



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

(21) BR 112019018989-0 A2



(22) Data do Depósito: 13/03/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 14/04/2020

(54) Título: NANOPARTÍCULAS À BASE DE LIPÍDEO COM ESTABILIDADE MELHORADA

(51) Int. Cl.: A61K 38/28; A61K 47/24; A61K 47/28; A61K 9/127.

(30) Prioridade Unionista: 13/03/2017 US 62/470,478.

(71) Depositante(es): SDG, INC..

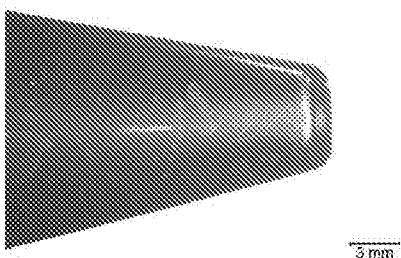
(72) Inventor(es): W. BLAIR GEHO.

(86) Pedido PCT: PCT US2018022182 de 13/03/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/169954 de 20/09/2018

(85) Data da Fase Nacional: 12/09/2019

(57) Resumo: A invenção fornece uma nanopartícula à base de lipídeo aperfeiçoada, que pode ser utilizada para fornecer um agente terapêutico a um sujeito, como, mas não limitado a um mamífero, como, mas não limitado a um ser humano. Em certas modalidades, a nanopartícula da invenção possui propriedades de agregação reduzidas em comparação com as ensinadas na técnica anterior.



“NANOPARTÍCULAS À BASE DE LIPÍDEO COM ESTABILIDADE MELHORADA”

REFERÊNCIA CRUZADA AO PEDIDO RELACIONADO

[001]Este pedido reivindica prioridade de acordo com 35 U.S.C. §119 (e) do Pedido de Patente Provisório U.S. Nº 62/470.478, depositado em 13 de março de 2017, que é aqui incorporado por referência na sua totalidade.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002]As nanopartículas fosfolipídicas de diâmetro inferior a cerca de 100 nm são frequentemente utilizadas como portadores para melhorar a liberação *in vivo* de ingredientes farmacêuticos ativos (APIs), como peptídeos e aminas biogênicas. O tamanho de partícula pequeno das nanopartículas (o que é comparável às dos vírus pequenos) permite-lhes atravessar facilmente as barreiras de membrana. Além disso, as nanopartículas podem fornecer a liberação rápida e específica de APIs para os receptores desejados da superfície celular, resultando em ação farmacológica melhorada e necessidade de menores doses de API. A liberação de API alvo também leva à diminuição da toxicidade, por causa da liberação reduzida de API para os tecidos não desejados no corpo.

[003]Um exemplo de tais nanopartículas é a vesícula de liberação hepática (HDV), a qual compreende um componente de direcionamento de hepatócitos e liberação dos APIs aos receptores hepáticos. Em contraste, as nanopartículas sem um componente de direcionamento de hepatócitos geralmente acumulam-se em macrófagos do fígado chamados células de Kupffer, juntamente com outras células de macrófagos no corpo.

[004]O diabetes mellitus, englobando as formas Tipo I e Tipo II, é um distúrbio que afeta um grande número de pessoas em todo o mundo. O tratamento de diabetes mellitus compreende a normalização dos níveis de glicose no sangue no sujeito, e isso pode exigir múltiplas injeções diárias de um produto à base de insulina. Apesar

da presença de vários produtos à base de insulina no mercado, ainda há necessidade de novas formulações contendo insulina que controlem os níveis sanguíneos de glicose no indivíduo por um longo período de tempo.

[005]A maioria dos fármacos aprovados para o tratamento do diabetes mellitus comprehende um análogo da insulina que deve ser administrado por via subcutânea, geralmente como uma formulação de liberação temporal. Esta administração libera o análogo da insulina para os tecidos periféricos, mas geralmente não para o fígado. Em um aspecto, o tratamento adequado do diabetes mellitus requer uma formulação à base de insulina, na qual uma porção da insulina dosada é liberada nos tecidos periféricos ao longo do dia e outra porção da insulina dosada é direcionada para a liberação no fígado. Tal necessidade estende-se bem a outros agentes terapêuticos para os quais a liberação direcionada no fígado tem propriedades farmacológicas e/ou terapêuticas vantajosas.

[006]Existe, portanto, uma necessidade não atendida na técnica de composições e métodos para administrar um agente terapêutico a um sujeito, de modo que o agente terapêutico seja liberado aos tecidos periféricos, bem como ao fígado do sujeito. Tais agentes terapêuticos comprehendem, em um exemplo não limitativo, insulina ou qualquer análogo da mesma, que pode ser utilizado para gerenciar os níveis de glicose no sangue em doentes diabéticos Tipo I e Tipo II. A presente invenção atende a esta necessidade.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[007]A invenção fornece uma composição compreendendo uma nanopartícula à base de lipídeo. A invenção comprehende ainda um método de preparação de nanopartículas à base de lipídeos da invenção. A invenção fornece ainda um método de tratamento de uma doença em um mamífero. A invenção fornece ainda um método de ativação da glicogênio sintase hepática em um mamífero.

[008]Em certas modalidades, a nanopartícula é envolvida por uma membrana

lipídica bipolar. Em outras modalidades, a membrana compreende colesterol, fosfato de dicetila, um lipídeo anfipático e uma molécula de ligação ao receptor de hepatócito. Em ainda outras modalidades, o lipídeo anfipático compreende pelo menos um selecionado do grupo que consiste em 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocololina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-[3-fosfo-rac-(1-glicerol)], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinil), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato e 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina. Em ainda outras modalidades, a membrana compreende pelo menos um agente selecionado do grupo que consiste em um estabilizador e estearoil lisofosfatidilcolina. Em ainda outras modalidades, o estabilizador é selecionado do grupo que consiste em m-cresol, álcool benzílico, 4-hidroxibenzoato de metila, tiomersal e hidroxitolueno (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol) butilado. Em ainda outras modalidades, o estabilizador varia de cerca de 10 % a cerca de 25 % (p/p) na membrana. Em ainda outras modalidades, a estearoil lisofosfatidilcolina varia de cerca de 5 % a cerca de 30 % (p/p) na membrana. Em ainda outras modalidades, a pelo menos uma molécula de ligação ao receptor de hepatócito se estende para fora da nanopartícula. Em ainda outras modalidades, o tamanho da nanopartícula varia de cerca de 10 nm a cerca de 150 nm.

[009]Em certas modalidades, a nanopartícula é envolvida por uma membrana lipídica bipolar. Em outras modalidades, a membrana compreende colesterol, fosfato de dicetila, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocololina (DSPC) e fosfato de 2,3-diacetoxipropil 2-(5-((3aS,6aR)-2-oxo-hexa-hidro)-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)etila (DHPE de biotina). Em ainda outras modalidades, a membrana compreende ainda pelo menos um agente selecionado do grupo que consiste em estearoil lisofosfatidilcolina e m-cresol. Em ainda outras modalidades, a membrana compreende colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina, m-

cresol e biotina-DHPE em uma razão de % (p/p) selecionada do grupo que consiste em: (a) cerca de 9,4 : 18,1 : 56,8 : 14,1 : 0,0 : 1,5; (b) cerca de 7,7 : 15,0 : 58,6 : 0,0 : 17,4 : 1,3; e (c) cerca de 8,4 : 16,2 : 47,5 : 7,6 : 19,0 : 1,3. Em ainda outras modalidades, o biotina-DHPE se estende para fora da nanopartícula. Em ainda outras modalidades, o tamanho da nanopartícula varia de cerca de 10 nm a cerca de 150 nm.

[010]Em certas modalidades, um agente terapêutico está disperso dentro da nanopartícula. Em outras modalidades, o agente terapêutico está covalentemente ligado à nanopartícula. Em ainda outras modalidades, o agente terapêutico não está covalentemente ligado à nanopartícula. Em ainda outras modalidades, a nanopartícula está suspensa em uma solução aquosa compreendendo um agente terapêutico dissolvido livre que não está disperso dentro da nanopartícula. Em ainda outras modalidades, o agente terapêutico compreende pelo menos um selecionado do grupo que consiste em insulina, análogos da insulina, interferon, hormônio da paratireoide, calcitonina, serotonina, agonista da serotonina, inibidor da recaptação da serotonina, hormônio do crescimento humano, GIP, anticorpo monoclonal anti-GIP, metformina, bromocriptina, dopamina, glucagon, amilina e GLP-1. Em ainda outras modalidades, o agente terapêutico é insulina. Em ainda outras modalidades, a insulina dispersa em nanopartículas e a insulina dissolvida livre são selecionadas independentemente do grupo que consiste em insulina lispro, insulina aspártica, insulina regular, insulina glargina, insulina zinco, suspensão prolongada de insulina humana zinco, insulina isofana, insulina regular tamponada humana, insulina glulisina, insulina regular humana recombinante, insulina isofana humana recombinante e quaisquer combinações dos mesmos.

[011]Em certas modalidades, o lipídeo anfipático compreende pelo menos um selecionado do grupo que consiste em 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocololina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocololina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-

glicerol)], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina e 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinil).

[012]Em certas modalidades, a molécula de ligação ao receptor de hepatócito compreende biotina.

