



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0614489-6 A2



* B R P I 0 6 1 4 4 8 9 A 2 *

(22) Data de Depósito: 01/08/2006
(43) Data da Publicação: 29/03/2011
(RPI 2099)

(51) Int.Cl.:
A61K 38/28
A61P 3/10

(54) Título: MÉTODO PARA PRESERVAR A FUNÇÃO
DE CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA

(30) Prioridade Unionista: 01/08/2005 US 60/704.295

(73) Titular(es): MANNKIND CORPORATION

(72) Inventor(es): ANDERS HASAGER BOSS, DAVID C.
DIAMOND, WAYMAN WENDELL CHEATHAM

(74) Procurador(es): NELLIE ANNE DANIEL-SHORES

(86) Pedido Internacional: PCT US2006030014 de 01/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/016600 de 08/02/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRESERVAR A FUNÇÃO DE
CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA Métodos e composições
para preservar a função de células produtoras de insulina e para
aumentar o período de vida de células produtoras de insulina nos
pacientes não dependentes de insulina com distúrbio relacionado com
a insu- una, são fornecidos.

"MÉTODO PARA PRESERVAR A FUNÇÃO DE CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere aos métodos para diminuir a tensão pancreática e para avançar o período de vida de células produtoras de insulina em pacientes que têm distúrbios relacionados com a insulina no qual há liberação de insulina de fase precoce inadequada apesar da capacidade de produzir insulina.

10 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A diabete melito (a seguir, diabete) atualmente aflige pelo menos 200 milhões de pessoas mundialmente. Os dois principais sub-tipos de diabete incluem tipos 1 e 2. A diabete Tipo 1 é responsável por cerca de 10% dos 200 milhões de aflitos com diabete. A diabete Tipo 1 é causada por destruição auto-imune de β -células de segregação de insulina nas ilhotas pancreáticas de Langerhans. A diabete tipo 2 é responsável pelos 90% de indivíduos aflitos restantes, e a taxa de prevalência está aumentando. A diabete tipo 2 é freqüentemente, mas não sempre, associada com a obesidade, e embora previamente chamada de diabete de início em adulto ou começo tardio, agora se torna cada vez mais predominante em indivíduos mais jovens. A diabete tipo 2 é causada por uma combinação de resistência a insulina e secreção de insulina inadequada.

Papel Fisiológico da Insulina

Em um indivíduo normal não estressado, o nível de glicose basal tenderá a permanecer o mesmo a cada dia por

causa de um circuito de retroalimentação intrínseco. Qualquer tendência da concentração de glicose do plasma a aumentar é contrabalançada por um aumento na secreção de insulina e uma supressão da secreção de glucagon, que regula a produção de glicose hepática (gliconeogênese e liberação de armazenamentos de glicogênio) e captação de glicose de tecido para manter a concentração de glicose do plasma constante. Se o indivíduo ganha peso ou se torna resistente à insulina por qualquer outra razão, os níveis de glicose de sangue aumentarão, resultando na secreção de insulina aumentada para compensar quanto à resistência a insulina. Portanto os níveis de glicose e insulina são modulados para minimizar as alterações nestas concentrações ao mesmo tempo em que a produção relativamente normal e utilização de glicose são mantidas.

Cinco fases diferentes de secreção de insulina foram identificadas: (1) secreção de insulina basal onde a insulina é liberada no estado pós-absortivo; (2) a fase cefálica onde a secreção de insulina é ativada pela visão, cheiro e gosto de comida, antes de qualquer nutriente ser absorvido pelo intestino, mediado através da inervação pancreática; (3) secreção de insulina de primeira fase onde um estouro inicial de insulina é liberado dentro dos primeiros 5-10 minutos após a β -célula ser exposta a um aumento rápido na glicose, ou outros secretagogos; (4) secreção de insulina de segunda fase onde os níveis de insulina aumentam mais gradualmente e são relacionados com o grau e duração do estímulo e (5) uma terceira fase de secreção de insulina que foi so-

mente descrita *in vitro*. Durante estes estágios, a insulina é segregada, como muitos outros hormônios, de um modo pulsátil, resultando em concentrações oscilatórias no sangue. As oscilações incluem pulsos rápidos (ocorrendo a cada 8-15 minutos) sobrepostos em oscilações mais lentas (ocorrendo a cada 80-120 minutos) que estão relacionados com as flutuações em concentração de glicose de sangue.

A secreção de insulina pode ser induzida por outros substratos energéticos além de glicose (particularmente aminoácidos) como também por hormônios e drogas. De nota é que a resposta de insulina observada após a ingestão de comida não pode ser considerada somente pelo aumento em níveis de glicose de sangue, porém também depende de outros fatores tal como a presença de ácidos graxos livres e outros secretagogos na refeição, os hormônios gastrointestinais e fase cefálica neuralmente ativada.

Quando a um indivíduo for dado um desafio de glicose intravenoso, uma resposta de insulina bifásica é vista, a qual inclui um aumento rápido com um pico, um nadir de interpico e uma fase crescente mais lenta subsequente. Esta resposta bifásica é somente vista quando a concentração de glicose aumenta rapidamente, tal como após um bolo de glicose ou infusão de glicose. Um aumento mais lento na administração de glicose, o qual é visto sob condições fisiológicas, induz uma secreção de insulina mais gradualmente crescente sem a resposta bifásica bem definida vista com respeito à infusão de bolo de glicose.

A modelação das respostas de insulina da primeira

fase sob condições fisiológicas normais demonstrou que, após uma refeição, a concentração de glicose aumenta mais gradualmente (C_{max} alcançado em aproximadamente 20 minutos) do que visto com injeções de bolo intravenosas de glicose (C_{max} alcançado em aproximadamente 3-10 minutos).

As β -células pancreáticas saudáveis geram uma resposta precoce a uma exposição de glicose tipo refeição que rapidamente eleva a insulina do soro ambos na circulação portal e na periferia. Contrariamente, as β -células defeituosas, que têm uma resposta de insulina de primeira fase prejudicada, geram uma resposta lenta para a exposição de glicose tipo refeição.

Crescentemente, evidência indica que uma resposta de insulina relativamente rápida precoce seguinte à ingestão de glicose desempenha um papel crítico na manutenção de homeostase de glicose pós-prandial. Uma onda precoce na concentração de insulina pode limitar excursões de glicose iniciais, principalmente pela inibição de produção de glicose endógena. Então a indução de uma resposta de insulina rápida em um indivíduo diabético, é esperada produzir homeostase de glicose de sangue melhorada.

Em um indivíduo normal, uma refeição induz a secreção de um estouro de insulina, gerando uma elevação relativamente rápida na concentração de insulina de soro que então decai relativamente rapidamente (veja, Figura 1). Esta resposta de insulina de fase precoce é responsável pela interrupção, ou redução, de liberação de glicose do fígado. Os mecanismos homeostáticos então igualam a secreção de in-

sulina (e níveis de insulina de soro) à carga de glicose. Isto é observado como uma queda lenta de níveis de insulina de soro modestamente elevados de volta ao valor de referência e é cinético de segunda fase.

5 Diabete

Uma característica central de diabete é a função de β -célula prejudicada. Uma anormalidade que ocorre precoceamente na progressão da doença em ambas diabetes tipo 1 e 2 é a perda de resposta de insulina rápida induzida pelo alimento. Por conseguinte, o fígado continua produzindo glicose, que adiciona à glicose que é ingerida e absorvida dos componentes básicos de uma refeição.

A diabete tipo 2 tipicamente exibe uma resposta demorada aos aumentos nos níveis de glicose do sangue. Ao mesmo tempo em que os indivíduos normais normalmente começam a liberar insulina dentro de 2-3 minutos seguinte o consumo de comida, os diabéticos tipo 2 podem não segregar a insulina endógena até que glicose do sangue comece a subir, e então com cinéticos da segunda fase, que é uma elevação lenta para um platô prolongado na concentração. Como um resultado, a produção de glicose endógena não é interrompida e continua após o consumo, e o paciente experimenta hiperglicemia (níveis de glicose de sangue elevados). Outra característica da diabete tipo 2 é a ação de insulina prejudicada, chamada resistência à insulina. A resistência à insulina se manifesta como ambos uma taxa de eliminação de glicose máxima reduzida (GERmax) e uma concentração de insulina aumentada requerida para atingir GERmax. Desse modo, para manipu-

lar uma determinada carga de glicose mais insulina é requerida e tal concentração de insulina aumentada deve ser mantida durante um período mais prolongado de tempo. Por conseguinte, o paciente diabético também é exposto às concentrações de glicose elevadas durante períodos prolongados de tempo, que também exacerba resistência à insulina. Adicionalmente, os níveis de glicose de sangue elevados prolongados são por si só tóxicos para β -células.

A diabete tipo 1 ocorre como um resultado da destruição das células produtoras de insulina do pâncreas (β -células) pelo próprio sistema imune do corpo. Isto resulta no final das contas em uma deficiência de hormônio de insulina completa. Entretanto, durante o período imediatamente seguinte ao começo, a maioria dos pacientes passa por uma fase de "lua de mel". Ao mesmo tempo em que a liberação de insulina de fase precoce foi perdida, as β -células restantes ainda funcionam e produzem alguma insulina, que é liberada com cinéticos da segunda fase. Uma vez que mesmo que a função de β -célula parcial pode ser crítica ao evitar muitas das complicações a longo prazo de diabete, um foco de pesquisa de diabete atual é a preservação da função destas β -células residuais.

A diabete tipo 2 surge de diferentes e menos bem entendidas circunstâncias. A perda precoce de liberação de insulina de fase precoce, e liberação de glicose ininterrupta consequente, contribuem com as concentrações de glicose elevadas. Os níveis de glicose elevados promovem resistência à insulina, e a resistência à insulina gera elevações

prolongadas de concentração de glicose de soro. Esta situação pode levar a um ciclo de auto-ampliação no qual concentrações sempre maiores de insulina são menos efetivas no controle de níveis de glicose do sangue. Além disso, como notado acima, os níveis de glicose elevados são tóxicos às β -células, reduzindo o número de β -células funcionais. Os defeitos genéticos que prejudicam o crescimento ou manutenção da microvasculatura que nutre as ilhotas também podem desempenhar um papel na sua deterioração (Glee, S. M., e outros, *Nature Genetics* 38:688-693, 2006). Eventualmente, o pâncreas é sobrepujado, e os indivíduos progridem para desenvolver deficiência de insulina similar às pessoas com diabetes tipo 1.

Terapia

A terapia de insulina é o tratamento padrão para diabetes tipo 1, uma vez que poucos pacientes são identificados na fase de lua de mel. Ao mesmo tempo em que a diabetes tipo 2 incipiente pode ser tratada com dieta e exercícios, a maioria dos diabéticos tipo 2 de estágio precoce são atualmente tratados com agentes antidiabéticos orais, porém com sucesso limitado. Os pacientes geralmente mudam para a terapia de insulina quando a doença progride. Estes tratamentos, entretanto, não representam uma cura.

As modalidades de terapia de insulina atuais podem completar ou substituir insulina endogenamente produzida para fornecer perfis basais e tipo de segunda fase, porém não imitam os cinéticos da primeira fase (veja Figura 2). Adicionalmente, a terapia de insulina convencional envolve fre-

quentemente somente uma ou duas injeções diárias de insulina. Entretanto, terapia mais intensiva tal como três ou mais administrações um dia, fornecendo controle melhor de níveis de glicose do sangue, é claramente benéfica (veja, 5 por exemplo, Nathan, D. M. e outros, *N Engl J Med* 353:2643-53, 2005), porém muitos pacientes são relutantes ao aceitar as injeções adicionais.

Até recentemente, a injeção subcutânea (SC) foi a única rotina de liberação de insulina a pacientes com ambas 10 diabetes tipo 1 e tipo 2. Entretanto, a administração de insulina SC não leva a farmacodinâmicos ideais para a insulina administrada. A absorção no sangue (até mesmo com análogos de insulina de ação rápida) não imita o padrão de secreção de insulina fisiológico prandial de uma elevação rápida 15 na concentração de insulina de soro. As injeções subcutâneas também são raramente ideais, ao fornecer insulina aos diabéticos tipo 2 e podem de fato piorar a ação de insulina por causa do começo demorado, variável e superficial de ação. Foi mostrado, entretanto, que se insulina for administrada intravenosamente com uma refeição, os diabéticos 20 tipo 2 de estágio precoce experimentam a interrupção da liberação de glicose hepática e exibe controle de glicose fisiológico aumentado. Além disso, seus níveis de ácido graxo livre caem a uma taxa mais rápida do que sem terapia de insulina. Ao mesmo tempo em que possivelmente efetivo no tratamento de diabete tipo 2, a administração intravenosa de insulina, não é uma solução razoável, uma vez que não é segura ou possível para pacientes intravenosamente administrar 25

insulina a toda refeição.

