisador de tamanho de partículas por dispersão de luz Horiba LA-910 (Horiba Instruments, Irvine, CA). Os resultados apresentados na Tabela 1 foram determinados a 24 horas pós moagem. É de notar que a concentração de insulina neste Exemplo era de 5% mas, por exemplo, podia ter sido de 1%, 2%, 3%, ou 10% ou mais.

Os estabilizadores de superfície utilizados incluem: (1) poli(brometo de 2-metacriloxietil-trimetilamónio) (S1001); (2) poli(metacrilato de N-vinilpirrolidona/2-dimetil-aminoetil) quaternário de dimetilsulfato (S 1002); (3) poli(cloreto de 2-metilacriloxiamidopropil-trimetilamónio) (S 1004); (4) Pluronic® F68; (5) hidroxipropilcelulose (HPC); (6) ácido desoxicólico de sódio; (7) vitamina E derivada com polietilenoglicol (PEG); e (8) Tween® 80.

TABELA 1 Formulações de Insulina Nanoparticulada Moída por Esferas a Baixa Energia (Tamanho de Partícula 24 hrs após Moagem)				
Exp. No.	% Fármaco	% de Estabilizador	Tamanho Médio de Partícula @ 24 horas após moagem (nm)	Tamanho de Partícula de 90% @ 24 horas após moagem (nm)
1	5,0% insulina	0,0	4198 (1344 após 1 min. de ruptura pela energia de ondas sonoras)	7092 (3104 após 1 min. de ruptura pela energia de ondas sonoras)
2	5,0% insulina	1% F68 0,1% Ácido Desoxi-cólico Sódico	165 (144 após 1 min. de ruptura pela energia de ondas sonoras)	266 (193 após 1 min. de ruptura pela energia de ondas sonoras)
3	5,0% insulina	1% PVP k17 0,1% Ácido Desoxicólico Sódico	199 (163 após 1 min. de ruptura pela energia de ondas sonoras)	279 (219 após 1 min. de ruptura pela energia de ondas sonoras)
4	5,0% insulina	1% PVP k29-32 0,1% Ácido Desoxicólico Sódico	243 (171 após 1 min. de ruptura pela energia de ondas sonoras)	364 (250 após 1 min. de ruptura pela energia de ondas sonoras)
5	5,0% insulina	1% S1004	252	362
6	5,0% insulina	1% S1001	282 (258 após 1 min. de ruptura pela energia de ondas sonoras)	401 (380 após 1 min. de ruptura pela energia de ondas sonoras)

As medições referidas na Tabela 2 foram efectuadas uma semana depois da moagem para determinar a estabilidade num grupo representativo das composições nanoparticuladas indicadas na Tabela 1. Em várias instâncias, o tamanho de partícula da composição era menor passada uma semana do que 24 horas depois da moagem. Embora não nos limitando a qualquer teoria, cremos que a partícula de estabilizador e de fármaco pode passar por um período de relaxamento termodinâmico. Outra teoria é a de que em

conjunto com o relaxamento ou separado do mesmo, há interações entre a partícula de insulina e o estabilizador. Além disso, pode ocorrer um fenómeno à superfície da partícula de insulina que é similar ao uso de estabilizadores catiónicos para complexar e condensar ADN em solução, isto é, a interacção do estabilizador pode provocar uma leve condensação sobre a superfície da partícula de insulina, resultando na observada redução do tamanho de partícula.

TABELA 2 Formulações de Insulina Nanoparticulada Moída por Esferas a Baixa Energia (Tamanho de Partícula 24 hrs e 1 Semana Após Moagem)						
Exp. No.	% Medicamento	% de Estabilizador	Tamanho Médio de Partícula @ 24 horas após moagem (nm)	Tamanho de Partícula de 90% @ 24 horas após moagem (nm)	Tamanho Médio de Partícula @ 1 semana após moagem (nm)	Tamanho de Partícula de 90% @ 1 semana após moagem (nm)
4	5,0% insulina	1% PVP k29-32 0,1% Ácido Desoxicolico Sódico	243 (171 após 1 min. de ruptura pela energia de ondas sonoras)	364 (250 após 1 min. de ruptura pela energia de ondas sonoras)	212 (165 após 1 min. de ruptura pela energia de ondas sonoras)	301 (222 após 1 min. de ruptura pela energia de ondas sonoras)
5	5,0% insulina	1% S1004	252	362	263	364
6	5,0% insulina	1% S1001	282 (258 após 1 min de ruptura pela energia de ondas sonoras)	401 (380 após 1 min de ruptura pela energia de ondas sonoras)	303 (266 após 1 min de ruptura pela energia de ondas sonoras)	450 (384 após 1 min de ruptura pela energia de ondas sonoras)
7	5,0% insulina	1% S1001	521	1004	498	905

Exemplo 2

O objectivo deste exemplo foi preparar formulações de insulina nanoparticulada usando condições de moagem de alta energia.

Foram preparadas amostras de insulina usando um moinho com meios de atrito de alta energia, NanoMill™ (Elan Drug Delivery, King of Prussia, PA). Um moinho de alta energia destina-se a aplicar à dispersão particular uma velocidade rotacional muito mais elevada (100-6000 rpm, tipicamente 5000 rpm) do que a que é usada em processos de moagem de baixa energia. A elevada velocidade rotacional confere condições de muito alto corte dentro da câmara de moagem. É esta força de corte que provoca a redução do tamanho de partícula.