[013]Em certas modalidades, a molécula de ligação ao receptor de hepatócito contendo biotina compreende pelo menos um selecionado do grupo que consiste em biotina N-hidroxissuccinimida (NHS); sulfo-NHS-biotina; biotina de cadeia longa de N-hidroxissuccinimida; biotina de cadeia longa de sulfo-N-hidroxissuccinimida; D-biotina; biocitina; sulfo-N-hidroxissuccinimida-S-S-biotina; biotina-BMCC; biotina-HPDP; iodoacetil-LC-biotina; biotina-hidrazida; biotina-LC-hidrazida; biocitina hidrazida; biotina cadaverina; carboxibiotina; fotobiotina; trifluoroacetato de ρ -aminobenzoil-biocitina; ρ -diazobenzoil-biocitina; biotina-DHPE fosfato de (2,3-diacetoxipropil 2-(5-((3aS,6aR)-2-oxo-hexa-hidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)etila); biotina-X-DHPE fosfato de (2,3-diacetoxipropil 2-(6-(5-((3aS,6aR)-2-oxo-hexa-hidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamido))etila); ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico; éster succinimidílico do ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico; S-biotinil homocisteína; biocitina-X; biocitina x-hidrazida; biotinetilenodiamina; biotina-XL; biotina-X-etilenodiamina; biotina-XX hidrazida; biotina-XX-SE; biotina-XX, SSE; biotina-X-cadaverina; biocitina α -(t-BOC); N-(biotinil)-N'-(iodoacetyl)etilenodiamina; DNP-X-biocitina-X-SE; biotina-X-hidrazida; cloridreto de norbiotinamina; 3-(N-maleimidilpropionil)biocitina; ARP; biotina-1-sulfóxido; biotina éster metílico; biotina-maleimida; biotina-poli(etilenoglicol)amina; (+) biotina sal de sódio do ácido 4-amidobenzoico; biotina 2-N-acetilamino-2-desóxi- β -D-glucopiranósido; biotina- α -D-N-acetylneuraminida; biotina- α -L-fucosídeo; biotina lacto-N-biosídeo; biotina-Lewis-A trissacarídeo; biotina-Lewis-Y tetrassacarídeo; biotina- α -D-manopiranósídeo; e biotina 6-O-fosfo- α -D-manopiranósídeo. Em outras modalidades, a molécula de ligação ao receptor de hepatócito contendo biotina é

biotina-DHPE. Em ainda outras modalidades, a molécula de ligação ao receptor de hepatócito contendo biotina é biotina-X-DHPE. Em ainda outras modalidades, a molécula de ligação ao receptor de hepatócito contendo biotina compreende pelo menos um selecionado do grupo que consiste em biotina-DHPE e biotina-X-DHPE.

[014]Em certas modalidades, a composição compreende ainda ftalato de acetato de celulose, que é pelo menos parcialmente ligado ao agente terapêutico disperso dentro da nanopartícula.

[015]Em certas modalidades, a composição compreende ainda pelo menos uma molécula orgânica carregada associada ao agente terapêutico disperso na nanopartícula, em que a molécula orgânica carregada é pelo menos um selecionado do grupo que consiste em protaminas, polilisina, poli (arg-pro-thr)*n* em uma razão molar de 1 : 1 : 1, poli (DL-Ala-poli-L-lis)*n* em uma razão molar de 6 : 1, histonas, polímeros de açúcar compreendendo um grupo amino primário, polinucleotídeos com grupos amino primários, proteínas que compreendem resíduos de aminoácidos com grupos funcionais carboxila (COO⁻) ou sulfidral (S⁻) e polímeros ácidos.

[016]Em certas modalidades, o colesterol varia de cerca de 5 % a cerca de 15 % (p/p) na membrana.

[017]Em certas modalidades, o fosfato de dicetila varia de cerca de 10 % a cerca de 25 % (p/p) na membrana.

[018]Em certas modalidades, o DSPC varia de cerca de 40 % a cerca de 75 % (p/p) na membrana.

[019]Em certas modalidades, a molécula de ligação ao receptor de hepatócito varia de cerca de 0,5 % a cerca de 4 % (p/p) na membrana.

[020]Em certas modalidades, a quantidade de estearoil lisofosfatidilcolina na membrana é de cerca de 5 % a 30 % (p/p) da quantidade de DSPC na membrana.

[021]Em certas modalidades, a membrana compreende colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina, m-cresol e pelo menos um selecionado do

grupo que consiste em biotina-DHPE e biotina-X-DHPE.

[022]Em certas modalidades, a membrana compreende colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, m-cresol e pelo menos um selecionado do grupo que consiste em biotina-DHPE e biotina-X-DHPE.

[023]Em certas modalidades, a membrana compreende colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina e pelo menos um selecionado do grupo que consiste em biotina-DHPE e biotina-X-DHPE.

[024]Em certas modalidades, o método compreende o contato em um sistema aquoso de colesterol, fosfato de dicetila, lipídeo anfipático, molécula de ligação ao receptor de hepatócito e pelo menos um agente. Em outras modalidades, o método compreende o contato em um sistema aquoso de colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, biotina-DHPE e o pelo menos um agente. Em ainda outras modalidades, o pelo menos um agente compreende um estabilizador, que é adicionado ao sistema aquoso após colesterol, fosfato de dicetila, lipídeo anfipático, estearoil lisofosfatidilcolina se presente e a molécula de ligação ao receptor de hepatócito terem sido contatados no sistema aquoso. Em ainda outras modalidades, o pelo menos um agente é m-cresol e é adicionado ao sistema aquoso após o colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina se presente e biotina-DHPE terem sido contatados no sistema aquoso. Em ainda outras modalidades, a nanopartícula compreende um agente terapêutico nela disperso. Em ainda outras modalidades, o agente terapêutico, colesterol, fosfato de dicetila, lipídeo anfipático, molécula de ligação ao receptor de hepatócito e pelo menos um agente são simultaneamente contatados no sistema aquoso. Em ainda outras modalidades, o agente terapêutico, colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, pelo menos um agente e biotina-DHPE são simultaneamente contatados no sistema aquoso. Em ainda outras modalidades, a nanopartícula é formada na ausência do agente terapêutico, em que opcionalmente a nanopartícula é pelo menos parcialmente concentrada, purificada ou isolada, e em que o agente

terapêutico é contatado com a nanopartícula, pelo que pelo menos uma porção da terapêutica agente está disperso dentro da nanopartícula. Em ainda outras modalidades, a nanopartícula comprehende um agente terapêutico nela disperso.

[025]Em certas modalidades, o método comprehende administrar ao mamífero em necessidade do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição da invenção. Em outras modalidades, a doença é diabetes mellitus e o agente terapêutico comprehende insulina.

[026]Em certas modalidades, o método comprehende administrar ao mamífero em necessidade do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição da invenção, em que o agente terapêutico comprehende insulina. Em outras modalidades, o mamífero tem diabetes mellitus.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[027]Para os fins de ilustrar a invenção, são representadas nos desenhos certas modalidades da invenção. No entanto, a invenção não se limita aos arranjos e instrumentos precisos das modalidades representadas nos desenhos.

[028]As FIGS. 1A e 1B ilustram uma imagem de um frasco de vidro comprehendendo nanopartículas à base de lipídeos não limitativas da invenção. FIG. 1A: A grande maioria das nanopartículas não é visível na imagem devido ao seu tamanho pequeno (<100 nm). Os agregados de nanopartículas visíveis, que podem ser rompidos, são de cerca de 1 a 3 mm. A FIG. 1B é uma ampliação de uma seção selecionada da FIG. 1A.

[029]A FIG. 2 comprehende um gráfico que ilustra os resultados selecionados de um teste de tolerância à glicose oral em cães com deficiência de insulina. As formulações A (-▲-) e B (-●-) foram comparadas com a Lispro-insulina de controle (-■-) (0,125 U/kg).

[030]A FIG. 3 comprehende um gráfico que ilustra várias concentrações de ingredientes (em mg/mL) nas composições da invenção, em função da % de

lisolecitina (ou lisofosfatidilcolina) na composição inicial. O gráfico ilustra o efeito da concentração inicial de lisolecitina na estabilidade da composição.

[031]A FIG. 4 comprehende um gráfico que ilustra a redução da lisolecitina formada (em mg/mL de HDV em massa) na função da % de lisolecitina da concentração total de lecitina. O gráfico ilustra o efeito da concentração inicial de lisolecitina na produção de lisolecitina ao longo do tempo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[032]A invenção refere-se em parte a uma nanopartícula à base de lipídeo aperfeiçoada, que pode ser utilizada para liberar um agente terapêutico a um sujeito, como, mas não limitado a um mamífero, como, mas não limitado a um ser humano. Em certas modalidades, a nanopartícula da invenção teve as propriedades de agregação reduzidas ou minimizadas em comparação com aquelas ensinadas na técnica anterior, tais como, mas não limitadas àquelas referidas no Pedido de Patente U.S. Nós US20110135725 e US20090087479, todos aqui incorporados na sua totalidade por referência. Em outras modalidades, as propriedades de agregação reduzidas ou minimizadas da nanopartícula da invenção melhoram a sua estabilidade e evolutividade farmacêutica em comparação com nanopartículas da técnica anterior.