Apesar da melhora no progresso na administração de diabete, a diabete continua sendo uma condição crônica incapacitante, que se deixada sem tratamento, pode ser associada com complicações de órgão de estágio final e morte prematura. Portanto, muitos investigadores têm voltado os olhos para abordagens de transplante esperando que isto alivie a necessidade de injeções de insulina crônicas, monitoramento de glicose do sangue freqüente, e atenção rígida a dieta e exercício. Avanços recentes em terapias com base em gene e célula forneceram esperança para encontrar uma cura para diabete. Estes incluem esforços para regenerar as β -células existentes por replicação ou neogênese, manipulando as células tronco embrionárias para diferenciar em β -células, e utilizando células precursoras pancreáticas ou do fígado para servir como uma fonte de insulina. Trabalho recente produziu evidência de produção de insulina bem sucedida de células do fígado geneticamente construídas transplantadas do próprio fígado do paciente diabético. A abordagem mais avançada para terapia celular para diabete, tendo alcançado aplicação clínica, é o transplante de β -células. Em pacientes de transplante, há evidência de independência de insulina em alguns destes indivíduos tratados. A transplantação de β -célula é menos invasiva do que a transplantação de órgão inteiro uma vez que somente porções endócrinas do pâncreas (as ilhotas) são transplantadas por um cateter percutâneo. Os resultados nesta área de estudo foram desencorajando até que avanços feitos por Dr. James Shapiro de Edmon-

ton, Canadá (Shapiro e outros, *Diabetes*, julho de 2002, 5:2148). Dr. Shapiro desenvolveu O Protocolo de Edmonton. O Protocolo de Edmonton utiliza um regime anti-rejeição livre de corticosteróide e a transplantação de um número suficiente de ilhotas (requerendo cerca de 2-4 órgãos doadores por transplante). O grupo reportou que 7 pacientes consecutivos com diabete Tipo 1 foram tornados independentes de insulina durante 1 ano seguinte o transplante de ilhota. Hirschberg B e outros, *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 2003; 19: 175-178). Entretanto, após 3 anos, as ilhotas transplantadas falharam como indicado por um retorno a terapia de insulina.

A premissa atrás da transplantação de ilhota é processar o pâncreas do doador de órgão para isolar os 5% da glândula responsável pela secreção de hormônio endócrina (as Ilhotas pancreáticas de Langerhans, ou as β -células destas) longe dos restantes 95% da glândula responsável por suas funções exócrinas (secreção de enzimas digestivas). Uma vez isoladas, as ilhotas produtoras de insulina são infundidas por um tubo fino colocado na veia portal hepática, que é a veia principal que transporta sangue dos intestinos para o fígado. Uma vez infundidas, a corrente sanguínea transporta as ilhotas no fígado onde elas se hospedam e começam a fabricar insulina para regular o açúcar do sangue. Os procedimentos atuais utilizam cerca de 2-4 doadores de pâncreas (de cadáveres) e um regime de terapia imunossupressor livre de corticosteróide para prevenir a rejeição de transplante.

Um problema com o procedimento de transplante de

ilhota, é a longevidade das células ilhotas. Os pacientes são independentes de insulina durante tanto quanto 2 anos.

Depois disso, eles geralmente voltam a terapia de insulina, embora em dosagem(s) mais baixa do que antes do transplante.

5 A razão para o fracasso da ilhota não está clara, porém foi sugerido que as células ilhotas ficam pressionadas a e função total fica comprometida.

O controle glicêmico obtido em recipientes de transplante de ilhota é normalmente superior àquele obtido 10 com o tratamento de insulina, e dieta e exercícios. Contanto que a função de ilhota persista, houve poucos, se algum, relatos de episódios de hipoglicemias severa. Entretanto, os pacientes não recuperam as respostas de hormônio contrareguladoras 'normais' para hipoglicemias. Somente um pequeno 15 número de pacientes obteve níveis de glicose de sangue normal de acordo com os critérios da American Diabetes Association. Ao provocar uma resposta de insulina de primeira fase aguda por infusão de glicose intravenosa, as ilhotas de pacientes prosperamente transplantados mostram um pico de insulina notadamente diminuído comparado a indivíduos normais.

20 Desse modo, diabéticos tipo 1 na fase de "lua de mel" da doença, diabéticos tipo 2 (com função de β -célula subsistente), e os recipientes de transplante de β -célula apesar de etiologias discrepantes, todos têm o seguinte déficit similar na função pancreática: liberação de insulina 25 de fase precoce inadequada e liberação de segunda fase de efetividade diminuída. É um objeto da presente invenção compensar a falta da liberação de fase precoce fisiológica e

desse modo prolongar ou preserva a função de β -célula.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os métodos e composições úteis para diminuir a tensão pancreática, e promover o período de vida de células produtoras de insulina em diabéticos tipo 1 na fase de lua de mel, diabéticos tipo 2 precoces, e pacientes de transplante de ilhota, são fornecidos. As modalidades do método incluem administração de insulina de uma maneira que imite a resposta de insulina de fase precoce relacionada com a refeição, empregando uma dose suficiente para reduzir níveis de soro de pró-insulina e/ou para controlar as excursões de glicose. Ao imitar os cinéticos de fase precoce, os níveis de insulina de soro pico podem ser alcançados dentro de cerca de 12 a em cerca de 30 minutos de administração. Os níveis de insulina de soro também podem voltar ao valor de referência dentro de cerca de duas ou três horas de administração. Em uma modalidade, a insulina é administrada a um paciente em necessidade de terapia de insulina na hora da refeição, isto é, dentro de cerca de 10 minutos, preferivelmente 5 minutos antes, ou 30, 25, 15, ou 10 minutos após o início de uma refeição. (os tempos mais curtos após sendo preferidos para pacientes com esvaziamento gástrico normal, tempos mais longos após sendo apropriados para pacientes com esvaziamento gástrico demorado). Em uma modalidade preferida, uma liberação pulmonar é obtida por inalação de uma formulação em pó seca de um complexo de dicetopiperazina de fumarila com insulina facilitada pelo uso de um inalador de dose de unidade. O termo "dicetopiperazina de fumarila"

(FDKP) como empregado aqui também inclui os sais destes. As dosagens preferidas estão na faixa de cerca de 15 a 90 IU, ou maiores do que 24 IU de insulina complexa com dicetopiperazina de fumarila, ou o equivalente.

5 As modalidades do método de aumentar o período de vida de células produtoras de insulina incluem aquelas onde a tensão pancreática é medida como uma perda da resposta de insulina de fase precoce ou primeira fase fisiológica [ou endógena]; onde a tensão pancreática é medida como um aumento nos níveis de pró-insulina de soro sem terapia de insulina de suplemento; onde a tensão oxidativa devido às excursões de glicose agudas é medida (por exemplo, como a taxa de secreção de 24 horas de 8-iso prostaglandina $F_{2\alpha}$ livre (8-isoPGF $_{2\alpha}$)) como um substituto para a tensão pancreática; e 10 15 onde a tensão pancreática é determinada por deterioração na capacidade de controlar os níveis de glicose no sangue na ausência de outro tratamento, redução na capacidade secretora (por exemplo, C-peptídeo estimulado), redução na sensibilidade de insulina (por exemplo, HOMA-S: Homeostasis Model 20 25 Assessment of Insulin Sensitivity). A longevidade de células produtoras de insulina também pode ser avaliada por medições da massa de β -célula ou sensibilidade a apoptose.

Outro aspecto da presente invenção inclui uma composição útil para a preservação de células produtoras de insulina. A composição compreende uma formulação de insulina 25 de liberação controlada.

Ainda outro aspecto da presente invenção inclui uma composição útil para a preservação de células produtoras

de insulina. A composição compreende uma preparação de começo demorado incluindo uma formulação de insulina.

Em uma modalidade da presente invenção, um método é fornecido para preservar a função de células produtoras de insulina em um paciente não dependente de insulina tendo um distúrbio relacionado com insulina, compreendendo: fornecer o referido paciente não dependente de insulina tendo um distúrbio relacionado com a insulina, com uma dose de insulina; administrar a referida dose de insulina ao referido paciente; onde a referida dose de insulina imita uma resposta de insulina de fase precoce relacionada com a refeição fisiológica e preserva a função das referidas células produtoras de insulina no referido paciente.

Em outra modalidade, o paciente não dependente de insulina que tem um distúrbio relacionado com insulina é um diabético tipo 1 na fase de lua de mel. Em outra modalidade, o paciente não dependente de insulina que tem um distúrbio relacionado com a insulina é um recipiente de transplante de célula produtora de insulina. Em outra modalidade, o paciente não dependente de insulina que tem um distúrbio relacionado com a insulina é um diabético tipo 2.

Em outra modalidade da presente invenção, a dose de insulina é administrada oralmente. Em outra modalidade, a dose de insulina é inalada. Em ainda outra modalidade, a dose de insulina compreende uma formulação de pó seco.

Em uma modalidade da presente invenção, a dose de insulina compreende uma dose suficiente para reduzir os níveis de soro de pró-insulina. Em outra modalidade, a dose

de insulina compreende uma dose suficiente para controlar as excursões de glicose. Em outra modalidade, a insulina alcança níveis de soro máximos dentro de aproximadamente 15 minutos de administração. Em outra modalidade, o nível de insulina de soro máximo é pelo menos 60 mU/L. Em outra modalidade, a dose de insulina é suficiente para controlar os níveis de glicose do sangue. Em ainda outra modalidade, a dose de insulina é suficiente para reduzir a liberação de glicose do fígado.

Em outra modalidade da presente invenção, a referida dose de insulina compreende uma dicetopiperazina de fumarila (FDKP) associada com a insulina. Em outra modalidade, a dose de insulina está dentro da faixa equivalente à cerca de 15 IU a cerca de 90 IU de insulina de FDKP.

Em uma modalidade da presente invenção, um método é fornecido para diminuir a tensão pancreática pós-prandial em um paciente não dependente de insulina que tem um distúrbio relacionado com a insulina que compreende: fornecer o paciente não dependente de insulina tendo um distúrbio relacionado com a insulina a ser tratado, administrar uma dose de insulina ao paciente suficiente para controlar o nível de glicose do sangue e reduzir os níveis de soro de pró-insulina; e onde a dose de insulina imita a resposta de insulina de fase precoce relacionada com a refeição fisiológica, e a tensão pancreática é atenuada.

Em outra modalidade da presente invenção, um método é fornecido para aumentar a longevidade de um transplante de célula produtora de insulina em um paciente, compreenden-

do: fornecer um recipiente de transplante de célula produtora de insulina a ser tratado, administrar uma dose de insulina ao paciente suficiente para controlar os níveis de glicose do sangue e reduzir os níveis de soro de pró-insulina; 5 e onde a dose de insulina imita a resposta de insulina de fase precoce relacionada com a refeição fisiológica, e a tensão pancreática é atenuada e a longevidade das células produtoras de insulina é obtida.

Em uma modalidade da presente invenção, um método 10 é fornecido para preservar a função de células produtoras de insulina em um paciente, compreendendo: fornecer um paciente não dependente de insulina que tem um distúrbio relacionado com a insulina, uma dose de insulina e um medicamento imunossupressor; administrar a dose de insulina ao paciente onde a dose de insulina imita a resposta de insulina de fase 15 precoce relacionada com a refeição fisiológica; e administrar o medicamento imunossupressor ao paciente junto com a dose de insulina para retardar uma resposta auto-imune.

Em uma modalidade da presente invenção, uma composição útil para a preservação de células produtoras de insulina em um paciente não dependente de insulina que tem um distúrbio relacionado com a insulina, é fornecida compreendendo uma formulação de insulina de liberação controlada.

Em outra modalidade da presente invenção, uma composição útil para a preservação de células produtora de insulinas em um paciente não dependente de insulina que tem um distúrbio relacionado com a insulina é fornecida compreendendo uma preparação de início retardado incluindo uma for-

mulação de insulina.

Em uma modalidade da presente invenção, um método é fornecido para preservar a função de células produtora de insulinas em um paciente não dependente de insulina que tem 5 um distúrbio relacionado com a insulina, compreendendo: fornecer um paciente não dependente de insulina que tem um distúrbio relacionado com a insulina, onde o referido paciente é um diabético tipo 1 na fase de lua de mel ou um recipiente de transplante de célula produtora de insulina, e uma dose 10 de insulina; administrar a referida dose de insulina ao referido paciente; e onde a referida dose de insulina imita uma resposta de insulina de fase precoce relacionada com a refeição fisiológica e preserva a função das referidas células produtoras de insulinas no referido paciente.

15 Em outra modalidade da presente invenção, um método é fornecido para preservar a função de células produtoras de insulinas em um paciente tendo um distúrbio relacionado com insulina, compreendendo: fornecer um paciente tendo um distúrbio relacionado com a insulina, onde o paciente não 20 foi tratado com uma composição de insulina exceto insulina basal, com uma dose de insulina; administrar a dose de insulina ao paciente; e onde a dose de insulina imita uma resposta de insulina de fase precoce relacionada com a refeição fisiológica e preserva a função das células produtoras de 25 insulinas no paciente.