Os meios usados nesta tecnologia de moagem são meios de poliestireno de ligação altamente cruzada, muito mais leves. Para a preparação de composições de insulina nanoparticulada descritas na Tabela 3, usaram-se meios de 500 μm . Outros tamanhos de meios que poderiam ser usados vão de 50 μm até 500 μm . As amostras foram moídas desde cerca de 30 minutos até cerca de 3 horas. As distribuições do tamanho de partículas foram determinadas por meio de um analisador de tamanho de partículas por dispersão de luz Horiba LA-910 (Horiba Instruments, Irvine, CA). O tamanho de partícula foi determinado para todas as três composições a seguir à moagem, para a Amostra 2 24 horas depois da

moagem e, para as Amostras 1 e 2, 1 semana depois da moagem. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

TABELA 3								
FORMULAÇÕES DE INSULINA NANOPARTICULADA MOÍDA A ALTA ENERGIA								
Exp. No.	% de Insulina	% de Estabilizador	Tamanho Médio de Partícula (nm) @ colheita	Tamanho de Partícula (nm) de 90% @ colheita	Tamanho Médio de Partícula (nm) @ 24 hrs após moagem	Tamanho de Partícula de 90% (nm) @ 24 hrs após moagem	Tamanho Médio de Partícula (nm) @ 1 semana após moagem	Tamanho de Partícula de 90% (nm) @ 1 semana após moagem
1	4,0%	1% S1001	255 234	378 353			297 247	436 372
2	2,5%	1% S1004	282 239	381 341	284 275	382 370	232 217	329 207

Estes resultados demonstram a capacidade de se produzirem composições de insulina nanoparticulada que mantêm estabilidade e talvez até melhorem com o armazenamento usando técnicas de moagem de alta energia. O mais importante é os resultados demonstrarem que, em armazenamento, se observa pouca ou nenhuma agregação. Assim, os dados mostram a capacidade de se prepararem consistentemente formulações de insulina nanoparticulada que mantêm a sua integridade em armazenamento.

Exemplo 3

O objectivo deste exemplo é examinar a insulina de nanopartículas preparada de acordo com a invenção e

testar a estabilidade das composições durante um período de armazenamento alargado.

A insulina nanoparticulada foi preparada de acordo com o processo do Exemplo 2. A moagem foi efectuada até se descobrir que as partículas de insulina tinham um tamanho médio de partícula de 100 nm, sendo 90% das partículas inferiores a 145 nm.

A Fig. 1 mostra imagens SEM de partículas de insulina antes e depois da moagem, demonstrando claramente o efeito da moagem e, o mais importante, a capacidade dos estabilizadores de superfície em prevenir a aglomeração das partículas de insulina. A análise de uma amostra deste material armazenado durante seis meses a 5°C revelou que 90% das partículas de insulina eram inferiores a 145 nm.

Exemplo 4

O objectivo deste exemplo era determinar o teor em insulina de uma composição nanoparticulada a seguir à moagem e determinar se o processo de moagem resulta em perda de insulina.

A insulina nanoparticulada foi preparada de acordo com o processo do Exemplo 1 a partir de uma lama de 2% de insulina tendo 1% de Pluronic® F68 e 0,1% de ácido desoxicólico de sódio como estabilizadores de superfície.

Alíquotas da insulina nanoparticulada foram centrifugadas a 13.000 g durante 15 min. O sobrenadante foi isolado e o pelete lavado em Tampão de Fosfato Salino (PBS) e centrifugado outra vez. Os peletes e as fracções de sobrenadante após centrifugação foram submetidos a análise sobre um gel SDS-PAGE. Insulina em bruto em PBS, contendo adicionalmente HCL de 0,1 M para estabilidade (Sigma I-5500), serviu como controlo.

Geles de redução usados na análise foram preparados como geles de acrilamida a 16% e compreendiam 5,33 ml de solução de acrilamida, 2,02 ml de água destilada, 2,50 ml de tampão TRIS de 1,5 M a pH de 8,8, 100 µm de SDS a 10%, 50 µm de persulfato de amónio a 10% e 5 µm de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina). Os geles de redução são úteis para visualizar as bandas de insulina, que aparecem como um dímero, tetrâmero, etc., e para identificar fragmentos de insulina degradada.

A composição do tampão de funcionamento e dos tampões de carga eram as seguintes:

Tampão de Eléctrodo 5X		Tampão de Carga de Amostra	
(1X = Tris de 25mM, Glicina de 192 mM, SDS de 0,1%, pH 8,3)		(Tampão de redução de SDS: 62,5 mM Tris HCl (pH6,8), Glicerol a 20%, SDS a 2%, β-mercaptoetanol a 5%)	
Base de Tris	37,5 g	Água destilada	3,0 ml
Glicina	180,0 g	Tris-HCL de 0,5M (pH6,8)	1,0 ml
SDS	12,5 g	Glicerol	1,6 ml
Água Destilada	2,5 L	SDS a 10%	1,6 ml
		β-mercaptoetanol	0,4 ml
Diluir 200 ml do estoque de 5X com 800 ml de água destilada antes de usar.		0,5% (p/v) de 0,4 ml de azul de bromofenol (em água)	

As amostras e o sobrenadante foram diluídos até 1:10 e 1:50, respectivamente, com tampão de amostra e, depois, foram aquecidos até 95°C durante 5 mins. antes de serem carregados no gel. O volume de sobrenadante carregado era a quantidade que seria necessária para carregar a quantidade necessária de amostra, se a insulina fosse deixada em suspensão.