[033]Em certas modalidades, a nanopartícula à base de lipídeo da invenção é definida e/ou envolvida por uma membrana lipídica bipolar. Em outras modalidades, a nanopartícula da invenção comprehende um composto de direcionamento de hepatócitos, o que ajuda a liberar o agente terapêutico associado com, e/ou disperso no interior da nanopartícula para um hepatócito. Em ainda outras modalidades, a nanopartícula da invenção é parte de uma composição que comprehende ainda um agente terapêutico “livre”, que não está associado com, e/ou disperso no interior da nanopartícula. A nanopartícula e quaisquer composições comprehendendo a mesma, pode ser administrada por quaisquer vias compatíveis e/ou viáveis, tais como, mas não limitadas a por injeção (tal como, por exemplo, por via subcutânea e/ou por via

transdérmica), inalação, via bucal e/ou oral, assim como para o tratamento de um sujeito que se beneficia com a administração do agente terapêutico associado com, e/ou disperso no interior da nanopartícula, e/ou do agente terapêutico “livre”, que não está associado com, e/ou disperso dentro da nanopartícula.

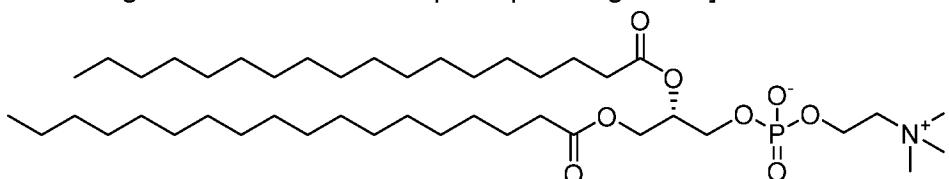
[034]Os lipossomas geralmente compreendem materiais fosfolipídicos anfipáticos que formam membranas de bicamada que definem e/ou envolvem os lipossomas. Eles podem ter uma única membrana (unilamelar) ou múltiplas bicamadas com aparência microscópica de cebola. Os lipossomas podem ser bastante grandes, medindo vários mícrons de diâmetro. Os lipossomas têm, geralmente, uma forma esférica (ou quase esférica), em que a superfície intacta não possui extremidades “abertas” disponíveis e, portanto, não pode interagir com outros lipossomas de extremidade “aberta” disponíveis para sofrer agregação de partícula.

[035]Em contraste, as nanopartículas fosfolipídicas com diâmetros iguais ou inferiores a cerca de 200 nm têm uma capacidade restrita de adaptar-se para uma configuração esférica, que deve, em princípio, ser sua estrutura termodinamicamente estável. Como resultado, estas nanopartículas de baixo diâmetro não formam uma partícula perfeitamente esférica, mas sim uma folha quase plana. Sem desejar estar limitado por qualquer teoria, as folhas quase planas podem ser descritas como “nanodiscos” ou “nanoFrisbees” ou “bicelles”. Estas nanopartículas têm extremidades “abertas” em suas membranas, e estas “extremidades” atuam como pontos pegajosos que podem promover a agregação de nanopartículas. Como resultado, em muitos casos, as nanopartículas são geradas na forma de partículas distintas que, em seguida, agregam-se em partículas flutuantes maiores e facilmente visíveis (delgadas ou semelhantes a penas). Este fenômeno pode dificultar o desenvolvimento das nanopartículas de baixo diâmetro como agentes de liberação de fármacos. Em certas modalidades, ao contrário do caso dos lipossomas, o API não é transportado no volume central (ou dentro) das bicelas. Em outras modalidades, o API está anexado

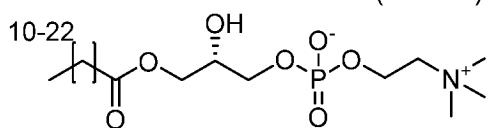
e/ou ligado à superfície da membrana das bicelas, por meio de uma interação puramente física ou de uma ligação covalente. Em um aspecto, a presente invenção resolve este problema, proporcionando composições e métodos que permitem fechar as extremidades “abertas” das folhas quase planas (nanodiscos e/ou nanoFrisbees) e, assim, minimizar ou suprimir a sua tendência para se auto-agregarem.

[036]Como aqui descrito, as nanopartículas à base de lipídeos da invenção são úteis como produtos farmacêuticos portadores, e não formam as estruturas delgadas tipo penas descritas aqui noutro local. Em certas modalidades, as nanopartículas da invenção compreendem certos lipídeos anfipáticos e/ou certas moléculas orgânicas que permitem que as extremidades “abertas” das membranas planares de nanopartículas sejam alteradas de uma forma que impeça a agregação das nanopartículas.

[037]Em certas modalidades, o fechamento apropriado das extremidades “abertas” da nanopartícula à base de lipídeo é promovido através da substituição de uma porção de diestearoil fosfatidilcolina [também conhecido como fosfato de (S)-2,3-bis(estearylóxi)propil(2-(trimetilamônio)etila) ou DSPC, que compreende dois grupos acila C₁₈ ligados covalentemente a uma estrutura principal de glicerol] com uma acil lisofatidilcolina C₁₂-C₂₄ [também conhecida como acil lisolecitina C₁₂-C₂₄ ou 1-(acila C₁₂-C₂₄)-sn-glicero-3-fosfocolina ou fosfato de (S)-2-hidróxi-3-(acilóxi C₁₂-C₂₄)propil (2-(trimetilamônio)etila), que compreende um único grupo acila C₁₂-C₂₄ covalentemente ligado a uma estrutura principal de glicerol]:

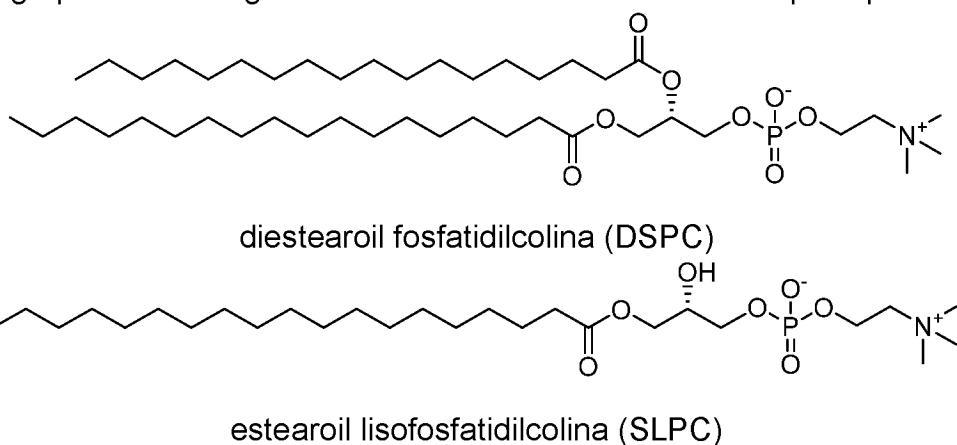


diestearoil fosfatidilcolina (DSPC)



acil lisofatidilcolina C₁₂-C₂₄

[038] Em certas modalidades, o fechamento apropriado das extremidades “abertas” da nanopartícula à base de lipídeo é promovido através da substituição de uma porção de diestearoil fosfatidilcolina [também conhecido como fosfato de (S)-2,3-bis(estearoilóxi)propil(2-(trimetilamônio)etila) ou DSPC, que compreende dois grupos acila C₁₈ ligados covalentemente a uma estrutura principal de glicerol] com estearoil lisofosfatidilcolina [também conhecido como 1-esterol-sn-glicero-3-fosfocololina ou fosfato de (S)-2-hidróxi-3-(estearoilóxi)propil(2-(trimetilamônio)etila), que compreende um único grupo acila C₁₈ ligado covalentemente a uma estrutura principal de glicerol]:



[039] Em certas modalidades, quando incorporada na membrana, uma acil lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄ (tal como, mas não limitada a estearoil lisofatidilcolina) impede e/ou minimiza a agregação que ocorre quando este composto é omitido da membrana. Em outras modalidades, a acil lisofatidilcolina C₁₂-C₂₄ (tal como, mas não limitada a estearoil lisofatidilcolina), com a sua cadeia alifática única, permite o fechamento de qualquer “extremidade” da membrana existente na nanopartícula.

[040] Em certas modalidades, quando incorporados na membrana, qualquer um dos estabilizadores de moléculas pequenas ou quaisquer sais e/ou solvatos dos mesmos, como, mas não limitado a m-cresol, álcool benzílico, 4-hidroxibenzoato de metila, tiomersal e hidroxitolueno butilado (também conhecido como 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol) impedem e/ou minimizam a agregação que ocorre quando este composto é omitido da membrana. Em outras modalidades, os pequenos estabilizadores de moléculas ou quaisquer sais e/ou solvatos dos mesmos permitem o fechamento de

quaisquer “extremidades” da membrana existentes da nanopartícula.

[041]Em certas modalidades, quando incorporados na membrana, quaisquer combinações de certos estabilizadores de molécula pequena ou quaisquer sais e/ou solvatos dos mesmos, e a acil lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄, impedem e/ou minimizam a agregação que ocorre quando este composto é omitido da membrana.

Composições

[042]A invenção fornece nanopartículas à base de lipídeos e composições compreendendo as mesmas. Em certas modalidades, a nanopartícula compreende e/ou é definida por uma membrana lipídica bipolar.

[043]Em certas modalidades, a membrana compreende colesterol. Em outras modalidades, a membrana compreende fosfato de dicetila. Em ainda outras modalidades, a membrana compreende um lipídeo anfipático. Em ainda outras modalidades, a membrana compreende 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocololina (DSPC). Em ainda outras modalidades, a membrana compreende colesterol, fosfato dicetila e DSPC. Em ainda outras modalidades, a membrana compreende uma molécula de ligação ao receptor de hepatócito.

[044]Em certas modalidades, o lipídeo anfipático compreende pelo menos um selecionado do grupo que consiste em 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocololina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-[3-fosfo-rac-(1-glicerol)], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinil), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato e 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina. Em outras modalidades, o lipídeo anfipático compreende pelo menos um selecionado do grupo que consiste em 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocololina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocololina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina e 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinil).