Em outra modalidade da presente invenção, um método é fornecido para preservar a função de células produtoras de insulinas em um paciente tendo um distúrbio relacionado

com a insulina, compreendendo: fornecer um paciente tendo um distúrbio relacionado com a insulina, onde o paciente perdeu a liberação de insulina de fase precoce e teve um nível de hemoglobina glicada de soro (HbA1c) menor do que 8%, com uma dose de insulina, administrar a dose de insulina ao paciente, e onde a dose de insulina imita uma resposta de insulina de fase precoce relacionada com a refeição fisiológica e preserva a função de células produtoras de insulina no paciente. Em outra modalidade, a dose de insulina é administrada com qualquer refeição que contém mais do que 15 g de carboidrato. Em outra modalidade, o paciente não está em um regime de insulina prandial. Em outra modalidade, o paciente tem níveis de pró-insulina de soro dentro de uma faixa normal. Em outra modalidade, o paciente elevou a amplidão média de excursões de glicose. Em ainda outra modalidade, o paciente tem evidência de tensão oxidativa elevada e a tensão oxidativa é medida por níveis de 8-iso PGF(2a). Em outra modalidade, o nível de soro HbA1c é menor do que 7%. Em ainda outra modalidade, o nível de HbA1c de soro é menor do que 6,5%, ou menor do que 6%.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1 descreve a medição de cinéticos de liberação de insulina de primeira fase seguindo a estimulação artificial através de infusão de glicose de bolo.

Figura 2 descreve a concentração de insulina de soro depois de administração de insulina humana regular subcutâneo (SC) ou insulina de atuação rápida SC (NovologTM). NovologTM é uma marca registrada de Novo Nordisk Pharmaceu-

ticals, Bagsvaerd, Dinamarca.

Figura 3 descreve a taxa de eliminação de glicose após a administração de TECHNOSPHERE®/Insulina em humanos de acordo com os ensinamentos da presente invenção.

5 Figura 4 descreve as mudanças em níveis de pró-insulina após a administração de TECHNOSPHERE®/Insulina em humanos de acordo com os ensinamentos da presente invenção.

DEFINIÇÃO DE TERMOS

Antes de apresentar a invenção, pode ser útil fornecer um entendimento de certos termos que serão empregados 10 a seguir:

Pó seco: Como empregado aqui "pó seco" se refere a uma composição de particulado que não é suspensa ou dissolvida em um propelente, veículo, ou outro líquido. Não é 15 pretendido indicar uma ausência completa de todas as moléculas de água.

Fase precoce: Como empregado aqui "fase precoce" se refere à elevação na concentração de insulina do sangue induzida em resposta a uma refeição. Esta elevação precoce 20 na insulina em resposta a uma refeição às vezes é chamada de primeira fase.

Excursão: Como empregado aqui, "excursão" se refere às concentrações de glicose do sangue que se incluem ou acima ou abaixo de um valor de referência de pré-refeição ou 25 outro ponto de partida. As excursões são geralmente expressadas como a área abaixo da curva (AUC) de um plote de glicose de sangue com o passar do tempo. AUC pode ser expresso em uma variedade de modos. Em alguns casos haverá tanto uma

queda abaixo de, quanto uma elevação acima do valor de referência criando uma área positiva e negativa. Alguns cálculos subtrairão o AUC negativo do positivo, ao mesmo tempo em que outros somarão seus valores absolutos. Os AUCs positivos e negativos também podem ser considerados separadamente. Avaliações estatísticas mais sofisticadas também podem ser empregadas. Em alguns casos pode também se referir às concentrações de glicose de sangue que sobem ou caem fora de uma faixa normal. Uma concentração de glicose do sangue normal 10 normalmente está entre 70 e 110 mg/dL de um indivíduo em jejum, menos do que 120 mg/dL duas horas depois de comer uma refeição, e menos do que 180 mg/dL depois de comer.

Primeira Fase: Como empregado aqui, "primeira fase" se refere à elevação nos níveis de insulina como induzido por uma injeção intravenosa de bolo de glicose. Uma liberação de insulina de primeira-fase gera uma elevação na concentração de insulina de sangue que é uma elevação rápido que então cai relativamente depressa. A liberação de insulina de primeira fase também é chamada de fase precoce.

Taxa de eliminação de glicose: Como empregado aqui, "taxa de eliminação de glicose" é a taxa na qual a glicose desaparece do sangue e é determinada pela quantidade de infusão de glicose exigida para manter glicose do sangue estável, freqüentemente cerca de 120 mg/dL durante o período 25 de estudo. Esta taxa de eliminação de glicose é igual à taxa de infusão de glicose, abreviada como GIR.

Fase de lua de mel: Como empregado aqui, a "fase de lua de mel" de diabetes tipo 1 se refere às fases precoces

da doença onde a liberação de insulina de fase precoce foi perdida e as β -células restantes ainda funcionam e produzem alguma insulina, que é liberada com cinéticos da segunda fase.

5 Hiperglicemia: Como empregado aqui, "hiperglicemia" é uma concentração de glicose do sangue em jejum mais elevada do que a normal, normalmente 126 mg/dL ou mais elevada. Em alguns estudos, episódios hiperglicêmicos foram definidos como concentrações de glicose do sangue que excedem 10 280 mg/dL (15,6 mM).

Hipoglicemia: Como empregado aqui, "hipoglicemia" é uma concentração de glicose de sangue mais baixa do que a normal, normalmente menos do que 63 mg/dL (3,5 mM). A hipoglicemia clinicamente relevante é definida como a concentração de glicose do sangue abaixo de 63 mg/dL ou causando sintomas de pacientes tal como hipotonia, rubor e fraqueza que são sintomas reconhecidos de hipoglicemia e que desaparecem com o influxo calórico apropriado. A hipoglicemia grave é definida como um episódio hipoglicêmico que exigiu injeções 20 de glucagon, infusões de glicose, ou ajuda por outro grupo.

Em proximidade: Como empregado aqui, "em proximidade", quando empregado em relação a uma refeição, se refere a um período próximo do tempo do começo de uma refeição.

25 Composição de insulina: Como empregado aqui, "composição de insulina" se refere a qualquer forma de insulina adequada para administração a um mamífero e inclui insulina isolada de mamíferos, insulina recombinante, insulina associada com outras moléculas e também inclui insulina adminis-

trada por qualquer rotina incluindo pulmonar, subcutânea, nasal, oral, bucal e sublingual. As composições de insulina podem ser formuladas como pó seco ou soluções aquosas para inalação; soluções aquosas para administração subcutânea, 5 sublingual, bucal, nasal ou oral e formas de dosagem sólida para administração oral e sublingual.

Distúrbio relacionado com a insulina : Como empregado aqui, "distúrbios relacionados com a insulina" se refere aos distúrbios que envolvem a produção, regulamento, 10 metabolismo, e ação de insulina em um mamífero. Os distúrbios relacionados com a insulina incluem, porém não estão limitados a, pré-diabete, diabete melito tipo 1, diabete melito tipo 2, hipoglicemia, hiperglicemia, resistência à insulina, deficiência orgânica secretora, perda da função de β -célula 15 pancreática, e perda de β -células pancreáticas.

Pacientes não dependentes insulina que têm distúrbios relacionados com insulina: Como empregado aqui, "pacientes não dependentes de insulina tendo distúrbios relacionados com insulina" se refere aos pacientes com distúrbios 20 para os quais a terapia com insulina fornecida exogenousamente, não é o tratamento padrão atual em diagnose. Os pacientes não dependentes de insulina que têm distúrbios relacionados com insulina que não são tratados com insulina exogenousamente administrada incluem diabete precoce tipo 2, diabete tipo 1 25 na fase de lua de mel, pré-diabete e recipientes de transplante de célula produtora de insulina.

Resistência à insulina: Como empregado aqui, o termo "resistência à insulina" se refere à incapacidade das

células do paciente de usar insulina corretamente. O pâncreas responde a este problema ao nível celular produzindo mais insulina. Eventualmente, o pâncreas não pode acompanhar a necessidade do corpo de insulina, e glicose em excesso se forma na corrente sanguínea. Os pacientes com resistência à insulina têm freqüentemente níveis elevados de glicose do sangue e níveis elevados de insulina que circula ao mesmo tempo no seu sangue.

10 Micropartículas: Como empregado aqui, o termo "micropartículas" inclui microcápsulas que têm uma casca externa composta de uma dicetopiperazina sozinha ou uma combinação de um dicetopiperazina e uma ou mais drogas. Também inclui microesferas que contêm droga dispersada ao longo da esfera; partículas de forma irregular; e partículas nas quais a droga é coberta na superfície(s) da partícula ou enche as lacunas dela.

15 Periprandial: Como empregado aqui, "periprandial" se refere a um período de tempo começando logo antes e terminando logo após a ingestão de uma refeição ou lanche.

20 Pós-prandial: Como empregado aqui, "pós-prandial" se refere a um período de tempo depois da ingestão de uma refeição ou lanche. Como empregado aqui, pós-prandial recente se refere a um período de tempo de 3, 4, ou mais horas após a ingestão de uma refeição ou lanche.

25 Potenciação: Geralmente, potenciação se refere a uma condição ou ação que aumenta a efetividade ou atividade de algum agente acima do nível que o agente de outro modo atingiria. Similarmente pode se referir diretamente ao efei-

to ou atividade aumentada. Como empregado aqui, "potenciação" se refere particularmente à capacidade de concentrações elevadas de insulina do sangue de impulsionar a efetividade de níveis de insulina subseqüentes para, por exemplo, aumentar a taxa de eliminação de glicose.

5 Prandial: Como empregado aqui, "prandial" se refere a uma refeição ou um lanche.

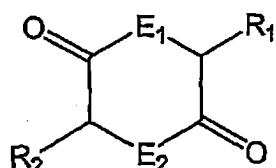
Pré-diabético: Como empregado aqui, o termo "pré-diabético" se refere a um paciente com glicose de jejum pre-judicada ou tolerância de glicose prejudicada, que está com 10 um nível de glicose do sangue em jejum entre 100 mg/dL (5,5 mmol/L) e 126 mg/dL (7,0 mmol/L), ou um nível de glicose do sangue pós-prandial de 2 horas entre 146 mg/dL (7,9 mmol/L) e 200 mg/dL (11,1 mmol/L).

15 Segunda Fase: Como empregado aqui, "segunda fase" se refere à queda lenta de níveis de insulina do sangue modestamente elevados de volta ao valor de referência após a primeira fase ter passado. Segunda fase também pode se referir à liberação de não reforço de insulina em resposta aos 20 níveis de glicose do sangue elevados.

TECHNOSPHERE®/Insulina: Como empregado aqui, "TECHNOSPHERE®/Insulina" ou "T1" se refere a uma composição de insulina que compreende insulina humana regular e micropartículas de TECHNOSPHERE®, um sistema de liberação de droga. As micropartículas de TECHNOSPHERE® compreendem uma dicetopiperazina, especificamente 3,6-di(fumaril-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina (dicetopiperazina de fumaryl, FDKP). Especificamente, TECHNOSPHERE®/Insulina compre-

ende uma composição de FDKP/insulina humana.

Como empregado aqui, "dicetopiperazina" ou "DKP" inclui dicetopiperazinas e sais, derivados, análogos e modificações que se incluem dentro do escopo da Fórmula 1 geral, 5 onde os átomos de anel E₁ e E₂ nas posições 1 e 4 são O ou N e pelo menos uma das cadeias laterais R₁ e R₂ localizadas respectivamente nas posições 3 e 6 contem um grupo de ácido carboxílico (carboxilato). Os compostos de acordo com a Fórmula 1 incluem, sem limitação, dicetopiperazinas, dicetomorfolinas e dicetodioxanos e seus análogos de substituição. 10



FÓRMULA 1

As dicetopiperazinas, além de fabricar micropartículas aerodinamicamente adequadas, também facilitam o transporte através das camadas de célula, também acelerando a absorção na circulação. As dicetopiperazinas podem ser formadas em partículas que incorporam uma droga ou partículas sobre as quais uma droga pode ser adsorvida. A combinação de uma droga e uma dicetopiperazina pode conceder estabilidade 15 de droga melhorada. Estas partículas podem ser administradas por várias rotinas de administração. Como pó seco estas partículas podem ser liberadas através da inalação para áreas específicas do sistema respiratório, dependendo do tamanho da partícula. Adicionalmente, as partículas podem ser 20 feitas pequenas o bastante para incorporação em uma forma de dosagem de suspensão intravenosa. A liberação oral também é 25

possível com as partículas incorporadas em uma suspensão, em comprimidos ou cápsulas. As dicetopiperazinas também podem facilitar a absorção de uma droga associada.

Em outra modalidade da presente invenção, a DKP é um derivado de 3,6-di(4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina, que pode ser formada por condensação (térmica) da lisina de aminoácido. Os derivados exemplares incluem 3,6-di(sucinil-4-aminobutil)-, 3,6-di(maleil-4-aminobutil)-, 3,6-di(glutaril-4-aminobutil)-, 3,6-di(malonil-4-aminobutil)-, 3,6-di(oxalil-4-aminobutil)-, e 3,6-di(fumaril-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina. O uso de DKPs para liberação de droga é conhecido na técnica (veja, por exemplo, as Patentes U.S. Nos. 5.352.461, 5.503.852, 6.071.497, e 6.331.318" cada das quais está aqui incorporada por referência para que todas ensinem relativo às dicetopiperazinas e liberação de droga mediada por dicetopiperazina). O uso de sais de DKP é descrito no Pedido de Patente U.S. de correspondência No. 11/210.710, depositado em 23 de agosto de 2005 que está por meio desta incorporado por referência para que todas ensinem relativo aos sais de dicetopiperazina. A liberação de droga pulmonar que usa micropartículas de DKP é descrita na Patente U.S. No. 6.428.771, que está por este meio desta incorporada por referência em sua totalidade.