Prepararam-se dois geles de redução e as amostras foram carregadas nos geles de maneira que o pelete e as fracções de sobrenadante de cada amostra pudessem ser observadas lado a lado. Os resultados estão indicados na FIG. 2 e na FIG. 3. O gel de redução apresentado na FIG. 2 foi carregado com o seguinte:

Faixa 1: Amostra de Insulina em Bruto
Faixa 2: Sobrenadante de amostra em diluição de 1:50;
Faixa 3: Sobrenadante de amostra em diluição de 1:10;
Faixa 4: Amostra de Pelete em diluição de 1:50;
Faixa 5: Amostra de Pelete em diluição de 1:10; e
Faixa 6: Marcadores de Elevado Peso Molecular.

O gel de redução apresentado na Fig. 3 foi carregado com o seguinte:

Faixa 1: Marcadores de Elevado Peso Molecular;
Faixa 2: Amostra de pelete em diluição de 1:10;
Faixa 3: Amostra de pelete em diluição de 1:50;

Faixa 4: Amostra de Insulina em Bruto; e

Faixa 5: Amostra de Insulina em Bruto.

Os geles apresentados nas FIGs. 2 e 3 demonstram que a fracção de pelete da formulação de insulina moída contém toda a insulina. As faixas carregadas com sobrenadante parecem estar isentas de insulina. Isto indica que toda a insulina na composição de insulina nanoparticulada está contida na composição nanoparticulada ou associada à mesma, havendo pouca ou nenhuma insulina livre em solução. Assim, há essencialmente uma retenção ou associação de 100% da insulina na composição nanoparticulada.

Exemplo 5

O objectivo deste exemplo era testar a eficácia das composições de insulina nanoparticulada administrada parentericamente e comparar a eficácia das formulações com composições de insulina em bruto convencional.

Todos os animais (ratos Wistar) foram pesados e submetidos a um jejum de 4 horas antes de se iniciar o estudo. Os ratos (250-300 g) foram anestesiados pela administração intra-muscular (IM) de uma solução de cetamina (22,5 mg/animal) e acepromazina (0,75 mg/kg) uma hora antes da administração das soluções de teste. A amostra de insulina nanoparticulada preparada de acordo com o processo do Exemplo 1 a partir de uma lama de insulina a 2% tendo Pluronic® F68 a 1% e ácido desoxicólico de sódio a

0,1% como estabilizadores de superfície foi formulada como uma solução em *PBS* (solução de tampão de fosfato) de pH 7,4. Grupos de 6 animais receberam uma quantidade da solução suficiente para fornecer uma *IU* de insulina por injeção subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal num estudo aleatório não recombinação. Os valores de glicose dos ratos foram medidos usando um glicómetro Alfa Accutren® (Boehringer Mannheim) a seguir às amostras de sangue sistêmicas que foram retiradas da artéria caudal. Foi retirada uma amostra de sangue de base e retiraram-se amostras a intervalos depois da injeção, até 4 horas. A anestesia foi mantida ao longo de todo o estudo. Uma solução de insulina não formulada foi utilizada como referência.

O modelo de rato usado é um modelo hiperglicémico. Os parâmetros farmacocinéticos do teste estão indicados na FIG. 4. Pode ver-se, dos resultados na FIG. 4, que as composições de insulina da presente invenção são biologicamente activas e pelo menos aproximadamente iguais à solução de insulina de referência. A Fig. 5 ilustra o *AUC* ($\mu\text{U}/\text{ml.h}$) para a amostra pelos três modos de administração parentérica em comparação com a solução de insulina de referência. A análise apresentada na FIG. 5 estabelece igualmente a equivalência da preparação de teste para a solução de insulina de referência.

As FIGs. 6 e 7 são perfis de concentração-tempo simultâneos, sendo que a FIG 6 ilustra a concentração média de glicose enquanto a FIG. 7 ilustra a concentração média

de insulina. Tal como atrás se descreveu, ambas registam em gráfico a amostra de teste administrada por meio de injeção subcutânea, intramuscular e intraperitoneal em comparação com uma preparação de insulina de referência. Se uma preparação de insulina for biologicamente activa, é de esperar que uma queda dos níveis de glicose no sangue coincida com o aumento dos níveis de insulina no sangue. Os perfis nas FIGs. 6 e 7 estabelecem claramente que as formulações de insulina nanoparticulada da invenção são biologicamente activas.

Na sua totalidade, os resultados relatados nas figuras demonstram que as composições de insulina nanoparticulada da presente invenção têm excelente bioactividade a seguir à administração parentérica, o que é pelo menos equivalente à solução de insulina de referência testada. No gráfico de alterações do nível de glicose no sangue registado na FIG. 8, pode ver-se que a preparação de nanopartículas da presente invenção é vantajosa em relação à solução de insulina de referência ao manter um abaixamento do nível de glicose no sangue ao longo da duração do teste. Uma particular vantagem pode ser verificada a partir da comparação da administração por via intraperitoneal.