[045]Em certas modalidades, a molécula de ligação ao receptor de hepatócito compreende biotina. Em outras modalidades, a molécula de ligação ao receptor de hepatócito contendo biotina compreende pelo menos um selecionado do grupo que consiste em biotina de N-hidroxissuccinimida (NHS); sulfo-NHS-biotina; biotina de cadeia longa de N-hidroxissuccinimida; biotina de cadeia longa de sulfo-N-hidroxissuccinimida; D-biotina; biocitina; sulfo-N-hidroxissuccinimida-S-S-biotina; biotina-BMCC; biotina-HPDP; iodoacetil-LC-biotina; biotina-hidrazida; biotina-LC-hidrazida; biocitina hidrazida; biotina cadaverina; carboxibiotina; fotobiotina; trifluoroacetato de p-aminobenzoil-biocitina; p-diazobenzoil-biocitina; biotina-DHPE fosfato de (2,3-diacetoxipropil 2-(5-((3aS,6aR)-2-oxo-hexa-hidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)etila); biotina-X-DHPE fosfato de (2,3-diacetoxipropil 2-(6-((3aS,6aR)-2-oxo-hexa-hidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamido)etila); ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico; éster succinimidílico do ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico; S-biotinil homocisteína; biocitina-X; biocitina x-hidrazida; biotinetilenodiamina; biotina-XL; biotina-X-etenodiamina; biotina-XX hidrazida; biotina-XX-SE; biotina-XX, SSE; biotina-X-cadaverina; biocitina α-(t-BOC); N-(biotinil)-N'-(iodoacetil) etilenodiamina; DNP-X-biocitina-X-SE; biotina-X-hidrazida; cloridreto de norbiotinamina; 3-(N-maleimidilpropionil)biocitina; ARP; biotina-1-sulfóxido; biotina éster metílico; biotina-maleimida; biotina-poli(etilenoglicol)amina; (+) biotina sal de sódio do ácido 4-amidobenzoico; biotina 2-N-acetilamino-2-desóxi-β-D-glucopiranósido; biotina-α-D-N-acetylneuraminida; biotina-α-L-fucosídeo; biotina lacto-N-biosídeo; biotina-Lewis-A trissacarídeo; biotina-Lewis-Y tetrassacarídeo; biotina-α-D-manopiranosídeo; e biotina 6-O-fosfo-α-D-manopiranosídeo.

[046]Em certas modalidades, a molécula de ligação ao receptor de hepatócito é selecionada do grupo que consiste em 2,3-diacetoxipropil 2-(5-((3aS,6aR)-2-oxo-hexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido) fosfato de etila (biotina DHPE) e

biotina-X-DHPE (2,3-diacetoxipropil 2-(6-(5-((3aS,6aR)-2-oxo-hexa-hidro-1H-tieno[3,4 -d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamido) fosfato de etila).

[047]Em certas modalidades, o colesterol varia de cerca de 5 % a cerca de 15 % (p/p) na membrana. Em outras modalidades, o colesterol está presente na membrana a uma concentração de cerca de 5 %, 5,5 %, 6 %, 6,5 %, 7 %, 7,5 %, 8 %, 8,5 %, 9,5 %, 9,5 %, 10 %, 10,5 %, 11 %, 11,5 %, 12 %, 12,5 %, 13 %, 13,5 %, 14 %, 14,5 % ou 15 % (p/p).

[048]Em certas modalidades, o fosfato de dicetila varia de cerca de 10 % a cerca de 25 % (p/p) na membrana. Em outras modalidades, o fosfato de dicetila está presente na membrana a uma concentração de cerca de 10 %, 10,5 %, 11 %, 11,5 %, 12 %, 12,5 %, 13 %, 13,5 %, 14 %, 14,5 %, 15 %, 15,5 %, 16 %, 16,5 %, 17 %, 17,5 %, 18 %, 18,5 %, 19 %, 19,5 %, 20 %, 20,5 %, 21 %, 21,5 %, 22 %, 22,5 %, 23 %, 23,5 %, 24 %, 24,5 % ou 25 % (p/p).

[049]Em certas modalidades, o DSPC varia de cerca de 40 % a cerca de 75 % (p/p) na membrana. Em outras modalidades, o DSPC está presente na membrana a uma concentração de cerca de 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 % ou 75 % (p/p).

[050]Em certas modalidades, a molécula de ligação ao receptor de hepatócito varia de cerca de 0,5 % a cerca de 4 % (p/p) na membrana. Em outras modalidades, a molécula de ligação ao receptor de hepatócito está presente na membrana a uma concentração de cerca de 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1,0 %, 1,1 %, 1,2 %, 1,3 %, 1,4 %, 1,5 %, 1,6 %, 1,7 %, 1,8 %, 1,9 %, 2,0 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, 2,5 %, 2,6 %, 2,7 %, 2,8 %, 2,9 %, 3,0 %, 3,1 %, 3,2 %, 3,3 %, 3,4 %, 3,5 %, 3,6 %, 3,7 %, 3,8 %, 3,9 % ou 4,0 % (p/p).

[051]Em certas modalidades, a membrana compreende, pelo menos, um

composto selecionado a partir do grupo consistindo de um estabilizador e uma acil lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄.

[052]Em certas modalidades, a membrana compreende ainda uma acil lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄. Em outras modalidades, a membrana compreende ainda estearoil lisofosfatidilcolina.

[053]Em certas modalidades, a membrana compreende ainda m-cresol.

[054]Em certas modalidades, o estabilizador é selecionado do grupo que consiste em m-cresol, álcool benzílico, 4-hidroxibenzoato de metila, tiomersal e hidroxitolueno (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol) butilado.

[055]Em certas modalidades, o estabilizador varia de cerca de 10 % a cerca de 25 % (p/p) na membrana. Em outras modalidades, o estabilizador está presente na membrana a uma concentração de cerca de 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 % ou 25 % (p/p).

[056]Em certas modalidades, o m-cresol varia de cerca de 10 % a cerca de 25 % (p/p) na membrana. Em outras modalidades, o m-cresol está presente na membrana a uma concentração de cerca de 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 % ou 25 % (p/p).

[057]Em certas modalidades, a C₁₂-C₂₄ lisofosfatidilcolina varia de cerca de 5 % a cerca de 30 % (p/p) na membrana. Em outras modalidades, a lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄ varia de cerca de 1 % a cerca de 30 % (p/p) na membrana. Em ainda outras modalidades, a lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄ está presente na membrana a uma concentração de cerca de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 % ou 30 % (p/p).

[058]Em certas modalidades, a estearoil lisofosfatidilcolina varia de cerca de 5 % a cerca de 30 % (p/p) na membrana. Em outras modalidades, a estearoil lisofosfatidilcolina varia de cerca de 1 % a cerca de 30 % (p/p) na membrana. Em

ainda outras modalidades, a estearoil lisofosfatidilcolina está presente na membrana a uma concentração de cerca de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 % ou 30 % (p/p).

[059]Em certas modalidades, a quantidade de lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄ na membrana é de cerca de 1 % a cerca de 30 % (p/p) da quantidade de DSPC na membrana. Em ainda outras modalidades, a quantidade de lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄ na membrana é de cerca de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 % (p/p) ou 30 % (p/p) da quantidade de DSPC na membrana.

[060]Em certas modalidades, a quantidade de lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄ na membrana é de cerca de 1 % em mol a cerca de 50 % em mol da quantidade de DSPC na membrana. Em ainda outras modalidades, a quantidade de lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄ na membrana é de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 % em mol da quantidade de DSPC na membrana.

[061]Em certas modalidades, a quantidade de estearoil lisofosfatidilcolina na membrana é de cerca de 1 % a cerca de 30 % (p/p) da quantidade de DSPC na membrana. Em ainda outras modalidades, a quantidade de estearoil lisofosfatidilcolina na membrana é de cerca de 1 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 % ou 30 % (p/p) da quantidade de DSPC na membrana.

[062]Em certas modalidades, a quantidade de estearoil lisofosfatidilcolina na membrana é de cerca de 1 % em mol a cerca de 50 % em mol da quantidade de DSPC na membrana. Em ainda outras modalidades, a quantidade de estearoil

lisofosfatidilcolina na membrana é de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 % em mol da quantidade de DSPC na membrana.

[063]Em certas modalidades, a membrana comprehende colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina, m-cresol e pelo menos um selecionado do grupo que consiste em biotina-DHPE e biotina-X-DHPE. Em outras modalidades, a membrana comprehende colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina, m-cresol e biotina-DHPE.

[064]Em certas modalidades, a membrana comprehende colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, m-cresol e pelo menos um selecionado do grupo que consiste em biotina-DHPE e biotina-X-DHPE. Em outras modalidades, a membrana comprehende colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, m-cresol e biotina-DHPE.

[065]Em certas modalidades, a membrana comprehende colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina e pelo menos um selecionado do grupo que consiste em biotina-DHPE e biotina-X-DHPE. Em outras modalidades, a membrana comprehende colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina e biotina-DHPE.