TECHNOSPHERE®/Placebo: Como empregado aqui, "TECHNOSPHERE®/Placebo" se refere às partículas de TECHNOSPHERE® que não são associadas com a insulina.

Unidades de medida: As dosagens de insulina subcutâneas e intravenosas são expressas em IU que é definido por

uma medida biológica padronizada. As quantidades de insulina formuladas com dicetopiperazina de fumarila também são reportadas em IU uma vez que é medida de insulina no sangue. As dosagens de TECHNOSPHERE®/Insulina são expressas em unidades arbitrárias (U) que são numericamente equivalentes à 5 quantidade de insulina formulada na dosagem.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Um aspecto da invenção é preservar a função da β -célula e desse modo parar ou atenuar a progressão de doença 10 diabética. A função da β -célula é preservada reduzindo-se a tensão causada pela demanda excessiva para insulina que se desenvolve, através de vários mecanismos, em diabete tipo 1 e 2 e seguinte os procedimentos de transplante de β -célula. A função pode também ser preservada diminuindo-se a toxicidade de glicose reduzindo-se a exposição a concentrações de 15 glicose elevadas como descrito aqui. A demanda de insulina excessiva, controle fraco de níveis de glicose do sangue, e suas tensões conseqüentes nas β -células, são associados com perda da função e morte de β -célula. A lesão microvascular 20 no pâncreas devido à tensão oxidativa resultante de flutuações agudas em concentrações de glicose do sangue pode também desempenhar um papel. Como descrito aqui, a demanda bi-ossintética é reduzida e tensão é aliviada por administração 25 não intravenosa de uma preparação de insulina que imita liberação de insulina da fase precoce de refeição fisiológica.

Como empregado aqui, as células produtoras de insulina se referem as β -células das ilhotas de Langerhans, células do fígado ou células precursoras pancreáticas gene-

ticamente construídas para produzir insulina, células tronco adulto ou embrionárias diferenciadas em β -células, células tratadas com uma terapia de gene de insulina, ou qualquer tipo de célula capaz de produzir e segregar insulina. As 5 fontes potenciais de β -células para transplante ou regeneração no pâncreas foram recentemente revistas (Bonner-Weir, S. & Weir, G. C, *Nature Biotech.* 23:857-861, 2005). Ao mesmo tempo em que os aspectos da invenção descrita aqui serão predominantemente descritos como eles se aplicam as β -10 células, deve ser entendido que os métodos e composições desse modo descritos podem ser similarmente úteis na preservação da funcionalidade de qualquer célula produtora de insulina submetida às tensões de demanda excessiva para toxicidade de glicose ou biogênese de insulina, etc. Desse modo, os métodos de imitar resposta de insulina de fase precoce em diabéticos tipo 1 na fase de lua de mel, diabéticos tipo 2 precoces, e recipientes de transplantes de ilhotas ou 15 outra células produtoras de insulina, são designados para aumentar o período de vida das células produtoras de insulina 20 reduzindo-se a tensão pancreática.

Com empregado aqui, a imitação de liberação de insulina de fase precoce de refeição fisiológica (ou termos similares) não necessariamente indica a replicação exata de todas as características das respostas fisiológicas. Pode 25 se referir às metodologias de produção de um aumento ou máximos de concentração de insulina no sangue que constitui ambos aumentos relativamente rápidos (menos do que 30 minutos, preferivelmente menos do que cerca de 20 minutos ou 15 minu-

tos de administração ou primeira partida do valor de referência) e queda (descida através da metade máxima por 80 minutos, preferivelmente 50 minutos, mais preferivelmente 35 minutos após o máximo) em concentração. Isto está em contraste com os métodos produzindo um aumento mais gradual (de acima de 20 minutos a várias horas) para a concentração de insulina máxima obtida e um platô prolongado próximo às concentrações máximas. Pode também se referir as metodologias nas quais a elevação na concentração de insulina pode ser confiavelmente coordenada com o início de uma refeição. Pode também se referir às metodologias obtendo uma taxa de eliminação de glicose máxima (GERmax) dentro de cerca de 30-90 minutos, preferivelmente em torno de 45-60 minutos, após a administração. Uma metodologia que imita liberação de fases precoce é geralmente também um que pode ser praticada pelos próprios diabéticos sem treinamento médico especial, tal como treinamento em injeção intravenosa. O treinamento médico especial não incluiria treinamento para usar dispositivos médicos, tal como inaladores de pó secos, que são rotineiramente empregados por pessoas que não são [treinada] os profissionais médicos. Como empregado aqui, "refeição", "refeições", e/ou "hora da refeição", etc. incluem refeições tradicionais e horas da refeição; entretanto, estas também incluem a ingestão de qualquer valor nutritivo independente de tamanho e/ou hora. Todavia é preferido que insulina seja administrada somente durante uma refeição fornecendo pelo menos uma carga glicêmica limiar dependendo da dose de insulina para evitar um risco de hipoglicemias.

A potenciação de contribuição de GER ao alcance rápido de GERmax é entendida depender não somente da rapidez da elevação na concentração de insulina, porém também da obtenção de altura de pico suficiente. Para diabéticos tipo 1 5 esta é uma concentração de insulina máxima de pelo menos cerca de 60 mU/L, preferivelmente pelo menos cerca de 80 mU/L. Para diabéticos tipo 2 a resistência a insulina que é parte da condição necessita de concentrações de insulina mais elevadas; tipicamente pelo menos cerca de 100 mU/L, 10 preferivelmente pelo menos cerca de 120 mU/L, pelo menos cerca de 140 mU/L, ou mais, dependendo do grau de resistência. Estas concentrações de insulina máxima são substancialmente mais elevadas do que aquelas obtidas com doses típicas de produtos de insulina de não reforço tal como preparações padrão para administração subcutânea, incluindo aquelas 15 chamadas de atuação rápida, e preparações para administração não injetada tendo cinéticos similares que estão sendo desenvolvidos agora.

É também do entendimento do requerente que uma onda elevada e taxa rápida de alteração na concentração de insulina suprime a produção de glucagon, reduzindo a gliconeogênese hepática. Isto resulta em carga glicêmica diminuída e consequentemente demanda diminuída para insulina e excursão de glicose reduzida.

25 As populações de pacientes tratados de acordo com os métodos descritos aqui não são completamente coincidentes com aquelas mais comumente recebendo terapia de insulina. De fato o método pode ser praticado para grande vantagem nos

estados mais precoces destas condições, quando as populações de β -célula funcionais são maiores, embora as terapias de insulina atuais sejam comumente não oferecidas a estes pacientes. Desse modo como empregado aqui "um paciente em necessidade de terapia de insulina" compreende tais populações.

5. Estes pacientes são também definidos como pacientes não dependentes de insulina. Geralmente, pacientes com alguma capacidade de produção de insulina, porém com liberação de fase precoce inadequada, constituem populações alvo preferidas

10. selecionadas para tratamento em modalidades da invenção. Tais populações incluem, sem limitação, recipientes de transplantes de ilhotas, β -células, ou células construídas para produzir insulina, e recipientes de terapias de gene de insulina; diabéticos tipo 1 na fase de lua de mel ou no qual

15. a doença é incipiente; e diabéticos tipo 2 tradicionalmente tratados com dieta e exercício, medicamentos orais, insulina de atuação longa (basal) somente, ou insulina de atuação curta - sozinha ou misturada com insulina de atuação longa - em conjunto com duas ou menos refeições diárias. Tais populações incluem pacientes com níveis de HbA1c (hemoglobina de glicada) de outro modo aceitáveis (uma medida de hiperglicemia crônica) que não geralmente seria tratado por qualquer modalidade particular, ou absolutamente. Os níveis de HbA1c normais são 4,5% a 5,7% (ou quando reportada com menos precisão 4-6%). O tratamento de diabete geralmente tem como objetivo reduzir os níveis de HbA1c para baixo de 7%. Os níveis de HbA1c acima de 8% indicam a terapia atual do paciente deve ser re-avaliada. Seria desejável para obter níveis

de HbA1c normais, porém com os produtos de insulina atualmente comercializados isto somente seria realizado em um risco inaceitável de hipoglicemia grave. Em modalidades de preparações de insulina da presente invenção o risco de hipoglicemia é muito reduzido e é possível tratar os pacientes com HbA1c abaixo de 7%. Desse modo os pacientes com níveis de HbA1c abaixo de 8% não seriam considerados os candidatos para tratamento mais intensivo, isto é, para tratamento com insulina; ou se já recebendo insulina basal ou misturada, para tratamento com regime de insulina prandial. Adicionalmente, o benefício é esperado da redução de glicose do sangue mesmo no fim elevado da faixa normal, a fim de que em algumas modalidades da invenção, os pacientes com níveis de HbA1c \leq 6% sejam selecionados para tratamento. Ao mesmo tempo em que a invenção geralmente é descrita em referência aos pacientes humanos, a adaptação de mamíferos não humanos não está além do escopo da invenção ou das capacidades de alguém de experiência nas técnicas relacionadas.

Os pacientes com distúrbios de insulina de estágio precoce podem ser divididos em várias sub-populações e podem ser tratados de acordo com várias modalidades da presente invenção. Algumas pessoas fabricam insulina suficiente para manter um nível de glicose do sangue em jejum não hiperglêmico, porém não podem evitar flutuações agudas em glicose do sangue após comer. Os pacientes com glicose em jejum prejudicada ou tolerância à glicose prejudicada, que estão com um nível de glicose do sangue em jejum entre 100 mg/dL (5,5 mmol/L) e 126 mg/dL (7,0 mmol/L), ou um nível de glicose do

sangue pós-prandial de 2 horas entre 146 mg/dL (7,9 mmol/L) e 200 mg/dL (11,1 mmol/L), freqüentemente os chamados pré-diabéticos, podem ser tratados para retardar ou prevenir a progressão da diabete. Os diabéticos tipo 2 precoces podem 5 freqüentemente usar dieta e exercícios para controlar a hiperglicemia ainda substancial, porém já terá perdido sua liberação de insulina de fase precoce. Desse modo, em outra modalidade da presente invenção estes pacientes são selecionados para tratamento. Na prática atual, os pacientes que 10 fracassam na dieta e exercício são mais geralmente em seguida tratados com um sensibilizador de insulina, tal como metformina, com o objetivo de superar a resistência à insulina e melhorar a efetividade da insulina que é produzida. Em modalidades da presente invenção, estes pacientes são admitidos 15 com uma preparação de insulina imitando a fase precoce prandial em vez de, ou além, do sensibilizador de insulina. Menos freqüentemente (e previamente) o primeiro medicamento oral oferecido aos diabéticos foi um secretagogo de insulina, tal como uma sulfoniluréia, para aumentar a secreção 20 de insulina. Entretanto, a secreção de insulina crescente pode aumentar a tensão metabólica nas ilhotas desse modo, em uma modalidade preferida, uma preparação de insulina imitando a fase precoce prandial é empregada em vez de um secretagogo.

25 Uma deficiência com formulações existentes de insulina para injeções subcutâneas foi a variabilidade imprevisível de absorção, e a elevação relativamente lenta em níveis de insulina de soro comparados com a resposta de insu-

lina de fase precoce relacionado com a refeição fisiológica, na qual os níveis de insulina de soro podem elevar dentro de cerca de 6 minutos. A insulina de fase precoce relacionada com a refeição se origina de vesículas de armazenamento dentro das β -células das ilhotas de Langerhans do pâncreas, onde a pró-insulina sofre clivagem enzimática em insulina e C-peptídeo. A falta de uma resposta de fase precoce adequada é um elemento comum nas fases precoces de diabete tipo 1 e 2 e em recipientes de transplante de ilhota. A liberação rápida de quantidades grandes de insulina para criar a elevação característica em concentração de insulina de sangue coloca uma carga bioquímica significante no pâncreas. A perda de liberação de fase precoce adequada é um indicador de um pâncreas pressionado ou prejudicado, porém também contribui para ainda pressionar as β -células. A diabete é também caracterizada por níveis elevados de pró-insulina de soro. Tal pró-insulina intacta circulante (iPi) significa que as exigências de insulina excedem a capacidade β -célula, causando a liberação prematura, e refletindo a tensão pancreática.

A elevação comparativamente lenta e superficial na concentração de insulina e período prolongado de ação associado com preparações de insulina que não imitam a liberação de fase precoce, limita a sua capacidade de controlar excursões de glicose. A dose que pode ser dada é geralmente inadequada para controlar a elevação em glicose de sangue seguinte a uma refeição pela necessidade de evitar a indução de hipoglicemia após a carga glicêmica da refeição, ter sido

abatida. Estes assuntos são também descritos no Pedido de Patente U.S. de co-pendência No. 11/278.381 intitulado "Superior Control of Blood Glucose in Diabetes Treatment" que está incorporado aqui por referência em sua totalidade. Es-
5 tá surgindo que flutuações agudas em concentrações de glicose do sangue (medidas, por exemplo, como MAGE: amplitude média de excursões glicêmicas) têm um maior efeito do que a hiperglicemia crônica (tipicamente medida como nível de Hb1Ac) em tensão oxidativa associada a diabete, e desse modo
10 é um parâmetro importante para controlar para evitar as complicações diabéticas atribuíveis a tal tensão (veja, Monnier, L., e outros, JAMA 295:1681-1687, 2006; e Brownlee, M. & Hirsch, I. JAMA 295:1707-1708, que estão aqui incorporados por referência em sua totalidade).