Lisboa, 27 de Março de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição nanoparticulada compreendendo partículas de insulina e pelo menos um estabilizador de superfície não ligado por cruzamento adsorvido sobre a superfície do mesmo, em que as partículas de insulina têm um tamanho de partícula médio eficaz inferior a cerca de 5 micrones.

2. A composição de reivindicação 1, em que o tamanho de partícula médio eficaz das partículas de insulina é seleccionado a partir do grupo consistindo em menos de cerca de 4 micrones, menos de cerca de 3 micrones, menos de cerca de 2 micrones, menos de cerca de 1500 nm, menos de cerca de 1 micron, menos de cerca de 800 nm, menos de cerca de 700 nm, menos de cerca de 600 nm, menos de cerca de 500 nm, menos de cerca de 400 nm, menos de cerca de 300 nm, menos de cerca de 200 nm, menos de cerca de 100 nm, menos de cerca de 75 nm, e menos de cerca de 50 nm.

3. A composição das reivindicações 1 ou 2, em que a concentração de insulina e/ou o pelo menos um estabilizador de superfície são seleccionados a partir do grupo consistindo em desde cerca de 99,5% até cerca de 0,001%, desde cerca de 95% até cerca de 0,1%, e desde cerca de 90% até cerca de 0,5%, em peso, baseado no peso seco combinado total das partículas de insulina e pelo menos um estabilizador de superfície, não incluindo outros excipientes.

4. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a composição compreende ainda um ou mais excipientes, suportes, ou combinação dos mesmos, farmaceuticamente aceitáveis.

5. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que a composição é formulada para administração seleccionada a partir do grupo consistindo em administração oral, pulmonar, nasal, parentérica, rectal, local, bucal e tópica.

6. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que a insulina está numa forma seleccionada a partir do grupo consistindo em partículas cristalinas, partículas semi-cristalinas, partículas semi-amorfas, partículas amorfas e uma mistura das mesmas.

7. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, compreendendo ainda pelo menos dois estabilizadores de superfície.

8. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que o pelo menos um estabilizador de superfície é seleccionado a partir do grupo consistindo num estabilizador de superfície não iónico, um estabilizador de superfície aniónico, um estabilizador de superfície catiónico e um estabilizador de superfície iónico.

9. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que o pelo menos um estabilizador de superfície é seleccionado a partir do grupo consistindo em cloreto de cetilpiridínio, gelatina, caseína, fosfatídeos, dextrano, glicerol, goma de acácia, colesterol, tragacanto, ácido esteárico, ésteres e sais de ácido esteárico, estearato de cálcio, monoestearato de glicerol, álcool cetosteárico, cera emulsionante de cetomacrogol, ésteres de sorbitano, alquiléteres de polioxietileno, derivados de polioxietileno de óleo de rícino, ésteres de ácido gordo de polioxietileno-sorbitano, polietileno-glicóis, brometo de dodeciltrimetilamónio, estearatos de polioxietileno, dióxido de silício coloidal, fosfatos, dodecilsulfato de sódio, carboximetilcelulose cálcica, hidroxipropil-celuloses, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose sódica, metilcelulose, hidroxietilcelulose, ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, celulose não cristalina, alumino-silicato de magnésio, trietanolamina, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona, polímero de 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol com óxido de etileno e formaldeído, poloxâmeros, poloxaminas, um fosfolípido carregado, dimiristoíl-fosfatidil-glicerol, dioctilsulfossuccinato, dialquilésteres do ácido sulfossuccínico sódico, lauril-sulfato de sódio, alquil-aril-poliéter-sulfonatos, misturas de estearato de sacarose e diestearato de sacarose, copolímeros tribloco da estrutura: $-(\text{-PEO})-(\text{-PBO})-(\text{-PEO})-$, p-isononilfenoxipoli-(glicidol), decanoíl-N-metilglicamida; n-decil- β -D-glicopiranósido, n-decil- β -D-maltopiranósido, n-dodecil- β -D-glicopiranósido, n-dodecil-

β -D-maltósido, heptanoíl-N-metilglicamida, n-heptil- β -D-glicopiranósido, n-heptil- β -D-tioglicósido, n-hexil- β -D-glicopiranósido, nonanoíl-N-metilglicamida, n-noíl- β -D-glicopiranósido, octanoíl-N-metilglicamida, n-octil- β -D-glicopiranósido, octil- β -D-tioglicopiranósido, lisozima, um fosfolípido derivado de PEG, colesterol derivado de PEG, um derivado de colesterol derivado de PEG, lípidos catiónicos, cloreto de benzalcónio, compostos de sulfónio, compostos de fosfónio, compostos de amónio quaternário, brometo de benzil-di(2-cloroetil)etilamónio, cloreto de coco-trimetilamónio, brometo de coco-trimetilamónio, cloreto de coco-metil-di-hidroxietilamónio, brometo de coco-metil-di-hidroxietilamónio, cloreto de decil-trietilamónio, cloreto de decildimetil-hidroxietilamónio, cloreto brometo de decildimetil-hidroxietilamónio, cloreto de C₁₂₋₁₅-dimetil-hidroxietilamónio, brometo de C₁₂₋₁₅-dimetil-hidroxietilamónio, cloreto de coco-dimetil-hidroxietilamónio, brometo de coco-dimetil-hidroxietilamónio, metil-sulfato de miristiltrimetilamónio, cloreto de laurildimetilbenzilamónio, brometo de laurildimetilbenzilamónio, cloreto de laurildimetil(etenoxy)₄-amónio, brometo de lauril-dimetil(etenoxy)₄-amónio, cloreto de N-alquil(C₁₂₋₁₈)dimetilbenzilamónio, cloreto de N-alquil(C₁₄₋₁₈)dimetilbenzilamónio, mono-hidrato de cloreto de N-tetra-decildimetilbenzilamónio, cloreto de dimetildidecilamónio, cloreto de N-alquil e (C₁₂₋₁₄)dimetil-1-naftilmetilamónio, haleto de trimetilamónio, sais de alquiltrimetilamónio, sais de dialquildimetilamónio, cloreto de lauriltrimetilamónio, sal de alquilamido-alquildialquilamónio etoxilado, um sal de trialquilamónio etoxilado,