[066]Em certas modalidades, o estabilizador é colocado em contato com a membrana, e/ou os componentes lipídicos que se reúnem para formar a membrana (tal como, mas não limitados a colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄ se presente e biotina-DHPE), na razão (m/m) da membrana para o estabilizador, variando de cerca de 1 : 1 a cerca de 1 : 30. Em outras modalidades, o estabilizador é contatado com a membrana e/ou os componentes lipídicos que se montam para formar a membrana, na razão (m/m) da membrana para o estabilizador de cerca de 1 : 1, 1 : 1,5, 1 : 2, 1 : 2,5, 1 : 3, 1 : 3,5, 1 : 4, 1 : 4,5, 1 : 5, 1 : 5,5, 1 : 6, 1 : 6,5, 1 : 6,5, 1 : 7, 1 : 7,5, 1 : 8, 1 : 8,5, 1 : 9, 1 : 9,5, 1 : 10, 1 : 11, 1 : 12, 1 : 13, 1 : 14,

1 : 15, 1 : 16, 1 : 17, 1 : 18, 1 : 19, 1 : 20, 1 : 21, 1; 22, 1 : 23, 1 : 24, 1 : 25, 1 : 26, 1 : 27, 1 : 28, 1 : 29 ou 1 : 30.

[067]Em certas modalidades, o m-cresol é contado com a membrana, e/ou os componentes lipídicos que se reúnem para formar a membrana (tais como, mas não limitados a colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄ se presente e biotina-DHPE), na razão (m/m) da membrana para o estabilizador, variando de cerca de 1 : 1 a cerca de 1 : 30. Em outras modalidades, o m-cresol é contado com a membrana e/ou os componentes lipídicos que se formam para formar a membrana, na razão (m/m) da membrana para o estabilizador de cerca de 1 : 1, 1 : 1,5, 1 : 2, 1 : 2,5, 1 : 3, 1 : 3,5, 1 : 4, 1 : 4,5, 1 : 5, 1 : 5,5, 1 : 6, 1 : 6,5, 1 : 6,5, 1 : 7, 1 : 7,5, 1 : 8, 1 : 8,5, 1 : 9, 1 : 9,5, 1 : 10, 1 : 11, 1 : 12, 1 : 13, 1 : 14, 1 : 15, 1 : 16, 1 : 17, 1 : 18, 1 : 19, 1 : 20, 1 : 21, 1; 22, 1 : 23, 1 : 24, 1 : 25, 1 : 26, 1 : 27, 1 : 28, 1 : 29 ou 1 : 30.

[068]Em certas modalidades, a membrana compreende colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina, m-cresol e biotina-DHPE, em uma razão de % (p/p) de cerca de 9,4 : 18,1 : 56,8 : 14,1 : 0,0 : 1,5.

[069]Em certas modalidades, a membrana compreende colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina e biotina-DHPE, em uma razão de % (p/p) de cerca de 9,4 : 18,1 : 56,8 : 14,1 : 1,5.

[070]Em certas modalidades, a membrana compreende colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina, m-cresol e biotina-DHPE, em uma razão % (m/m) de cerca de 7,7 : 15,0 : 58,6 : 0,0 : 17,4 : 1,3.

[071]Em certas modalidades, a membrana compreende colesterol, fosfato de dicetila, DSPC e biotina-DHPE, em uma razão de % (p/p) de cerca de 9,3 : 18,2 : 71,0 : 1,5.

[072]Em certas modalidades, a membrana compreende colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina, m-cresol e biotina-DHPE, em uma razão % (m/m) de cerca de 8,4 : 16,2 : 47,5 : 7,6 : 19,0 : 1,3.

[073]Em certas modalidades, a membrana compreende colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina e biotina-DHPE, em uma razão de % (p/p) de cerca de 10,4 : 20 : 58,6 : 9,4 : 1,6.

[074]Em certas modalidades, pelo menos uma molécula de ligação ao receptor de hepatócito se estende para fora a partir da nanopartícula.

[075]A invenção não deve ser interpretada como limitada às construções descritas e/ou exemplificadas aqui. Em vez disso, a invenção proporciona métodos de estabilização e/ou prevenção da agregação de lipossomas e outras nanopartículas à base de lipídeos, em que a membrana está em contato com, pelo menos, um selecionado a partir do grupo consistindo de um estabilizador e uma acil lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄. Em certas modalidades, o contato elimina ou minimiza quaisquer extremidades “livres” na membrana que levam à agregação dos lipossomas e outras nanopartículas à base de lipídeos.

[076]Em certas modalidades, o estabilizador é selecionado do grupo que consiste em m-cresol, álcool benzílico, 4-hidroxibenzoato de metila, tiomersal e hidroxitolueno butilado. Em outras modalidades, o estabilizador, como, mas não limitado a m-cresol, varia de cerca de 10 % a cerca de 25 % (p/p) na membrana. Em ainda outras modalidades, o estabilizador, como, mas não limitado a m-cresol, está presente na membrana a uma concentração de cerca de 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 % ou 25 % (p/p).

[077]Em certas modalidades, a lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄, tal como, sem limitação, estearoil lisofosfatidilcolina, varia de cerca de 5 % a cerca de 30 % (m/m) na membrana. Em outras modalidades, a lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄, tal como, sem limitação, estearoil lisofosfatidilcolina, varia de cerca de 1 % a cerca de 30 % (p/p) na membrana. Em ainda outras modalidades, a lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄, como, mas não se limitada a estearoil lisofosfatidilcolina, está presente na membrana a uma concentração de cerca de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %,

12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 % ou 30 % (p/p).

[078]Em certas modalidades, a membrana compreende pelo menos um lipídeo anfipático selecionado do grupo que consiste em 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocololina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-[3-fosfo-rac-(1-glicerol)], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinil), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato e 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina. Em outras modalidades, o lipídeo anfipático é pelo menos um selecionado do grupo que consiste em 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocololina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocololina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina e 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinil).

[079]Em certas modalidades, a quantidade de lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄ na membrana é de cerca de 1 % a 30 % (p/p) da quantidade de pelo menos um lipídeo anfipático na membrana. Em ainda outras modalidades, a quantidade de lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄ na membrana é de cerca de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 % ou 30 % (p/p) da quantidade de pelo menos um lipídeo anfipático na membrana.

[080]Em certas modalidades, a quantidade de lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄ na membrana é de cerca de 1 % em mol a cerca de 50 % em mol do montante de pelo menos um lipídeo anfipático na membrana. Em ainda outras modalidades, a quantidade de lisofosfatidilcolina C₁₂-C₂₄ na membrana é de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 % em mol da quantidade de pelo menos um lipídeo anfipático na membrana.

[081]Em certas modalidades, o estabilizador, como, mas não limitado a m-cresol, é contatado com a membrana e/ou os componentes lipídicos que se montam para formar a membrana, em uma razão (p/p) variando de cerca de 1 : 1 para cerca de 1 : 30. Em outras modalidades, o estabilizador, como, mas não limitado a m-cresol, é contatado com a membrana e/ou os componentes lipídicos que se montam para formar a membrana, a uma razão (m/m) de cerca de 1 : 1, 1 : 1,5, 1 : 2, 1 : 2,5, 1 : 3, 1 : 3,5, 1 : 4, 1 : 4,5, 1 : 5, 1 : 5,5, 1 : 6, 1 : 6,5, 1 : 7, 1 : 7,5, 1 : 8, 1 : 8,5, 1 : 9, 1 : 9,5, 1 : 10, 1 : 11, 1 : 12, 1 : 13, 1 : 14, 1 : 15, 1 : 16, 1 : 17, 1 : 18, 1 : 19, 1 : 20, 1 : 21, 1 : 22, 1 : 23, 1 : 24, 1 : 25, 1 : 26, 1 : 27, 1 : 28, 1 : 29 ou 1 : 30.

[082]Em certas modalidades, o tamanho da nanopartícula varia de cerca de 10 nm a cerca de 150 nm. Em outras modalidades, o tamanho da nanopartícula é de cerca de 10 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 110 nm, 120 nm, 130 nm, 140 nm ou 150 nm.

[083]Em certas modalidades, um agente terapêutico está disperso no interior e/ou adsorvido sobre a nanopartículas. Em outras modalidades, o agente terapêutico está ligado covalentemente à nanopartícula. Em ainda outras modalidades, o agente terapêutico não está covalentemente ligado à nanopartícula.

[084]Em certas modalidades, o agente terapêutico compreende pelo menos um selecionado do grupo que consiste em insulina, análogos de insulina, amilina, interferon, hormônio da paratireoide, calcitonina, serotonina, agonista da serotonina, inibidor da recaptação da serotonina, hormônio de crescimento humano, GIP, anticorpo monoclonal anti-GIP, metformina, bromocriptina, dopamina, glucagon e GLP-1. Em outras modalidades, o agente terapêutico é insulina.

[085]Em certas modalidades, a nanopartícula está suspensa em uma solução aquosa compreendendo um agente terapêutico dissolvido livre que não está disperso dentro da nanopartícula.

[086]Em certas modalidades, a insulina nano-dispersa em partículas e a

insulina dissolvida livre são selecionadas independentemente do grupo que consiste em insulina lispro, insulina aspártica, insulina regular, insulina regular, insulina glargina, insulina zinco, suspensão prolongada de insulina humana zinco, insulina isofana, insulina regular tamponada humana, insulina glulisina, insulina regular humana recombinante e insulina isofana humana recombinante.

[087]Em certas modalidades, o lipídeo compreende ainda ftalato de acetato de celulose. Em outras modalidades, o ftalato de acetato de celulose é pelo menos parcialmente ligado ao agente terapêutico disperso dentro da nanopartícula.