15 A terapia de insulina tem focado tradicionalmente no controle de concentrações de glicose do sangue comuns, como refletido pelos níveis de Hb1Ac. Desse modo, relativamente poucos pacientes capazes de produzir quantidades significantes de insulina recebem terapia basal-prandial (envolvendo administração de uma insulina basal mais insulina com cada refeição). Mais abordagens comuns envolvem insulina de longa atuação (basal) sozinha, misturas de jejum e atuação intermediária, e várias outras combinações de injeções. Os critérios clínicos para a adoção de um ou outros
20 destes regimes não são bem definidos. Geralmente o tratamento começa com insulina basal, se ou quando isso não for bem sucedido na obtenção de níveis de Hb1Ac alvo, a terapia é intensificada empregando injeções adicionais e várias mistu-

ras (pré-misturado ou automisturado). Se o alvo não é ainda obtido, o tratamento prossegue para terapia basal-prandial. A terapia prandial em pacientes não recebendo insulina basal é incomum e, empregando as preparações de insulina atualmente comercializadas (sem reforço), não conferem o alívio de tensão pancreática da presente invenção. Além disso, as preparações de insulina atualmente disponíveis fornecem atividida durante estrutura de tempo mais longo do que o preferido da presente invenção as tornando menos adequadas para o controle de excursões de glicose.

A presente invenção é designada para minimizar não somente os níveis de Hb1Ac (concentração de glicose do sangue média) e toxicidade de glicose concomitante; porém também para reduzir a demanda biossintética para insulina fornecendo-se uma insulina exógena imitando uma resposta de fase precoce, e controle de flutuações agudas na concentração de glicose (excursões de glicose) também reduzindo a demanda de insulina. A redução de excursões de glicose também alivia a sobrecarga inflamatória geral e dano oxidativo para micro-vasculatura resultante de tensão oxidativa, geralmente e nas ilhotas. Isto é realizado por administração rotineira de uma preparação de insulina que imita a liberação de fases precoce em conjunto com pelo menos três refeições por dia, preferivelmente com cada refeição ou lanche. Tal tratamento seria mantido, em preferência crescente e para efetividade crescente, durante qualquer número de dias, semanas, meses, e anos, até o resto da vida do paciente ou até tal tempo quando o distúrbio relacionado com a insulina subjacente for cu-

rado. É a hipótese não ligação dos requerentes que sobre tal tratamento sustentador como descrito aqui, a função pancreática melhorará com o passar do tempo, por exemplo, devido à massa de β -célula aumentada, resultando na capacidade recuperada para liberação de fase precoce endógena. Sob tais condições pode ser possível reduzir o número de administrações diárias. Por rotineiramente é significado que o horário defendido de administração é o ideal e de uso usual, porém em desvios práticos do mundo real deste protocolo, tal como doses perdidas ocasionais, não se afastam do escopo da invenção. Em várias modalidades a insulina é administrada com qualquer refeição ou lanche de outra maneira faria com que a glicose do sangue excedesse 140 mg/dL; com qualquer refeição ou lanche constituindo 1, 2, 3, ou mais alterações de pão; com qualquer refeição ou lanche contendo mais do que cerca de 15, 20, 30, ou 45 g de carboidrato.

As modalidades dos métodos da presente invenção incluem uma variedade de regimes de dosagem incluindo, porém não limitada a, dosagem a cada refeição ou lanche, dosagem a cada refeição ou lanche tendo um teor de carboidrato de mais do que 15 g, dosagem a cada refeição ou lanche tendo um teor de carboidrato de mais do que 30 g, a cada refeição ou lanche tendo um teor de carboidrato de mais do que 45 g. As dosagens e concentrações de composição de insulina desejadas podem variar dependendo do uso particular pretendido. A determinação da dosagem apropriada ou rotina de administração está bem dentro da experiência de um médico ordinário. Além disso, a duração do tratamento de acordo com a presente in-

venção pode variar no uso particular e a determinação da duração de tratamento está dentro da experiência de um médico ordinário.

No caso de diabete tipo 1, uma inflamação inicial e ataque auto-imune reduzir o número de β -células funcional desse modo limitando a capacidade biossintética das ilhotas. Similarmente, uma explicação para falha da ilhota em pacientes transplantados é que eles receberam poucas ilhotas, mesmo que eles obtivessem células de doadores múltiplos. Um pâncreas normal tem aproximadamente 1 milhões de ilhotas, porém técnicas atuais permitem que somente 400.000 células no máximo sejam extraídas de um pâncreas doador e muitas destas morrem logo após o transplante. Realmente, o esgotamento de ilhota devido a superestimulação crônica de uma massa de célula ilhota marginal é entendida ser a razão dominante para disfunção do transplante tardio (Shapiro, A.M.J., The Scientist 20:43-48, 2006). Em cada caso, as células de ilhota restantes são forçadas ao trabalho extraordinariamente árduo e podem perder a função com o passar do tempo. Isto pode ser também exacerbado pela ausência do efeito de potenciação que a elevação na concentração de insulina tem sobre os níveis de insulina subsequentes uma vez que ela aumentará a quantidade de insulina necessária em liberação de segunda fase para manipular a carga de glicose resultante de uma refeição. Este efeito de potenciação é mais completamente descrito no Pedido de Patente U.S. de correspondência No. 11/329.686, depositado em 1/10/06, intitulado "Potentiation of Glucose Elimination", que esta incorporado

aqui por referência em sua totalidade. Em diabete tipo 2, pelo menos inicialmente, não há uma carência evidente de células de ilhota, porém a resistência a insulina reduz a efetividade da insulina que é produzida além daquela devido à 5 perda de potenciação que resulta quando a liberação de fase precoce é perdida. Isto propõem um requerimento para mais insulina para limpa uma carga de glicose, novamente colocando tensão sobre o pâncreas para produção de insulina. Esta 10 ineficiência da eliminação de glicose também resulta em elevações prolongadas na concentração de glicose e toxicidade de glicose conseqüente sobre β -células. Através destas várias vias, a capacidade bioquímica das ilhotas torna-se dominada. Neste caso, a secreção de insulina progressivamente diminuída, perda subseqüente de liberação de insulina 15 da segunda fase e, por ultimo, deficiência de insulina completa.

Quando se acredita que a tensão pancreática seja uma causa para a progressão de diabete tipos 1 e 2 e a perda de função de transplante da ilhota, então segue que um método 20 para reduzir a tensão pancreática melharia a função e período de vida de células produtoras de insulina nestas populações de pacientes. Empregando-se um método de liberação de insulina que imita liberação de fase precoce muitos dos déficits causados pela perda de sua resposta podem ser aliviados, desse modo reduzindo a tensão concomitante. Crian- 25 do-se uma elevação na concentração de insulina no inicio de uma refeição as β -células são aliviadas desta demanda, permitindo-as a mais facilmente supri outras necessidade de in-

sulina (isto é, insulina de segunda fase e basal). Além disso, a potenciação que resulta de uma elevação tipo de fase precoce reduzi a quantidade de insulina necessária na liberação de segunda fase para qualquer carga de glicose particular mesmo em uma base de resistência a insulina. O uso mais eficiente de insulina também contribui com a redução a magnitude e duração de qualquer excursão de níveis de glicose normais no sangue aliviando os efeitos de toxicidade de glicose e tensão oxidativa. Desse modo, o espiral de demanda bioquímica crescente e capacidade de diminuição pode ser interrompido e o requerimento de produção de insulina conduzido mais rigorosamente em linha com capacidade restante.

No caso de transplante de ilhota algumas drogas anti-rejeição, tal como sirolimus, inibem a revascularização da ilhota e é pretendido interferir com a capacidade de enxerto da ilhota para regeneração (Shapiro, A.M.J., The Scientist 20:43-48, 2006). Desse modo uma terapia de insulina adjuntiva que minimiza outras causas de lesão vascular, tal como tensão oxidativa devido a flutuações agudas de concentrações de glicose do sangue, pode ser particularmente vantajosa neste contexto.

A injeção intravenosa de insulina pode replicar efetivamente a resposta de fase precoce, porém não é uma terapia prática para uma condição vitalícia requerendo múltiplas administrações diárias. As injeções subcutâneas tradicionais são absorvidas na corrente sanguínea lentamente em comparação, mesmo empregando formulações de atuação rápida,

que ainda levam até uma hora para alcançar concentração máxima no sangue e tem um platô durando várias horas. Muitas formulações pulmonares que foram avaliadas são equivalentes a insulina subcutânea na efetividade e similarmente falham 5 ao obter cinéticos rápidos necessários para imitar a liberação de fase precoce, como definido acima. Todavia, o potencial para absorção verdadeiramente rápida empregando uma liberação com base em não injeção, tal como administração oral 10 e pulmonar, existe. Por exemplo, a liberação pulmonar empregando formulações de pó seco com base em dicetopiperazina foi utilizada.

A perda de resposta de insulina da fase precoce, os níveis de pró-insulina aumentados, ou o controle de glicose diminuído em um paciente diabético são cada uma medida 15 de perda da função de células produtoras de insulina. Esta perda de função pode ser atribuída a morte da célula e/ou tensão da célula ilhota. Na realidade, a maior carga colocada sobre as células produtoras de insulina em diabéticos é para libertar insulina para a resposta da fase precoce. A 20 administração de uma fonte de exógena de insulina para imitar esta resposta pode eliminar esta carga (tensão) e preserva a liberação de insulina basal e de segunda fase (relacionada com a refeição, dependente de glicose).

Desse modo, uma modalidade preferida da presente 25 invenção fornece um método para obter os cinéticos de fase precoce desejáveis através da administração pulmonar de uma formulação de insulina de pó seco contendo insulina complexa para micropartículas de dicetopiperazina. Esta formulação é

rapidamente absorvida alcançando níveis de soro máximos dentro de cerca de 10 a 15 minutos. Isto é bastante rápido para imitar os cinéticos da resposta de insulina da fase precoce relacionado com a refeição fisiológica. A elevação 5 curta, súbita para concentração de insulina de soro máxima é crítica para aliviar a demanda biossintética de outra maneira colocada sob as β -células e tem o efeito adicional de comprimir o volume da ação de insulina ao intervalo de tempo peri-prandial, em contraste com formulações de atuação mais 10 lentas. Isto reduz a magnitude e duração de qualquer excursão relacionada com a refeição de níveis de glicose normais e toxicidade de glicose associada, bem como o risco de hipoglicemia pós-prandial. Tal controle melhorado de níveis de glicose do sangue obtido com esta insulina de pó seco é 15 mais completamente descrito no Pedido de Patente U.S. co-pendência No. 11/278.381, depositado em 31/3/06, intitulado "Superior Control of Blood Glucose Levels in Diabetes Treatment", que está incorporado aqui por referência em sua totalidade. Como descrito no Pedido U.S. No. 11/329.686 e notado 20 acima, os níveis de insulina elevados anteriores potencializam a taxa de eliminação de glicose, significando que a glicose pode ser eliminada mais rapidamente se houver uma elevação da concentração de insulina elevada anterior. Tal tratamento também conduz a níveis reduzidos de pró-insulina 25 de soro, indicando uma redução de tensão pancreática biossintética.

Os sistemas de liberação de droga de micropartícula de dicetopiperazina e métodos associados são descritos

nas Patentes U.S. 5.352.461 e 5.503.852 intituladas "self Assembling Diketopiperazine Drug Delivery System", e "Method for Making Self Assembling Diketopiperazine Drug Delivery System", respectivamente. O uso de micropartículas de polímero biodegradáveis e de dicetopiperazina em liberação pulmonar é descrito nas Patentes U.S. 6.428.771 e 6.071.497 intituladas "Method for Drug Delivery to the Pulmonary System", e "Microparticles for Lung Delivery Comprising Diketopiperazine", respectivamente. Os detalhes com respeito aos vários aspectos de possíveis processos de fabricação e formulação podem ser encontrados nas Patentes U.S. No. 6.444.226 e 6.652.885 ambos intituladas "Purification and Stabilization of Peptide e Protein Pharmaceutica Agents"; na Patente U.S. No. 6.440.463 intitulada "Methods for Fine Powder Formation" no Pedido de Patente Provisório de Co-pendência U.S. No. 60/717.524, depositado em 14/9/05, intitulada "Method of Drug Formulation Based on Increasing the Affinity of Active Agents for Crystalline Micoparticle Surfaces"; e 60/776.605, depositado em 14/4/06, intitulado "A Method for improving the Pharmaceutic Properties of Microparticles Comprising Diketopiperazine and na Active Agent". As propriedades e designio de um sistema de inalador de pó seco de respiração de pó preferido são descritos no Pedido da Patente U.S. No. 10/655.153 intitulada "Unit Dose Cartridge and Dry Powder Inhaler". Os aspectos de tratamento empregando insulina complexa para micropartículas de dicetopiperazina são descritos na Patente U.S. 6.652.885 bem como no Pedido de Patente co-pendência U.S. No. 11/032.278, inti-

tulado "A Method of Reducing Serum Proinsulin Levels in Type 2 Diabetes". Adicionalmente Pedido da Patente U.S. No.11/210.710, intitulada "Diketopiperazine Salts for Drug Delivery and Related Methods" descrevem o uso de sais de dicetopiperazina para formular insulina tanto para liberação pulmonar quanto oral. Cada um dos pedidos de patentes e patente mencionados neste parágrafo esta incorporado aqui por referência em sua totalidade.