cloreto de dialquilbenzeno-dialquilamônio, cloreto de N-didecildimetilamônio, mono-hidrato de cloreto de N-tetradecildimetil-benzilamônio, cloreto de N-alkuil(C₁₂₋₁₄)dimetil-1-naftilmetilamônio, cloreto de dodecildimetil-benzilamônio, cloreto de dialquilbenzenoalquilamônio, cloreto de lauriltrimetilamônio, cloreto de alquil-benzilmetilamônio, brometo de alquilbenzildimetilamônio, brometos de C₁₂-trimetilamônio, brometos de C₁₅-trimetilamônio, brometos de C₁₇-trimetilamônio, cloreto de dodecilbenziltriethylamônio, poli-cloreto de dialildimetil-amônio (DADMAC), cloretos de dimetilamônio, halogenetos de alquildimetilamônio, cloreto de tricetilmetilamônio, brometo de deciltrimetilamônio, brometo de dodecil-triethylamônio, brometo de tetradeciltrimetilamônio, cloreto de metiltriocetilamônio, POLYQUAT 10™, brometo de tetrabutilamônio, brometo de benziltriethylamônio, ésteres de colina, cloreto de banzalcônio, compostos de cloreto de estearalcônio, brometo de cetilpiridínio, cloreto de cetilpiridínio, sais de haleto de polioxietilalquilaminas quaternizadas, MIRAPOL™, ALKAQUAT™, sais de alquil-piridínio; aminas, sais de amina, óxidos de amina, sais de imida-azolínio, acrilamidas quaternárias protonadas; polímeros quaternários metilados, guar catiônico, brometo de polimetilmetacrilatotrimetilamônio, poli-(brometo de 2-metacriloxietiltrimetilamônio) (S1001), quaternário de di-metilsulfato de poli(metacrilato de N-vinilpirrolidona/2-dimetilaminoetil) (S1002) e poli(cloreto de 2-metil-acriloxiamidopropiltrimetilamônio) (S1004).

10. A composição de reivindicação 8, em que o

estabilizador de superfície catiónico é seleccionado a partir do grupo consistindo num polímero, um biopolímero, um polissacarídeo, um celulósico, um alginato, um composto não polimérico e um fosfolípido.

11. A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 10 para uso em terapia.

12. Uma forma de doseamento compreendendo a composição de insulina nanoparticulada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 11, em que a forma de doseamento é uma formulação de doseamento sólido, semi-sólido ou líquido.

13. Uma forma de doseamento compreendendo a composição de insulina nanoparticulada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 11, em que a forma de doseamento é seleccionada a partir do grupo consistindo em formulações de libertação controlada, formulações em dose sólida de rápida fusão, formulações para aerossol, formulações liofilizadas, comprimidos, drageias sólidas, cápsulas, pós e líquidos para injeção.

14. Uma composição para administração parentérica compreendendo a composição de insulina nanoparticulada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 11, ou a forma de doseamento de reivindicação 12 ou 13, e um excipiente adequado, farmacologicamente aceitável.

15. Um método de fabricar a composição de insulina nanoparticulada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 11, compreendendo colocar as partículas de insulina com pelo menos um estabilizador de superfície durante um período e sob condições suficientes para produzir uma composição de insulina nanoparticulada tendo um tamanho de partícula médio eficaz inferior a cerca de 5 micrones.

16. O método de reivindicação 15, em que a referida colocação em contacto compreende moagem.

17. O método de reivindicação 15, em que a referida colocação em contacto compreende homogeneização.

18. O método de reivindicação 16, em que a referida moagem é moagem de elevada energia ou moagem com humidade.

19. Uso da composição de insulina nanoparticulada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 11 para a preparação de uma composição farmacêutica para terapia de insulina.

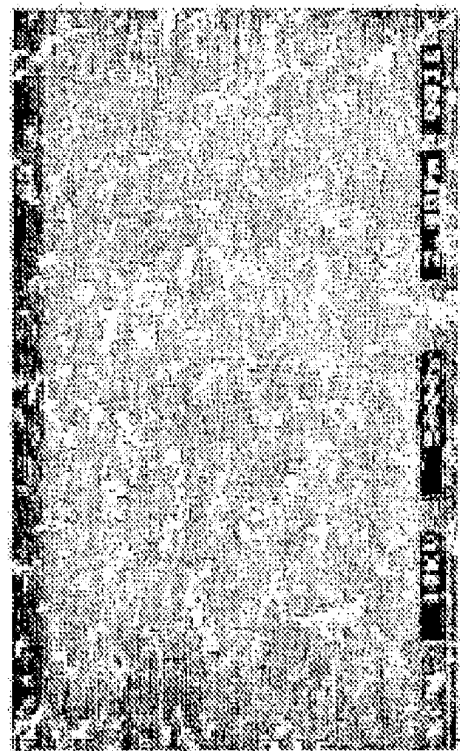
Lisboa, 27 de Março de 2007

FIGURA 1

Imagens SEM (aumento de 5000 x)