[088]Em certas modalidades, pelo menos uma molécula orgânica carregada está ligada ao agente terapêutico disperso dentro da nanopartícula. Em outras modalidades, a molécula orgânica carregada é pelo menos uma selecionada do grupo que consiste em protaminas, polilisina, poli(arg-pro-thr)_n em uma razão molar de 1 : 1 : 1, poli(DL-Ala-poli-L-lis)_n em uma razão molar de 6 : 1, histonas, polímeros de açúcar compreendendo um grupo amino primário, polinucleotídeos com grupos amino primários, proteínas compreendendo resíduos de aminoácidos com grupos funcionais carboxila (COO⁻) ou sulfídrica (S⁻), e polímeros ácidos (tais como polímeros de açúcar contendo grupos carboxila).

[089]Em certas modalidades, as nanopartículas da invenção, e as composições compreendendo as mesmas, ajudam a distribuir o agente terapêutico nela disperso aos hepatócitos no fígado.

[090]Em certas modalidades, as composições da invenção compreendem uma dose eficaz de uma composição farmacêutica direcionada a hepatócitos que combina fármaco terapêutico livre (tal como, mas não limitado a insulina) e fármaco terapêutico associado à nanopartícula à base de lipídeo da invenção. A combinação de fármaco terapêutico livre e fármaco terapêutico associado à nanopartícula lipídica cria um processo de equilíbrio dinâmico entre as duas formas de fármaco terapêutico que ocorre *in vivo* para ajudar a controlar o movimento do fármaco terapêutico livre

para os locais receptores de ação hormonal. No caso da insulina, como o fármaco terapêutico, estes locais do receptor são tecidos musculares e adiposos de um paciente diabético. O fármaco terapêutico direcionado aos hepatócitos também é liberado ao fígado de um paciente por um período de tempo designado diferente do fármaco terapêutico gratuito, introduzindo assim novos perfis farmacodinâmicos do fármaco terapêutico quando o fármaco terapêutico permanece associado à nanopartícula e/ou quando o fármaco terapêutico livre é liberado da nanopartícula. Além disso, uma porção do fármaco terapêutico associado à nanopartícula é direcionada ao fígado. No caso da insulina como fármaco terapêutico, o novo perfil farmacodinâmico do produto fornece não apenas insulina basal para tecidos periféricos, mas também estimulação hepática terapêutica do fármaco terapêutico durante a refeição para o gerenciamento do armazenamento hepático de glicose durante uma refeição. A insulina livre é liberada no local da administração e distribuída por todo o corpo. Insulina associada com a nanopartícula à base de lipídeo é fornecida ao fígado. A taxa de liberação de insulina associada com a nanopartícula é diferente da taxa de liberação de insulina livre a partir do local de administração. Estas diferentes taxas de liberação da administração de insulina, combinadas com a administração direcionada de insulina associada à nanopartícula no fígado, proporcionam a normalização das concentrações de glicose em pacientes com diabetes mellitus tipo I e tipo II. Em certas modalidades, a composição direcionada a hepatócitos compreende qualquer insulina ou derivado ou análogo de insulina terapeuticamente eficaz, ou qualquer combinação de dois ou mais tipos de insulina ou derivado ou análogo de insulina.

[091]Os compostos aqui descritos também incluem compostos isotopicamente marcados em que um ou mais átomos são substituídos por um átomo com o mesmo número atômico, mas uma massa atômica ou número de massa diferente da massa atômica ou número de massa normalmente encontrados na

natureza. Exemplos de isótopos adequados para inclusão nos compostos descritos na presente invenção incluem e não estão limitados a ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{36}Cl , ^{18}F , ^{123}I , ^{125}I , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P e ^{35}S . Em certas modalidades, os compostos marcados isotopicamente são úteis em estudos de distribuição de fármacos e/ou substratos nos tecidos. Em outras modalidades, a substituição por isótopos mais pesados, como o deutério, proporciona maior estabilidade metabólica (por exemplo, aumento da meia-vida *in vivo* ou necessidade de dosagem reduzida). Em ainda outras modalidades, a substituição com isótopos emissores de pósitron, tais como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O e ^{13}N , é útil em Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) para examinar a ocupação do receptor de substrato. Os compostos marcados isotopicamente são preparados por qualquer método adequado ou por processos utilizando um reagente marcado isotopicamente apropriado em vez do reagente não marcado empregado de outro modo.

[092]Em certas modalidades, os compostos aqui descritos são marcados por outros meios, incluindo, entre outros, a utilização de cromóforos ou porções fluorescentes, marcadores bioluminescentes ou marcadores quimioluminescentes.

[093]Os compostos da invenção podem, em certas modalidades, formar ácidos ou bases. Em certas modalidades, a invenção contempla sais de adição de ácido. Em outras modalidades, a invenção contempla sais de adição de base. Em ainda outras modalidades, a invenção contempla sais de adição de ácido farmaceuticamente aceitáveis. Em ainda outras modalidades, a invenção contempla sais de adição de bases farmaceuticamente aceitáveis. Sais farmaceuticamente aceitáveis referem-se a sais daquelas bases ou ácidos que não são tóxicos ou de outro modo indesejáveis biologicamente.

[094]Sais de adição de ácido farmaceuticamente aceitáveis adequados podem ser preparados a partir de um ácido inorgânico ou de um ácido orgânico. Exemplos de ácidos inorgânicos incluem ácidos clorídrico, bromídrico, iodídrico,

nítrico, carbônico, sulfúrico (incluindo sulfato e hidrogenossulfato) e fosfórico (incluindo fosfato de hidrogênio e fosfato de di-hidrogênio). Os ácidos orgânicos apropriados podem ser selecionados dentre as classes de ácidos orgânicos alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos, aralifáticos, heterocíclicos, carboxílicos e sulfônicos, cujos exemplos incluem ácido fórmico, acético, propiônico, succínico, glicólico, glicônico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, glucurônico, maleico, malônico, sacarina, fumárico, pirúvico, aspártico, glutâmico, benzoico, antranílico, 4-hidroxibenzoico, fenilacético, mandélico, embônico (pamoico), metanossulfônico, etanossulfônico, benzenossulfônico, pantotênico, trifluorometanossulfônico, 2-hidroxietanossulfônico, p-toluenossulfônico, sulfanílico, ciclo-hexilaminossulfônico, esteárico, algínico, β-hidroxibutírico, salicílico, galactárico e galacturônico.

[095]Os sais de adição de base farmaceuticamente aceitáveis adequados dos compostos da invenção incluem, por exemplo, sais metálicos, incluindo sais de metais alcalinos, metais alcalino-terrosos e metais de transição, tais como, por exemplo, sais de cálcio, magnésio, potássio, sódio, lítio e cobre, ferro e zinco. Os sais de adição de base farmaceuticamente aceitáveis também incluem sais orgânicos feitos a partir de aminas básicas, como, por exemplo, N,N'-dibenziletíleno-diamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, meglumina (*N*-metilglucamina) e procaína. Todos estes sais podem ser preparados a partir do composto correspondente fazendo reagir, por exemplo, o ácido ou base apropriado com o composto.

[096]É divulgado um kit que comprehende qualquer composição da invenção e um material instrucional que descreve a administração da composição a um tecido de um sujeito, como um mamífero. Este kit pode compreender um solvente (preferencialmente estéril) adequado para dissolver ou suspender a composição da invenção antes de administrar a composição ao sujeito, tal como um mamífero.

Métodos

[097]A invenção fornece métodos de preparação da nanopartícula à base de

lipídeo da invenção. Em certas modalidades, o método compreende o contato em um sistema aquoso de colesterol, fosfato de dicetila, lipídeo anfipático, molécula de ligação ao receptor de hepatócitos e pelo menos um composto selecionado do grupo que consiste em um estabilizador e estearoil lisofosfatidilcolina. Em outras modalidades, o método compreende o contato em um sistema aquoso de colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina, m-cresol e biotina-DHPE.

[098]Em certas modalidades, o estabilizador é adicionado ao sistema aquoso após o colesterol, fosfato de dicetila, lipídeo anfipático, opcionalmente estearoil lisofosfatidilcolina e a molécula de ligação ao receptor de hepatócitos terem sido contatados no sistema aquoso.

[099]Em certas modalidades, o m-cresol é adicionado ao sistema aquoso após o colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina e a molécula de ligação ao receptor de hepatócitos terem sido contatados no sistema aquoso.

[0100]Em certas modalidades, a nanopartícula compreende um agente terapêutico nela disperso.

[0101]Em certas modalidades, o agente terapêutico, colesterol, fosfato de dicetila, lipídeo anfipático, molécula de ligação ao receptor de hepatócitos e pelo menos um composto são contatados simultaneamente no sistema aquoso.

[0102]Em certas modalidades, o agente terapêutico, colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina, m-cresol e biotina-DHPE são simultaneamente contatados no sistema aquoso.

[0103]Em certas modalidades, a nanopartícula é formada na ausência do agente terapêutico, em que, opcionalmente, a nanopartícula é pelo menos parcialmente concentrada, purificada ou isolada, e em que o agente terapêutico é contatado com a nanopartícula, pelo qual pelo menos uma porção do agente terapêutico está disperso dentro da nanopartícula.

[0104]Em certas modalidades, a composição é tratada com ftalato de acetato

de celulose, que pode se ligar não covalentemente a pelo menos uma porção do agente terapêutico disperso na nanopartícula e proteger o agente terapêutico da degradação metabólica. Em outras modalidades, o ftalato de acetato de celulose está ligado covalentemente ao agente terapêutico e/ou a qualquer um dos lipídeos que constituem a nanopartícula.