Também contemplados, qualquer medicamento pode ser administrada em combinação com a insulina descrita aqui. Estes medicamentos podem incluir, porém não são limitadas aos medicamentos antidiabéticos orais, miméticos de incretina, aqueles que preservam funções de β -célula, agentes de bloqueio de co-estimulação tal como anticorpos anti-CD28 ou belatacept, anticorpos anti-CD3, e/ou qualquer medicamento imunossupressores (tipicamente empregada em um caso de transplante de ilhota), porém, os medicamentos que preservam as funções de β -célula são preferidos. Os medicamentos imunossupressores exemplares incluem, porém não estão limitados, daclizumab, sirolimus, tacrolimus, ácido micofenólico, rapamicina, glicocorticóides, prenisona, azatioprina, e ciclesporina, entretanto, glicocorticóides, prenisona, azatioprina, e ciclosporina estão entre aqueles que são menos preferidos.

Mais especificamente, uma modalidade da presente invenção inclui administração TECHNOSPHERE®/Insulina (TI) em conjunto com um medicamento imunossupressor, por exemplo, um anticorpo anti-CD3, para prolongar a fase de lua de mel em

diabéticos tipo 1. Estes anticorpos anti-CD3 bloqueia a função de células T imunes, que são as células responsáveis pela destruição das células beta ilhotas no pâncreas. O termo "em conjunto" como empregado aqui significa o medicamento TI 5 imunossupressor são empregados como terapias duais para por ultimo reduzir a tensão pancreática.

Se TI ou outra insulina imitando liberação de fase precoce é administrada sozinha ou em conjunto com um medicamento imunossupressor, a insulina pode ser administrada em 10 associação com refeições, preferivelmente uma a quatro vezes diariamente, dependendo da necessidade. A fim de obter o benefício máximo do tratamento, ele deve ser tomado durante um período prolongado de tempo, preferivelmente até cerca de um mês, mais preferivelmente de cerca de dois meses a cerca de 15 seis meses, e mais preferivelmente durante o restante da vida do paciente ou até que a diabete subjacente seja curada. Um indicador de efetividade e/ou um parâmetro de monitoramento inclui uma avaliação periódica dos níveis de pró-insulina do paciente. Evidentemente, a freqüência de administração e a quantidade de dosagem podem ser ajustadas de 20 acordo com esta determinação de pró-insulina periódica.

A presente invenção se refere a um método para tratar pacientes diabéticos com uma quantidade de dose administrada pulmonarmente de TI de pó seco suficiente para imitar resposta de insulina de fase precoce, para reduzir os 25 níveis de pró-insulina de soro, e/ou controlar os níveis de glicose do sangue a fim de melhorar a longevidade das células produtoras de insulina em diabéticos tipo 1 e 2 precoces

e pacientes de transplante de ilhota, como descrito nos exemplos abaixo.

EXEMPLOS

Exemplo 1

5 Estudo Controlado por Placebo, Duplo cego, Aleatorizado da Eficácia e Segurança de TECHNOSPHERE®/Insulina Inalado em Pacientes com Diabete Tipo 2

A insulina pulmonar de pó seco TECHNOSPHERE®, liberação através de um inalador pulmonar pequeno tem uma bio-10 disponibilidade que imita a liberação de insulina de primeira fase ou fase precoce relacionada com a refeição normal. Este estudo controlado por placebo, duplo cego, aleatorizado de multicentro foi conduzido em pacientes de diabetes melito tipo 2 inadequadamente controlados em de terapia de agente 15 oral ou dieta ($HbA1c >6,5\%$ a $10,5\%$). Um total de 123 pacientes foi inscrito e 119, a população com intenção de trata (ITT), foram aleatorizados em uma relação de 1 :1 para receber TECHNOSPHERE®/Insulina inalada prandial de cartuchos de dose de unidade contendo entre 6 a 48 unidades de insulina 20 humana (origem de rDNA) ou TECHNOSPHERE®/placebo inalado (PBO).

Os resultados de hemoglobina A1c glicosilada ($HbA1c$) foram analisados por um plano de análise estatística pré-determinado quanto à População de Eficácia Primária 25 (PEP, definida antes do não cego como aqueles que aderiram aos requerimentos do estudo incluindo dosagem mínima e nenhum ajuste de drogas de diabetes concomitantes), para um Sub-grupo A de PEP (aqueles com $HbA1c$ de valor de referência

de 6,6 a 7,9%), para um Sub-grupo B de PEP (aqueles com HbA1c de valor de referência de 8,0 a 10,5%), bem como para o ITT. Estes resultados são resumidos na Tabela 1. Neste estudo de dosagem individualizado, a dose média de TI empregado antes de cada refeição no grupo de tratamento ativo foi aproximadamente 30 unidades, com 28 unidades empregadas no Sub-grupo A de PEP e 33,5 unidades empregadas no Sub-grupo B de PEP.

Tabela 1

	Technosphere®/ Placebo	Technosphere®/ Insulina
PEP n=90	n=42	n=48
Valor de referência de HbA1c médio (%)	7,75	7,74
Média Δ de Valor de referência	-0,32	-0,76 (p<0,0001)
Comparação com Placebo		p=0,0019
Sub-grupo B de PEP n=35	n=18	n=17
Valor de referência de HbA1c médio (%)	8,52	8,72
Média Δ de Valor de referência	-,51 (p=0,0094)	-1,37 (p<0,0001)
Comparação com Placebo		p=0,0007
Sub-grupo A de PEP n=35	n=24	n=31

Valor de referência de HbA1c médio (%)	7,16	7,19
Média Δ de Valor de referência	-0,18 (p=0,1292)	-0,43 (p=0,0001)
Comparação com Placebo		P<0,05
IIT (LOCF) n=119	n=61	n=58
Valor de referência de HbA1c médio (%)	7,78	7,87
Média Δ de Valor de referência	-0,31 (p=0,0020)	-0,72 (p<0,0001)
Comparação com Placebo		p=0,0016

Nenhum episódio de hipoglicemias grave ocorreu no grupo TI. Os testes de funções pulmonares, incluindo DLCO, FEV1, e Volume Alveolar Total não mostram nenhuma diferença significante entre os pacientes em TI comparado com seus valores de referência ou comparado aos resultados daqueles recebendo PBO. Não houve nenhuma evidência de indução de anticorpos de insulina com TI durante o período de 12 semanas de exposição.

Exemplo 2

10 Imitação da Resposta de Insulina de Fase Precoce em Humanos com Insulina inalada Rapidamente Biodisponível Acelera a Disposição de Glicose Pós-Prandial Comparado com Insulina de Biodisponibilidade mais Lenta

15 A relação entre tempo, a concentração de insulina, e taxa de eliminação de glicose em um grupo de 12 indivíduos com diabetes tipo 2, durante uma fixação isoglicêmica foi es-

tudada. Cada indivíduo recebeu 24 IU (Unidades Internacionais) de insulina subcutânea (Actrapid®, Novo Nordisk) ou 48 U de TECHNOSPHERE®/Insulina (TI, MannKind Corporation) em dias de estudo separados em um designado de cruzamento. A 5 Taxa de Eliminação de Glicose (GIR) foi determinada pela quantidade de infusão de glicose requerida para manter a glicose do sangue estável de 120 mg/dL durante o período de estudo de 540 minutos (Figura 3).

Quarenta e oito unidades TI forneceram uma concentração máxima média de insulina (Cmax) de $114,8 \pm 44,1$ (média ± SD) mU/L e tiveram um tempo médio para a concentração máxima (Tmax) de 15 minutos, considerando que 24 IU de insulina subcutânea (SC) tiveram um Cmax de $63 \pm 10,1$ mU/L com um Tmax de 150 minutos. TECHNOSPHERE®/Insulina alcançou valores de GIR máximo, $3,33 \pm 1,35$ mg/min/kg, a 45 minutos, ao mesmo tempo em que o ponto de tempo, SC foi somente $1,58 \pm 1,03$ e não alcançou valor máximo, $3,38 \pm 1,45$ antes de 255 minutos, a despeito de concentração de insulina quase constante. Uma vez que o efeito de insulina máxima foi alcançado, a relação de concentração-efeito foi a mesma para TI e SC. Em 180 minutos, a disposição de glicose foi 326 ± 119 mg/kg ou 61% do total para TI e 330 ± 153 mg/kg (27% do total) para SC.

O aumento rápido, agudo na concentração de insulina, similar à resposta de insulina de fase precoce, fornece taxa de eliminação de glicose máxima. Quarenta e oito unidades TI obtiveram efeito máximo dentro de 45 minutos, considerando que levou 270 minutos para 34 IU SC alcançar efei-

to similar. Este fenômeno não é causado por diferenças na relação de dose-efeito pelos dois tipos de insulina, porém reflete uma diferença na resposta quando o aumento na concentração de insulina é mais modesto com o passar do tempo 5 oposto a insulina biodisponível mais rápida fornecida por TECHNOSPHERE®/Insulina. Isto pode ter consequências para controle de glicose pós-prandial.

Além disso, três horas após a dosagem, 48 U de TI e 24 IU de SC prolongaram o mesmo efeito de redução de glicose. Entretanto, menos do que 1/3 do efeito de redução de glicose total para a dose de SC foi obtido. Se a dose de insulina prandial é titulada voltada a um objetivo de normoglicemia em três horas após uma refeição, o efeito de redução de glicose restante o grande de insulina SC pode aumentar 10 o risco de hipoglicemia pós-prandial tardia, como comparado 15 com o TI.

Um problema com as formulações existentes de insulina para injeções subcutâneas foi a variabilidade imprevisível de absorção e o aumento relativamente lento nos níveis 20 de insulina de soro comparado com a resposta de insulina de primeira fase relacionada com a refeição fisiológica, na qual os níveis de insulina de soro podem chegar ao máximo dentro de cerca de seis minutos. Portanto, os cinéticos 25 preferidos de formulações de insulina para substituição prandial incluem um início rápido e precoce de atuação e uma duração de atuação longa o suficiente para abrange a absorção de glicose relacionada a refeição. TECHNOSPHERE®/Insulina pulmonar atende a este requerimento

imitando-se a resposta de insulina de fase precoce em pacientes diabéticos que perderam esta função. Os pacientes de transplante de ilhota representam uma população de pacientes diabéticos tratados que ainda não exibe resposta de insulina 5 de primeira fase. A administração de TECHNOSPHERE®/Insulina aos pacientes de transplante de ilhota restaura a resposta de insulina tipo primeira fase desse modo reduzindo a tensão pancreática e melhorando a longevidade das células transplantadas.

10 Exemplo 3

Tratamento de Humanos com Insulina Pulmonar Reduz os Níveis de Pró-insulina de Soro

A inalação de TECHNOSPHERE®/Insulina (TI) fornece um aumento na insulina de soro, comparável com a resposta de 15 primeira fase. Este estudo investigou os farmacodinâmicos de TI e seu impacto na liberação de pró-insulina intacta (i-Pi). Vinte e quatro pacientes com diabete Tipo 2 receberam doses de TECHNOSPHERE® base com 4 carregamentos diferentes de insulina, ou 0, 12 IU, 24 IU, ou 48 IU de insulina humana 20 regular recombinante, cinco minutos após o início das refeições padronizadas, em dias de estudo separados. A glicose do sangue (BG), insulina de soro e soro iPi foram medidos antes (0 minuto), 60 e 120 minutos após início de cada refeição.

25 TI reduziu os níveis de BG pós-prandiais de uma maneira dependente da dose. Sessenta minutos após o almoço, BG (mg/dL) (\pm SD) foi 183,2 (\pm 44,4) para placebo; 170,8 (\pm 30,5) para 12 IU ($p=0,266$); 156,3 (\pm 31,9) para 24 IU,

($p=0,020$) e 132,6 ($\pm 29,1$) para 48 IU, ($p<0,001$). Todas as doses causaram um aumento na insulina de soro a 60 minutos ($p<0,05$), porém não em 120 minutos de seguinte a inalação. A administração de TI com 24 IU e 48 IU de doses de carga de insulina supriu os níveis iPi em todos os pontos de tempo durante todo o dia ($p<0,05$). O uso de TI inalado para imitar o início rápido e a duração curta da resposta de insulina de primeira fase, portanto deve reduziria a tensão em células produtoras de insulina. Isto pode melhorar a função de β -célula geral, homeostase de glicose endógena, e a longevidade de β -células residuais e transplantadas.

Figura 3 descreve as alterações nos níveis de pró-insulina com o passar do tempo, seguinte a administração pulmonar de partículas de dicetopiperazina/insulina.

15 Exemplo 4

Avaliação de β -células em Ratos Gordos Diabéticos

Tratados com Insulina Pulmonar

Os ratos Gordos Diabéticos são um modelo de diabete tipo 2. Duas linhagens, ZDF e WDF, estão disponíveis. As 20 diabetes podem ser induzidas na linhagem de WDF alimentando-se uma dieta com alto teor de sacarose durante aproximadamente uma semana. Alternativamente os ratos de ZDF desenvolverão diabete espontaneamente em cerca de 13 semanas de idade.