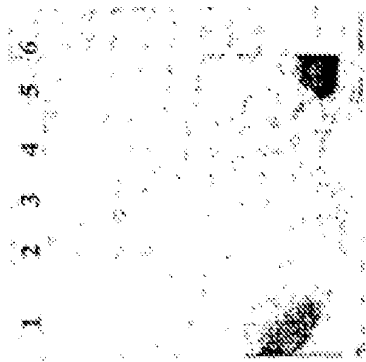


Antes da Moição



Depois da Moição

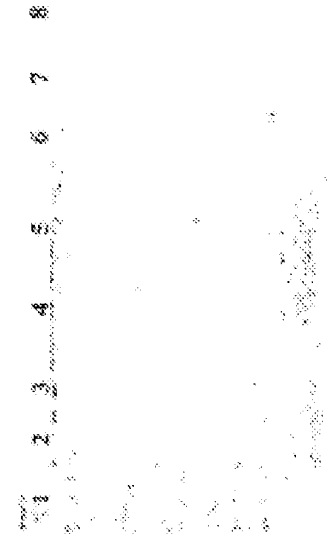
FIGURA 2



Gel de Redução 1

- Faixa 1: Insulina em bruto
- Faixa 2: Sobrenadante de nano-insulina a 1:50
- Faixa 3: Sobrenadante de nano-insulina a 1:10
- Faixa 4: Amostra de nano-insulina a 1:50
- Faixa 5: Amostra de nano-insulina a 1:10
- Faixa 6: Marcadores de elevado peso molecular

FIGURA 3



Gel de Redução 2

- Faixa 1: Marcadores de elevado peso molecular
- Faixa 2: Pelete de nano-insulina a 1:10
- Faixa 3: Pelete de nano-insulina a 1:50
- Faixa 4: Amostra de insulina em bruto
- Faixa 5: Amostra de insulina em bruto
- Faixa 6: Vazia
- Faixa 7: Vazia
- Faixa 8: Vazia

FIG. 4
PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DA NANO-INSULINA

Via da Injeção	Nano-insulina	Solução de insulina
INTRAMUSCULAR		
• AUC (uU/ml.h)	680 +/- 217	763 +/- 383
• Cmax (uU/ml)	569 +/- 136	664 +/- 175
• Tmax (h)	0.4 +/- 0.1	0.8 +/- 0.6
SUBCUTÂNEA		
• AUC (uU/ml.h)	645 +/- 191	487 +/- 89
• Cmax (uU/ml)	453 +/- 129	417 +/- 79
• Tmax (h)	0.5 +/- 0.2	0.3 +/- 0.1
INTRAPERITONEAL		
• AUC (uU/ml.h)	720 +/- 745	639 +/- 216
• Cmax (uU/ml)	655 +/- 799	390 +/- 113
• Tmax (h)	1.5 +/- 1.4	0.6 +/- 0.1