[0105]As modalidades adicionais relacionadas a certos métodos para a preparação e/ou processamento e/ou purificação de uma nanopartícula podem ser encontradas, por exemplo, limitadas nos Pedidos de Patente U.S. N°s US20110135725 e US20090087479, todos os quais são incorporados aqui em sua totalidade por referência.

[0106]A invenção fornece ainda um método de tratamento de uma doença em um mamífero. Em certas modalidades, o método compreende administrar ao mamífero em necessidade do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma nanopartícula e/ou uma composição da invenção.

[0107]Em certas modalidades, a doença é diabetes mellitus e o agente terapêutico compreende insulina.

[0108]A invenção fornece ainda um método para ativar a glicogênio sitase hepática em um mamífero. Em certas modalidades, o método compreende a administração ao mamífero em necessidade da mesma uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma nanopartícula e/ou composição da invenção, em que o agente terapêutico compreende insulina. Em outras modalidades, o mamífero tem diabetes mellitus.

Administração/Dosagem/Formulações

[0109]A invenção também abrange composições farmacêuticas e métodos para sua utilização. Estas composições farmacêuticas podem compreender um ingrediente ativo (que pode ser uma ou mais composições da invenção, ou sais farmaceuticamente aceitáveis das mesmas) opcionalmente em combinação com um

ou mais agentes farmaceuticamente aceitáveis. As composições aqui apresentadas podem ser utilizadas sozinhas ou em combinação com compostos adicionais para produzir efeitos aditivos, complementares ou sinérgicos.

[0110]O regime de administração pode afetar o que constitui uma quantidade eficaz. As formulações terapêuticas podem ser administradas ao sujeito antes ou após o início de uma doença ou distúrbio aqui contemplado. Além disso, várias dosagens divididas, bem como dosagens escalonadas, podem ser administradas diariamente ou sequencialmente, ou a dose pode ser infundida continuamente, ou pode ser uma injeção em bolus, ou pode ser administrada por via inalatória, bucal e/ou oral. Além disso, as dosagens das formulações terapêuticas podem ser aumentadas ou diminuídas proporcionalmente, conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica ou profilática.

[0111]A administração das composições da presente invenção a um paciente, preferivelmente um mamífero, mais preferivelmente um humano, pode ser realizada utilizando procedimentos conhecidos, em dosagens e por períodos de tempo eficazes para tratar uma doença ou distúrbio aqui contemplado. Uma quantidade eficaz do composto terapêutico necessário para alcançar um efeito terapêutico pode variar de acordo com fatores como o estado da doença ou distúrbio no paciente; a idade, sexo e peso do paciente; e a capacidade do composto terapêutico para tratar uma doença ou distúrbio aqui contemplado. Os regimes de dosagem podem ser ajustados para fornecer a resposta terapêutica ideal. Por exemplo, várias doses divididas podem ser administradas diariamente ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. Um exemplo não limitativo de um intervalo de doses eficaz para um composto terapêutico da invenção é de cerca de 1 e 5.000 mg/kg de peso corporal/por dia. Um especialista na técnica seria capaz de estudar os fatores relevantes e fazer a determinação em relação à quantidade eficaz do composto terapêutico sem experimentação indevida.

[0112]Os níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas desta invenção podem variar de modo a obter uma quantidade do ingrediente ativo que é eficaz para alcançar a resposta terapêutica desejada para um paciente, composição e modo de administração em particular, sem ser tóxico para o paciente.

[0113]Em particular, o nível de dosagem selecionado depende de uma variedade de fatores, incluindo a atividade do composto específico empregado, o tempo de administração, a taxa de excreção do composto, a duração do tratamento, outros fármacos, compostos ou materiais utilizados em combinação com o composto, idade, sexo, peso, condição, estado geral de saúde e histórico médico anterior do paciente sendo tratado e fatores semelhantes bem conhecidos nas técnicas médicas.

[0114]Um médico, por exemplo, médico ou veterinário, especialista na técnica, pode determinar e prescrever prontamente a quantidade eficaz da composição farmacêutica necessária. Por exemplo, o médico ou o veterinário pode iniciar doses dos compostos da invenção empregados na composição farmacêutica em níveis inferiores aos necessários para alcançar o efeito terapêutico desejado e aumentar gradualmente a dosagem até que o efeito desejado seja alcançado.

[0115]Em modalidades particulares, é especialmente vantajoso formular o composto na forma de unidade de dosagem para facilitar a administração e uniformidade da dosagem. A forma de unidade de dosagem, como aqui utilizada, refere-se a unidades fisicamente distintas adequadas como dosagens unitárias para os pacientes a serem tratados; cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de composto terapêutico calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o portador farmacêutico necessário. As formas unitárias de dosagem da invenção são ditadas e diretamente dependentes (a) das características únicas do composto terapêutico e do efeito terapêutico específico a ser alcançado; e (b) das limitações inerentes à técnica de composição/formulação de tal

composto terapêutico para o tratamento de uma doença ou distúrbio aqui contemplado.

[0116]Em certas modalidades, as composições da invenção são formuladas utilizando um ou mais excipientes ou portadores farmaceuticamente aceitáveis. Em certas modalidades, as composições farmacêuticas da invenção compreendem uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto da invenção e um portador farmaceuticamente aceitável.

[0117]O portador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido e semelhantes), misturas adequadas dos mesmos e óleos vegetais, desde que o solvente ou o meio de dispersão não atrapalhe significativamente as nanopartículas. A prevenção da ação de microrganismos pode ser alcançada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal e semelhantes. Em muitos casos, é preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, cloreto de sódio ou polialcoois, como manitol e sorbitol, na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser conseguida incluindo na composição um agente que retarde a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio ou gelatina.

[0118]Em certas modalidades, as composições da invenção são administradas ao paciente em dosagens que variam de uma a cinco vezes por dia ou mais. Em outras modalidades, as composições da invenção são administradas ao paciente em doses variadas que incluem, mas não estão limitadas a uma vez por dia, a cada dois dias, a cada três dias, a uma vez por semana e a cada duas semanas. É prontamente aparente para um especialista na técnica que a frequência de administração das várias composições de combinação da invenção varia de indivíduo para indivíduo, dependendo de muitos fatores, incluindo, entre outros, idade, doença ou distúrbio a ser tratado, sexo, saúde geral e outros fatores. Assim, a invenção não

deve ser interpretada como limitada a qualquer regime de dosagem específico, e a dosagem e composição precisas a serem administradas a qualquer paciente é determinada pelo médico assistente, levando em consideração todos os outros fatores sobre o paciente.

[0119]Os compostos da invenção para administração podem estar na faixa de cerca de 1 µg a cerca de 10.000 mg, cerca de 20 µg a cerca de 9.500 mg, cerca de 40 µg a cerca de 9.000 mg, cerca de 75 µg a cerca de 8.500 mg, cerca de 150 µg a cerca de 7.500 mg, cerca de 200 µg a cerca de 7.000 mg, cerca de 350 µg a cerca de 6.000 mg, cerca de 500 µg a cerca de 5.000 mg, cerca de 750 µg a cerca de 4.000 mg, cerca de 1 mg a cerca de 3.000 mg, cerca de 10 mg a cerca de 2.500 mg, cerca de 20 mg a cerca de 2.000 mg, cerca de 25 mg a cerca de 1.500 mg, cerca de 30 mg a cerca de 1.000 mg, cerca de 40 mg a cerca de 900 mg, cerca de 50 mg a cerca de 800 mg, cerca de 60 mg a cerca de 750 mg, cerca de 70 mg a cerca de 600 mg, cerca de 80 mg a cerca de 500 mg e todos e quaisquer incrementos totais ou parciais entre eles.

[0120]Em certas modalidades, a dose de um composto e/ou composição da invenção é de cerca de 1 mg e cerca de 2.500 mg. Em outras modalidades, uma dose de um composto da invenção utilizada nas composições aqui descritas é inferior a cerca de 10.000 mg ou inferior a cerca de 8.000 mg ou inferior a cerca de 6.000 mg ou inferior a cerca de 5.000 mg ou inferior a cerca de 3.000 mg, ou inferior a cerca de 2.000 mg, ou inferior a cerca de 1.000 mg, ou inferior a cerca de 500 mg, ou inferior a cerca de 200 mg, ou inferior a cerca de 50 mg. Da mesma forma, em outras modalidades, uma dose de um segundo composto, como descrito aqui, é inferior a cerca de 1.000 mg, ou inferior a cerca de 800 mg, ou inferior a cerca de 600 mg, ou inferior a cerca de 500 mg, ou inferior a cerca de 400 mg, ou inferior a cerca de 300 mg, ou inferior a cerca de 200 mg, ou inferior a cerca de 100 mg, ou inferior a cerca de 50 mg, ou inferior a cerca de 40 mg, ou inferior a cerca de 30 mg, ou inferior a

cerca de 30 mg, ou inferior a cerca de 25 mg, ou inferior a cerca de 20 mg, ou inferior a cerca de 15 mg, ou inferior a cerca de 10 mg, ou inferior a cerca de 5 mg, ou inferior a cerca de 2 mg, ou inferior a cerca de 1 mg, ou inferior a cerca de 0,5 mg e quaisquer e todos os seus incrementos totais ou parciais.

[0121]Em certas modalidades, a presente invenção é direcionada a uma composição farmacêutica embalada compreendendo um recipiente contendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto e/ou composição da invenção, isoladamente ou em combinação com um segundo agente farmacêutico; e instruções para utilizar o composto para tratar, prevenir ou reduzir um ou mais sintomas de uma doença ou distúrbio aqui contemplado.