25 Três grupos de 20 ratos são tratados com doses diárias ou insulina por injeção subcutânea, TI por insuflação pulmonar, ou ar por insuflação pulmonar. A dosagem começa uma semana antes do início antecipado de diabete. A dosagem

é selecionada para aproximar um equivalente de uma dose humana, porém menos do que causaria hipoglicemia grave ou de ameaçadora a vida nos animais ainda não diabéticos. Os animais são jejuados durante a noite antes de tomar as medições 5 de sangue, porém são de outra maneira alimentados *ad libitum*.

Os pesos corporais são semanalmente medidos. As medidas de glicose do sangue de soro são conduzidas duas vezes por semanas. O teste de glicosuria é conduzido três vezes por semana. Os níveis de glicose na urina maior do que 10 250 mg/dL são seguidos através de teste de glicômetro durante 2 dias para confirma o início da diabete. Em confirmação do início da diabete, animais são sacrificados dentro de 24-48 horas. A insulina, a pró-insulina intacta, e o C-peptídeo 15 são medidos de uma amostra de sangue de pré-dose, semanalmente amostra de sangue em vida durante a dosagem, e na amostra de sangue terminal. As amostras de pré-dose e em vida são tomadas como pares exatamente antes e 3-5 minutos após o desafio de glicose de bolo para que a liberação de insulina de primeira fase possa ser avaliada. No sacrifício, 20 os pâncreas de todos os animais são colhidos e fixados em 10% formalina. O tecido pancreático é processado para manchamento de hemotoxilina e eosina (H & E) e avaliado quanto à massa de β -célula. A proliferação e índices apoptótico são 25 também avaliados através de imunoistoquímica (IHC) em tecidos pancreáticos.

A tensão reduzida e longevidade de β -célula prolongada no grupo TI são indicadas por massa de β -célula mai-

or, expressão maior de marcadores de proliferação índice apoptótico reduzido, progressão demorada para um início de diabete. A progressão para diabete é avaliada da elevação com o passa do tempo de níveis de glicose do sangue, insulina, e C-peptídeo; ausência ou níveis menores pró-insulina de soro intacta; e perda demorada de liberação de insulina de primeira fase.

Exemplo 5

Avaliação de β -células em camundongos NOD Tratados

10 com Insulina Pulmonar

Os camundongos NOD (diabético não obeso) são um modelo de diabete tipo 1. A diabete se desenvolve espontaneamente em cerca de 12-14 semanas de idade, com a variação sendo menos em fêmeas do que em machos.

15 Três grupos de 40 camundongos femininos são tratados com doses diárias ou de insulina por injeção subcutânea, TI por inalação, ou ar por inalação. A dosagem começa, antes do início antecipado de diabete, em 10 semanas de idade. A dosagem é selecionada para aproximar um equivalente de uma 20 dose humana, porém menor do que causaria hipoglicemias graves ou de ameaça a vida nos animais ainda não diabéticos. Os animais são jejuados durante a noite antes de tomar as medições de sangue, porém são de outras maneiras alimentados *ad libitum*.

25 Os pesos corporais são semanalmente medidos. As medições de glicose do sangue de soro são conduzidas duas vezes por semanas. O teste de glicosuria é conduzido três vezes por semana. Os níveis de glicose na urina maior do

que 250 mg/dL são seguidos por teste de glicômetro durante 2 dias para confirma o início da diabete. Em confirmação do início da diabete, os animais são sacrificados dentro de 24-48 horas. A insulina e C-peptídeo são medidos de uma amostra de sangue de pré-dose, duas amostras de sangue em vida igualmente espaçadas durante a dosagem, e a amostra de sangue terminal. As amostras de pré-dose e em vida são tomadas como pares exatamente antes e 3-5 minutos após o desafio de glicose de bolo para que a liberação de insulina de primeira fase possa ser avaliada. Em sacrificio, os pâncreas de todos os animais são colhidos e fixados em 10% formalina. O tecido do pancreático é processado para manchamento H & E e avaliado quanto à massa de β -célula. A proliferação e índices apoptótico são também avaliados através de IHC em tecidos pancreáticos.

A tensão reduzida e longevidade de β -célula prolongada no grupo TI são indicadas por massa de β -célula maior, expressão maior de marcadores de proliferação índice apoptótico menor, progressão demorada para e inicio de diabete. A progressão para diabete é avaliada da elevação com a passar do tempo de níveis de glicose do sangue, e da queda de insulina e C-peptídeo; e perda demorada de liberação de insulina de primeira fase.

A menos que de outra maneira indicado, todos os números expressando quantidades de ingredientes, propriedades tal como peso molecular, condições de reação, e assim por diante empregados na especificação e reivindicações devem entendidos como sendo modificado em todos os casos pelo

termo "cerca de". Conseqüentemente, amenos que indicado ao contrário, os parâmetros numéricos apresentados na seguinte especificação e reivindicações anexas são aproximações que podem variar dependendo das propriedades desejadas procura-
5 das serem obtidas pela presente invenção. No mínimo, e não como uma tentativa de limitar a aplicação da doutrina de e-
quivalentes ao escopo das reivindicações, cada parâmetro nu-
mérico pelo menos ser interpretado levando em consideração
vários dígitos significantes reportados e aplicando-se téc-
10 nicas de arredondamento ordinárias. Entretanto as faixas
numéricas e parâmetros apresentando amplo escopo da invenção
são aproximações, os valores numéricos apresentados nos e-
xemplos específicos são reportados tão precisamente quanto
possíveis. Qualquer valor numérico, entretanto, inerente-
15 mente contendo certos erros necessariamente resultantes do
desvio-padrão encontrado nas suas respectivas medições de
testes.

Os termos "um" e "uma" e "a" e "o" e referências
similares empregadas no contexto descrevendo a invenção (es-
20 pecialmente no contexto das seguintes reivindicações) devem
ser interpretados para abrange tanto o singular quanto plu-
ral, a menos que de outra maneira indicado aqui ou evidente-
mente contradito pelo contexto. A recitação de faixas de
valores nesta é meramente entendida servir como um método de
25 taquigrafia se referindo individualmente a cada valor sepa-
rado incluído dentro da faixa. A menos que de outra maneira
indicado aqui, cada valor individual é incorporado na espe-
cificação como se fosse recitado individualmente aqui. To-

dos os métodos descritos aqui podem ser realizados em qualquer ordem adequada a menos que de outra maneira indicado aqui ou de outra maneira evidentemente contradito pelo contexto. O uso de qualquer e todos os exemplos, ou linguagem 5 exemplar (por exemplo, "tal como") fornecida aqui é meramente pretendido melhor iluminar a invenção e não propõe uma limitação no escopo da invenção de outra maneira reivindicada. Nenhuma linguagem na especificação deve ser considerada como indicando qualquer elemento não reivindicado essencial 10 para a prática da invenção.

Os agrupamentos de elementos alternativos ou modalidades da invenção descritas aqui não devem ser interpretados como limitações. Cada membro de grupo pode ser referido e reivindicado individualmente ou em qualquer combinação com 15 outros membros do grupo ou outros elementos encontrados aqui. É antecipado que um ou mais membros de um grupo podem ser incluído em, ou deletado de, um grupo por razão de conveniência e/ou patenteabilidade. Quando qualquer tal inclusão ou deleção ocorre, a especificação é aqui suposta conter 20 o grupo como modificado desse modo satisfazendo a descrição escrita de qualquer e todos os grupos Markush empregados nas reivindicações anexas.

As modalidades preferidas desta invenção são descritas aqui, incluindo os melhores modos conhecidos pelos 25 inventores para realizar a invenção. Certamente, variações sobre aquelas modalidades preferidas se tornarão evidentes para aqueles de experiência ordinária na técnica ao ler a descrição precedente. Os inventores esperam que técnicos

versados empreguem tais variações quando apropriado, e os inventores pretendem que a invenção a ser praticada de outra maneira do que especificamente descrita aqui. Conseqüentemente, esta invenção inclui todas as modificações e equivalentes do assunto objetivo citado nas reivindicações anexas aqui como permitido pela lei aplicável. Além disso, qualquer combinação dos elementos descritos acima em todas as variações possíveis desta é abrangida pela invenção a menos que de outra maneira indicada aqui ou de outra maneira claramente contradito pelo contexto.

Além disso, referências foram feitas às patentes e publicações impressas ao longo desta especificação. Cada das referências e publicações impressas citadas acima estão incorporadas aqui individualmente por referência em sua totalidade.

Concluindo, deve ser entendido que as modalidades da invenção descrita aqui são ilustrativas dos princípios da presente invenção. Outras modificações que podem ser empregadas estão dentro do escopo da invenção. Desse modo, por via de exemplo, porém não de limitação, configurações alternativas da presente invenção podem ser utilizadas de acordo com os ensinos desta. Conseqüentemente, a presente invenção não está limitada a isto precisamente como mostrado e descrita.

REIVINDICAÇÕES:

1. Uso de uma composição de insulina **CARACTERIZADO** pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para a preservação de células produtoras de insulina em um paciente 5 não dependente de insulina com um distúrbio relacionado com a insulina, em que pelo menos uma dose do referido medicamento seja administrada ao referido paciente e onde o referido medicamento imita uma resposta de insulina de fase precoce relacionada com a refeição fisiológica e preserve a 10 função das referidas células produtoras de insulina.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido paciente é selecionado do grupo consistindo em um diabético tipo 1 na fase de lua de mel, um pré-diabético ou um recipiente de um 15 transplante de célula produtora de insulina.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido medicamento é oralmente administrado.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 1, 20 **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido medicamento é inalado.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido medicamento compreende uma formulação de pó seco.

25 6. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido medicamento é administrado em qualquer refeição contendo mais de 15 g de carboidrato.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido medicamento compreende uma dose de insulina suficiente para reduzir os níveis de soro de pró-insulina.

5 8. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido medicamento compreende uma dose de insulina suficiente para controlar as excursões de glicose.

9. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 ou 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a referida dose 10 é suficiente para controlar os níveis de glicose no sangue.

10. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 ou 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a referida dose 15 é suficiente para reduzir a liberação de glicose do fígado.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido medicamento induz um máximo em níveis de insulina no soro dentro de cerca de 15 minutos de administração.

20 12. Uso, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido nível de insulina máximo no soro é pelo menos 60 mU/L.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a referida composição de insulina 25 compreende uma dicetopiperazina de fumarila (FDKP) associada com insulina.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a referida dose está dentro

da faixa equivalente a cerca de 15 IU a cerca de 90 IU de insulina de FDKP.

15. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido paciente é também tratado com um sensibilizante de insulina ou um secretagogo de insulina.

16. Uso de uma composição de insulina **CARACTERIZADO** pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para redução da tensão pancreática pós-prandial em uma paciente não dependente de insulina tendo um distúrbio relacionado com a insulina, em que pelo menos uma dose do referido medicamento é administrada ao referido paciente e o referido medicamento imita a resposta de insulina de fase precoce relacionada com a refeição fisiológica, a referida dose suficiente para controlar os níveis de glicose no sangue e reduzir os níveis de soro de pró-insulina, e por meio da qual a tensão pancreática é atenuada.

17. Uso de uma composição de insulina **CARACTERIZADO** pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para longevidade crescente de um transplante de célula produtora de insulina em um recipiente de transplante, em que pelo menos uma dose do referido medicamento é administrada ao referido recipiente de transplante e referido medicamento imita a resposta de insulina de fase precoce relacionada com a refeição fisiológica, a referida dose suficiente para controlar os níveis de glicose no sangue e reduzir os níveis de soro de pró-insulina, por meio da qual a tensão pancreática é atenuada e a longevidade de células produtoras

de insulina é obtida.

18. Uso de uma composição de insulina **CARACTERIZADO** pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para preservar a função de células produtoras de insulina em uma paciente não dependente de insulina tendo um distúrbio relacionado com a insulina, em que é administrada pelo menos uma dose do referido medicamento ao referido paciente e um medicamento imunossupressor, o referido medicamento imitando uma resposta de insulina de fase precoce relacionada com a refeição fisiológica, onde o referido medicamento e o referido medicamento imunossupressor retardam uma resposta auto-imune.

19. Composição útil para a preservação de células produtoras de insulina em um paciente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende uma formulação de insulina de liberação controlada.

20. Composição útil para a preservação de células produtoras de insulina em um paciente, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende uma preparação de início prolongado incluindo uma formulação de insulina.

21. Uso de uma composição de insulina **CARACTERIZADO** pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para preservar a função de células produtoras de insulina em um paciente não dependente de insulina com um distúrbio relacionado com a insulina selecionado do grupo consistindo em diabéticos tipo 1 na fase de lua de mel, pré-diabéticos e recipientes de transplante de células produtoras de insulina, em que pelo menos uma dose do referido me-

dicamento é administrada ao referido paciente, e o referido medicamento imita uma resposta de insulina de fase precoce relacionada com a refeição fisiológica e preserva a função das referidas células produtoras de insulina.