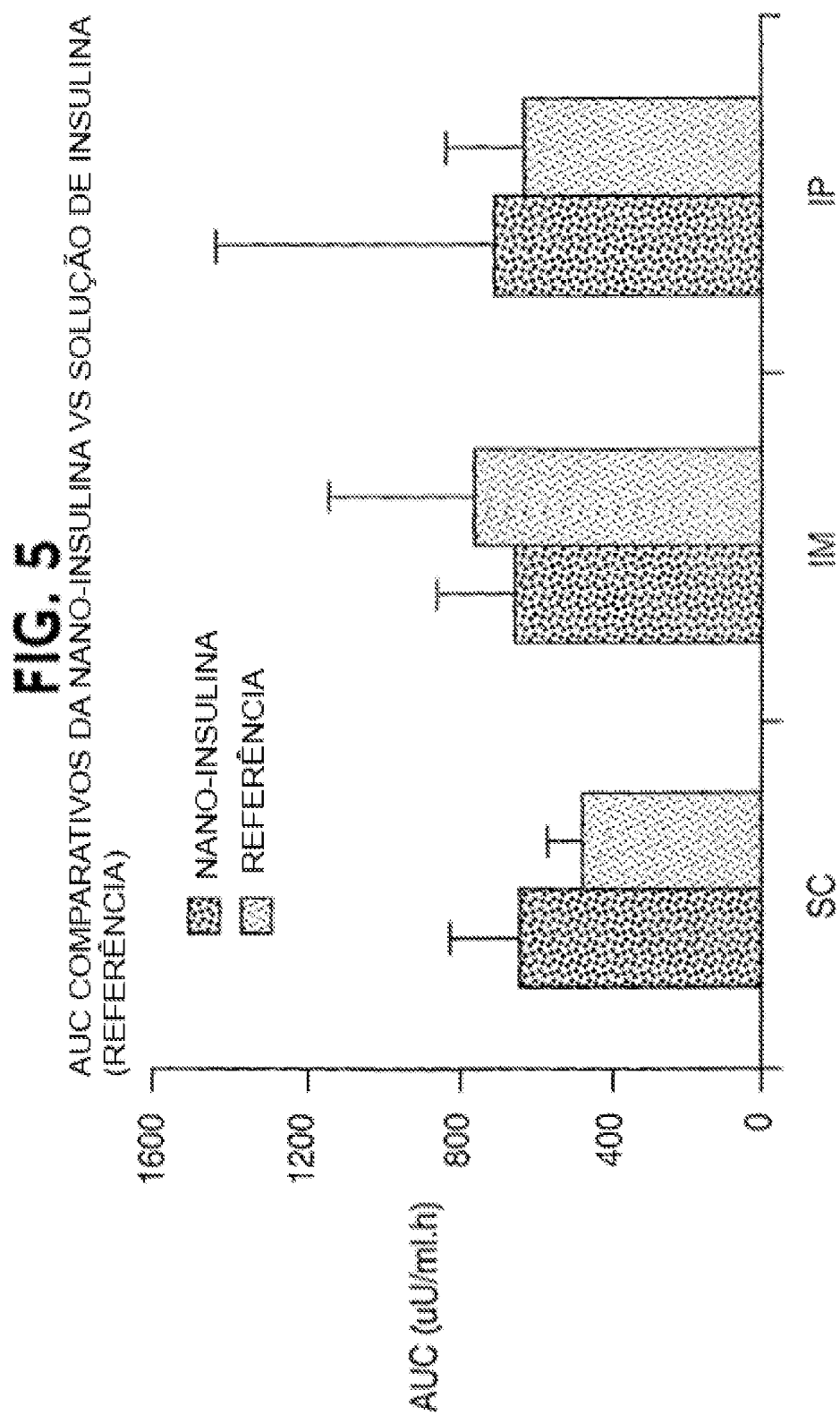


FIG. 6

NÍVEIS DE INSULINA NO SANGUE A SEGUIR À ADMINISTRAÇÃO DE NANO-INSULINA (■) VS SOLUÇÃO DE INSULINA (◆)

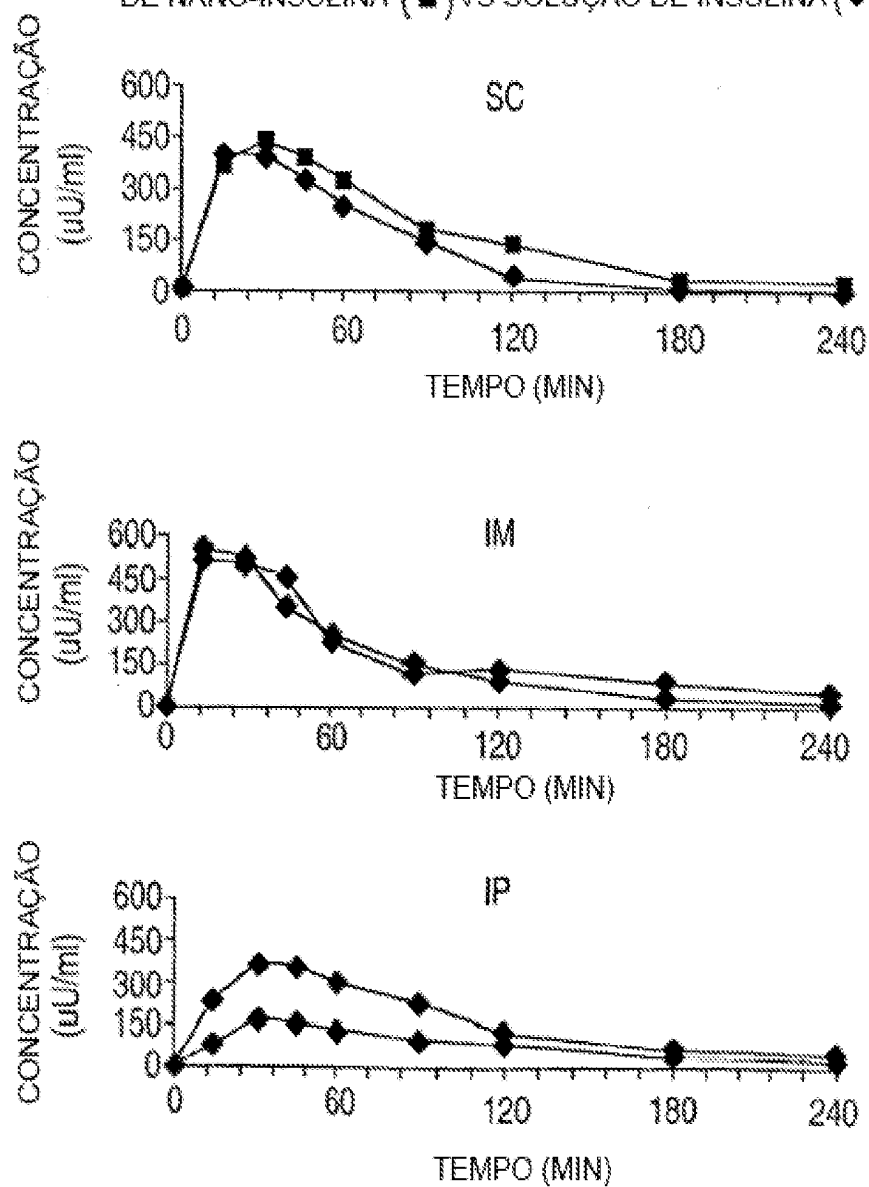


FIG. 7

NÍVEIS DE GLICOSE NO SANGUE A SEGUIR À ADMINISTRAÇÃO DE
NANO-INSULINA (■); SOLUÇÃO DE INSULINA (▲); CONTROLO-NENHUMA (◆)

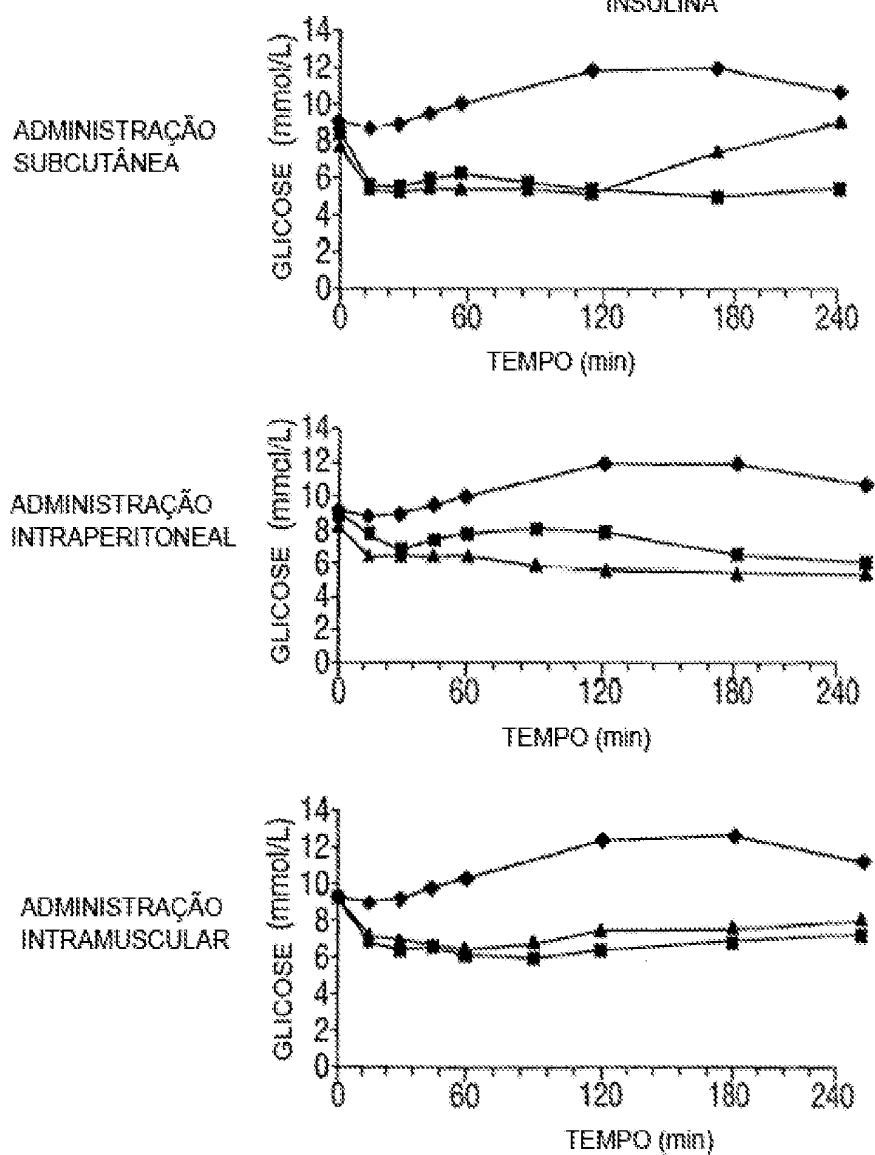
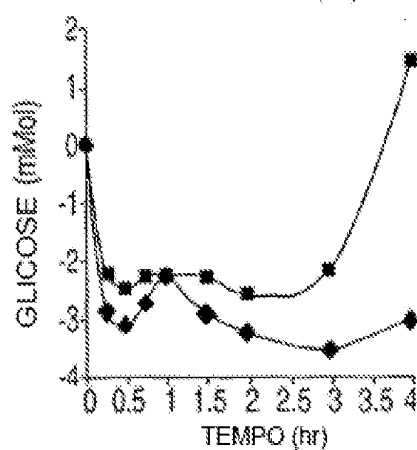


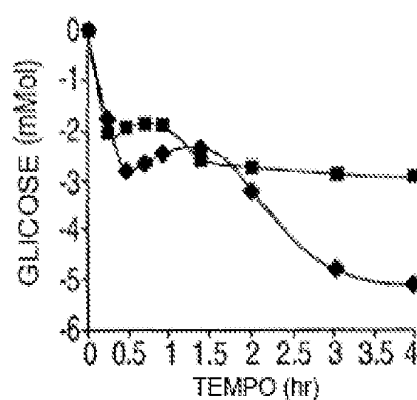
FIG. 8

ALTERAÇÃO NOS NÍVEIS DE GLICOSE NO SANGUE A SEGUIR À ADMINISTRAÇÃO DE NANO-INSULINA (◆) VS SOLUÇÃO DE INSULINA (■)

ADMINISTRAÇÃO
SUBCUTÂNEA



ADMINISTRAÇÃO
INTRAPERITONEAL



ADMINISTRAÇÃO
INTRAMUSCULAR