5 22. Uso de uma composição de insulina
CARACTERIZADO pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para preservar a função de células produtoras de insulina em um paciente tendo um distúrbio relacionado com a insulina, o referido paciente não tendo sido tratado com uma
10 composição de insulina diferente de insulina basal com uma dose de insulina, em que pelo menos uma dose do referido medicamento é administrada ao referido paciente em uma refeição e o referido medicamento imita uma resposta de insulina de fase precoce relacionada com a refeição fisiológica e
15 preserva a função das referidas células produtoras de insulina no referido paciente.

23. Uso de uma composição de insulina
CARACTERIZADO pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para preservar a função de células produtoras de insulina em um paciente tendo um distúrbio relacionado com a insulina, o referido paciente tendo perdido a liberação de insulina de fase precoce e tendo um nível de hemoglobina glicada no soro (HbA1c) menor do que 8%, com uma dose de insulina, em que pelo menos uma dose do referido medicamento é
20 administrada ao referido paciente em uma refeição e o referido medicamento imita uma resposta de insulina de fase precoce relacionada com a refeição fisiológica e preserva a
25 função das referidas células produtoras de insulina no refe-

rido paciente.

24. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido medicamento é administrado com qualquer refeição contendo mais do que 15 g de carboidrato.

25. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido paciente não está em um regime de insulina prandial.

10 26. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido paciente tem níveis de pró-insulina de soro elevado.

27. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido paciente tem amplitude média elevada de excursões de glicose.

15 28. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido paciente tem evidência de tensão oxidativa elevada.

29. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido nível de soro 20 HbA1c é menor do que 7%.

30. Uso, de acordo com a reivindicação 28, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido nível de soro HbA1c é menor do que 6,5%.

FIG. 1

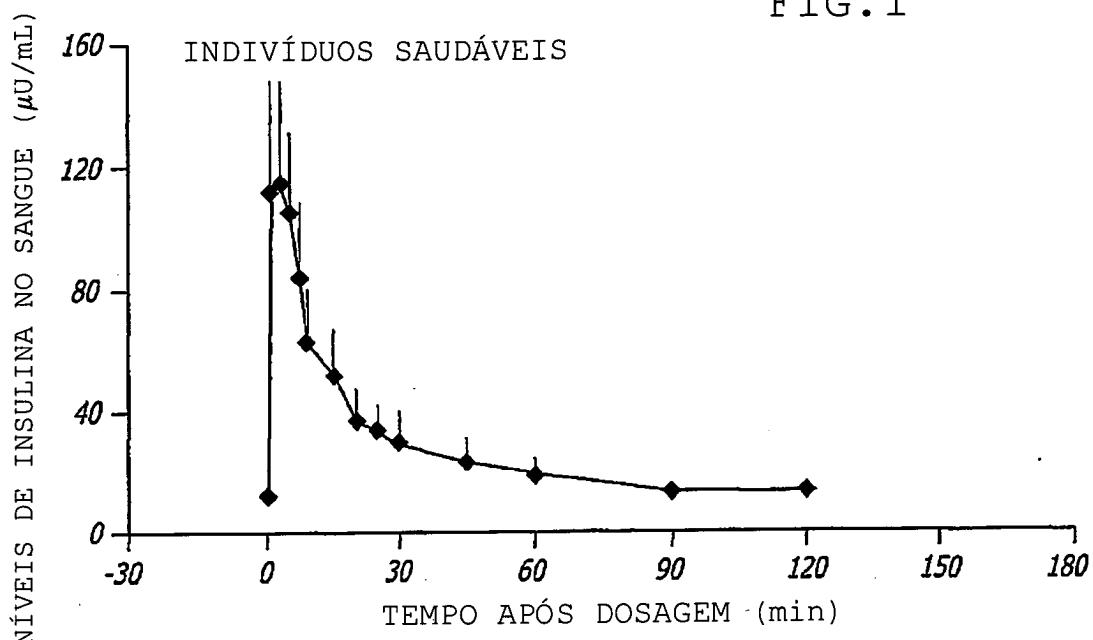
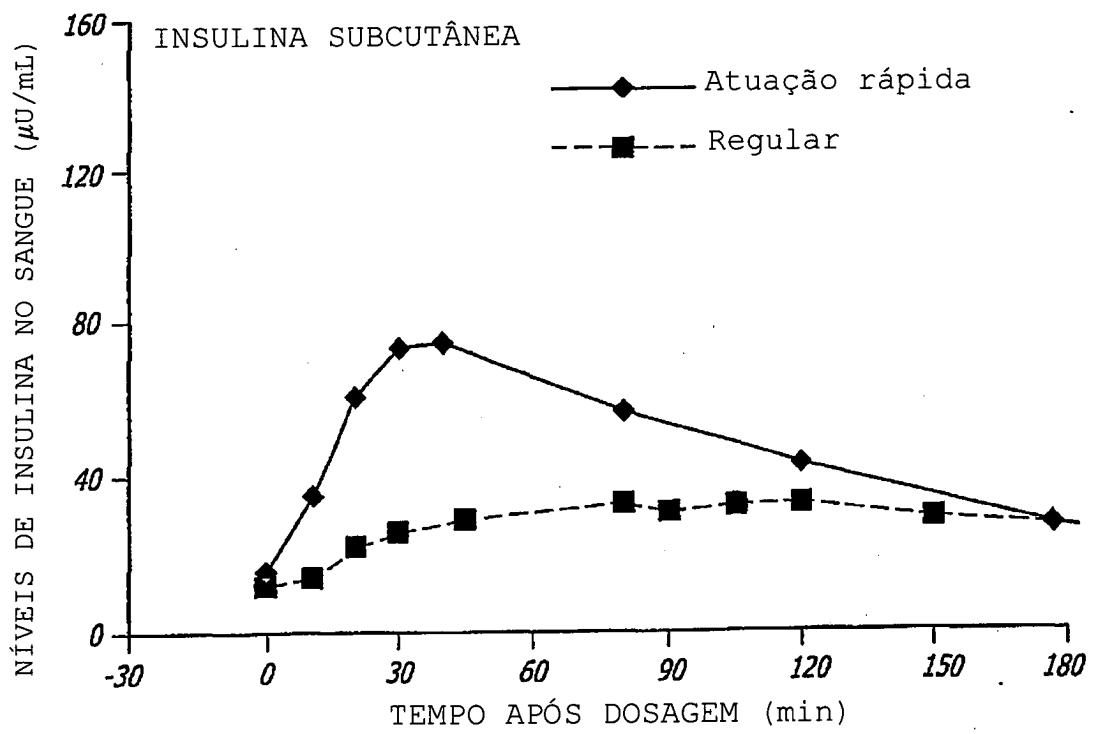
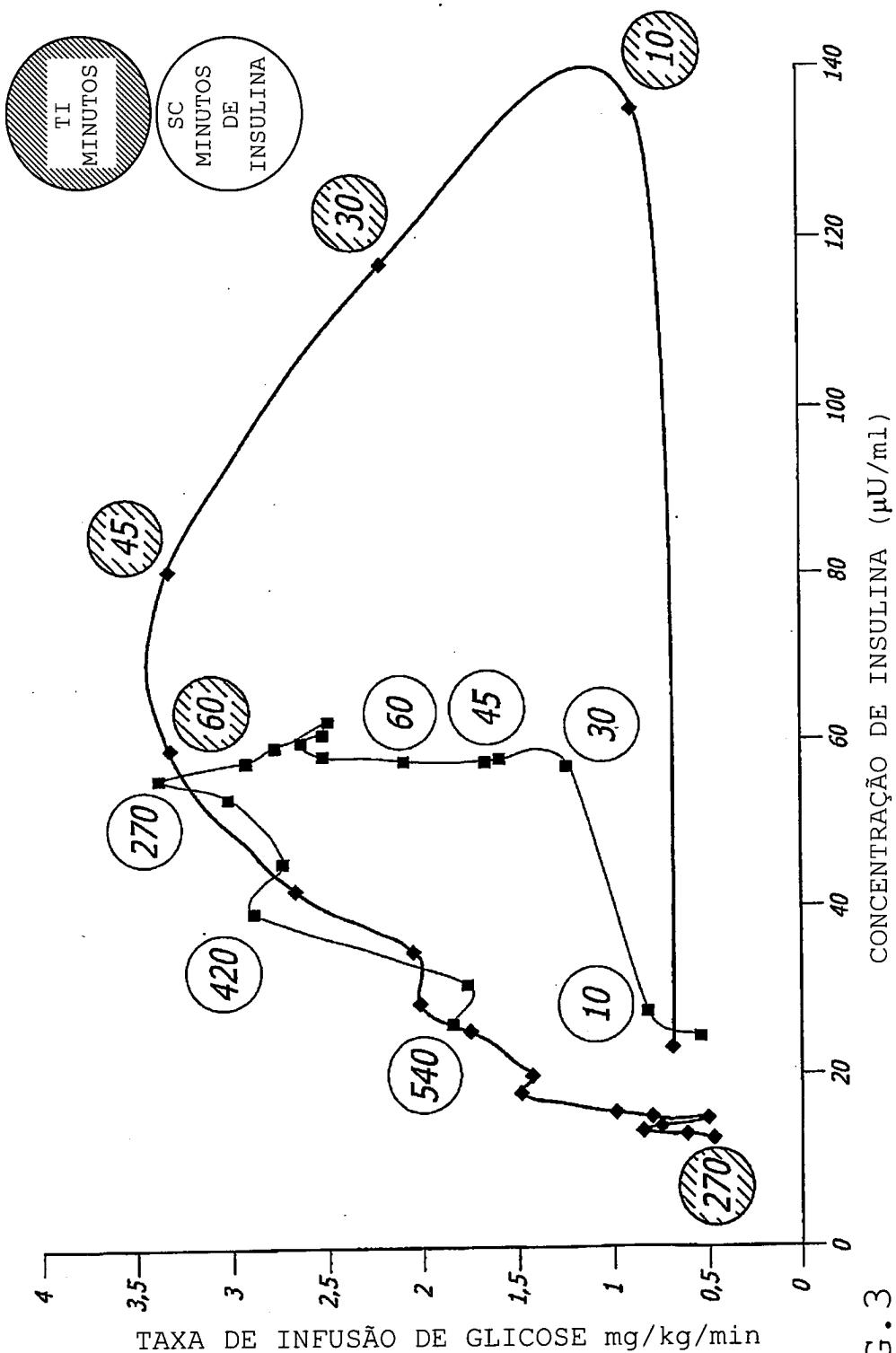


FIG. 2





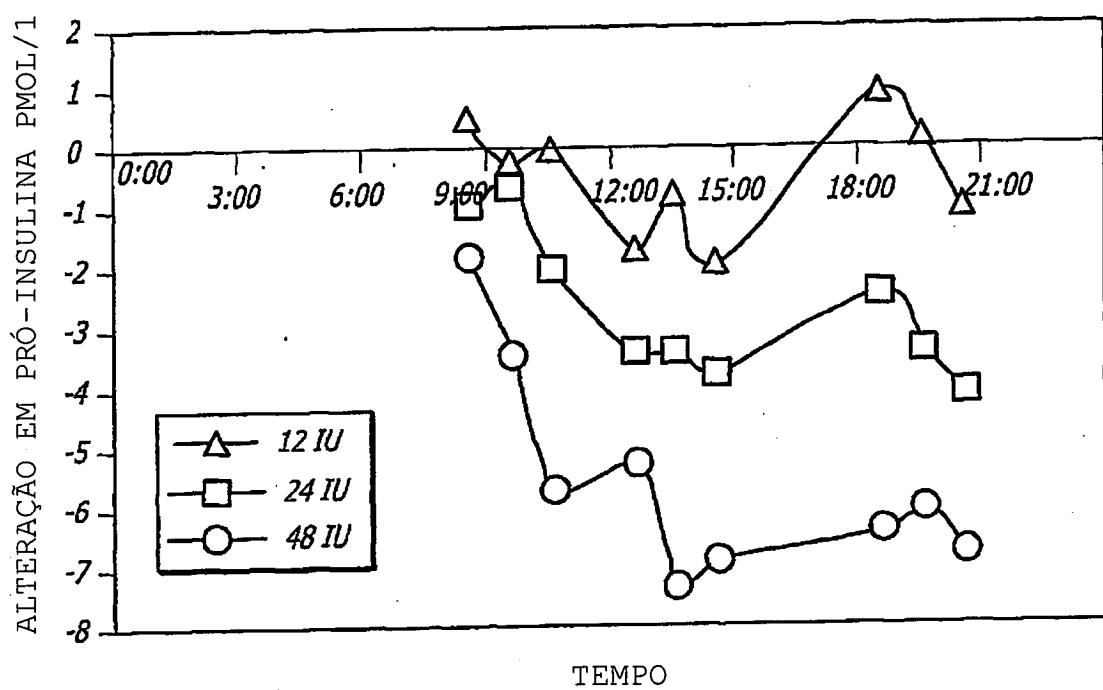


FIG. 4

PI0614489-6

RESUMO:

"MÉTODO PARA PRESERVAR A FUNÇÃO DE CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA"

Métodos e composições para preservar a função de 5 células produtoras de insulina e para aumentar o período de vida de células produtoras de insulina nos pacientes não dependentes de insulina com distúrbio relacionado com a insulina, são fornecidos.