[0122]Em certas modalidades, o recipiente contém uma nanopartícula à base de lipídeo, que não comprehende um agente terapêutico de interesse, tal como, sem limitação, uma insulina ou um derivado ou análogo da mesma. Em outras modalidades, o recipiente contém uma nanopartícula à base de lipídeo, que comprehende um agente terapêutico de interesse, tal como, sem limitação, uma insulina ou um derivado ou análogo da mesma. Em ainda outras modalidades, o recipiente ainda contém um agente terapêutico de interesse, tal como, sem limitação, uma insulina ou um derivado ou análogo da mesma.

Métodos Ilustrativos Não Limitativos para o Tratamento de Diabetes Mellitus

[0123]Pacientes com diabetes mellitus tipo I ou tipo II podem receber uma quantidade eficaz de uma nanopartícula da invenção compreendendo uma insulina. Quando esta composição é administrada por via subcutânea, uma porção da composição entra no sistema circulatório, onde a composição é transportada para o fígado e outras áreas onde o lipídeo anfipático estendido liga o construto lipídico aos receptores dos hepatócitos. Uma porção da composição administrada é exposta a um gradiente externo *in vivo*, onde a insulina pode ser solubilizada e depois se mover a partir do construto lipídico, fornecendo insulina ao músculo e tecido adiposo. A insulina

que permanece com o construto lipídico mantém a capacidade de ser direcionada ao receptor de ligação aos hepatócitos nos hepatócitos no fígado. Portanto, duas formas de insulina são produzidas a partir desse construto lipídico específico. Em um ambiente *in vivo*, a insulina livre e associada aos lipídeos é gerada de uma maneira dependente do tempo.

[0124]A administração das nanopartículas e composições compreendendo as mesmas pode ser através de qualquer um dos modos de administração aceitos para insulina que se deseja administrar. Esses métodos incluem formas orais, parentéricas, nasais e outras formas sistêmicas ou em aerossol. Esses métodos incluem ainda sistemas de liberação de bombas.

[0125]A administração oral de uma nanopartícula da invenção é seguida pela absorção intestinal de insulina associada à nanopartícula da invenção no sistema circulatório do corpo, onde também é exposta ao pH fisiológico do sangue. A nanopartícula é direcionada para liberação ao fígado e pode ser protegida pela presença de ftalato de acetato de celulose nas nanopartículas da invenção. No caso da administração oral, a nanopartícula protegida atravessa a cavidade oral, migra pelo estômago e se move para o intestino delgado, onde o pH alcalino do intestino delgado degrada a proteção de ftalato de acetato de celulose. A nanopartícula não-protégida é absorvida pelo sistema circulatório. Isso permite que as nanopartículas sejam liberadas aos sinusóides do fígado. Uma molécula de ligação ao receptor, como 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(Cap Biotinil) ou qualquer outra molécula específica de hepatócito, fornece um meio para o construto lipídico se ligar ao receptor e ser engolido ou endocitado pelos hepatócitos. A insulina é então liberada da nanopartícula, onde, ao obter acesso ao ambiente celular, desempenha sua função designada no que diz respeito a atuar como um agente para controlar o diabetes mellitus.

[0126]Pacientes com diabetes mellitus tipo I ou tipo II podem receber uma

quantidade eficaz de uma nanopartícula compreendendo uma mistura de insulina glargina livre e insulina glargina associada à nanopartícula. A insulina glargina pode ser combinada com outras formas de insulina, como insulina lispro, insulina aspártica, insulina regular, insulina zinco, insulina zinco humana prolongada, insulina isofana, insulina regular tamponada humana, insulina glulisina, insulina regular humana recombinante, insulina glulisina, insulina regular tamponada humana, insulina isofana humana recombinante ou combinações pré-misturadas de qualquer uma das insulininas acima mencionadas, um derivado das mesmas e uma combinação de qualquer uma das insulininas acima mencionadas. A composição pode ser administrada por via subcutânea ou oral.

[0127]Depois que uma composição é administrada a um paciente por injeção subcutânea, o ambiente fisiológico *in situ* na área de injeção, a morfologia e as estruturas químicas da insulina livre e a insulina associada às nanopartículas começam a mudar. Por exemplo, como o pH do ambiente em torno da insulina glargina livre e da insulina glargina associada às nanopartículas aumenta após ser diluído com meios fisiológicos, o pH atinge o ponto isoelétrico da insulina glargina, onde ocorrem reações de flocação, agregação e precipitação para insulina glargina livre e insulina glargina associada à nanopartícula. Em certas modalidades, a insulina glargina livre muda de uma forma solúvel na injeção para uma forma insolúvel em um pH próximo ao seu ponto isoelétrico de pH 5,8 a 6,2 e, em seguida, para uma forma solúvel em pH fisiológico. As taxas nas quais esses processos ocorrem diferem entre a insulina glargina livre e insulina glargina associada à nanopartícula. A insulina glargina livre é diretamente exposta a alterações de pH e diluição. A exposição da insulina glargina associada à nanopartícula a pequenas alterações no pH e diluição no pH fisiológico é atrasada devido ao tempo necessário para a difusão de fluidos ou meios fisiológicos através da bicamada lipídica na nanopartícula. O atraso na liberação de insulina a partir do construto lipídico, bem como o atraso da liberação de insulina associada à

nanopartícula é uma característica da invenção, uma vez que afeta e aumenta a resposta biológica e farmacológica *in vivo*.

[0128]A administração oral de uma composição farmacêutica que combina insulina glarginha livre e insulina glarginha associada a uma nanopartícula é seguida pela absorção intestinal da insulina glarginha associada à nanopartícula no sistema circulatório do corpo, onde também é exposto ao pH fisiológico do sangue. Em certas modalidades, a composição compreende uma matriz de liberação retardada que libera glarginha de HDV por um período prolongado de tempo, a fim de alcançar um regime de dose de 24 horas. Toda ou parte da nanopartícula é liberada ao fígado.

[0129]Os pacientes com diabetes mellitus tipo I ou Tipo II podem receber uma quantidade eficaz de uma composição direcionada a hepatócitos, compreendendo uma mistura de insulina isofana humana recombinante livre (NPH) mais insulina regular humana recombinante livre junto com insulina isofana humana recombinante e insulina regular humana recombinante as quais estão associadas a uma nanopartícula. A insulina isofana humana recombinante pode ser combinada com outras formas de insulina, como insulina lispro, insulina aspártica, insulina regular, insulina glarginha, insulina zinco, insulina zinco prolongada, insulina isofana, insulina regular tamponada humana, insulina glulisina, insulina regular humana recombinante, insulina isofana humana recombinante ou qualquer combinação destas (pré-misturadas).

[0130]Em certas modalidades, a composição compreende uma matriz de liberação retardada que libera HDV NPH por um período prolongado de tempo, a fim de alcançar um regime de dose de 24 horas.

[0131]A administração oral de uma composição farmacêutica que combina insulina isofana humana recombinante livre e insulina isofana humana recombinante associada com uma nanopartícula é seguida pela absorção intestinal de insulina isofana humana recombinante associada à nanopartícula no sistema circulatório do

corpo, onde também é exposto ao pH fisiológico do sangue. Toda ou parte da nanopartícula é liberada ao fígado, enquanto o isofano não-HDV é absorvido lentamente de uma matriz de liberação lenta para liberação na circulação geral.

[0132]À medida que a diluição fisiológica é aumentada *in situ* no espaço subcutâneo ou ao entrar no sistema circulatório, a insulina isofana humana recombinante livre e a insulina isofana humana recombinante associada à nanopartícula encontram um ambiente de pH fisiológico normal de pH 7,4. Como resultado, a insulina isofana humana recombinante isenta de diluição muda de uma forma insolúvel na injeção para uma forma solúvel no pH fisiológico. Na forma solúvel, a insulina isofana humana recombinante migra através do corpo para locais onde é capaz de provocar uma resposta farmacológica. A insulina isofana humana recombinante associada à nanopartícula torna-se solubilizada e liberada da nanopartícula a uma taxa diferente que é mais lenta que a da insulina isofana humana recombinante livre. Isso ocorre porque a insulina isofana humana recombinante associada à nanopartícula precisa atravessar o volume do núcleo e os domínios lipídicos da nanopartícula antes de entrar em contato com meios da fase em massa.

[0133]A quantidade de insulina administrada dependerá do sujeito a ser tratado, do tipo e gravidade da aflição, do modo de administração e do julgamento do médico prescritor. Embora as faixas de dosagem eficazes para substâncias biologicamente ativas específicas de interesse dependam de uma variedade de fatores e sejam geralmente conhecidas pelos especialistas na matéria, algumas diretrizes de dosagem podem ser geralmente definidas. Para a maioria das formas de administração, a nanopartícula será suspensa em uma solução aquosa e geralmente não excede 4,0 % (p/v) da formulação total. O componente do fármaco da formulação será, em certas modalidades, inferior a 20 % (p/v) da formulação e geralmente maior que 0,01 % (p/v).

[0134]Em certas modalidades, a composição farmacêutica compreende

insulina HDV e nenhuma insulina livre. Nesses casos, toda a insulina dentro da composição é direcionada para o fígado. Em outras modalidades, a composição farmacêutica compreende insulina HDV e insulina livre (insulina não HDV). A razão entre insulina HDV e insulina livre pode ser, em exemplo não limitativo, de cerca de 0,1 : 99,9, 0,2 : 99,8, 0,3 : 99,7, 0,4 : 99,6, 0,5 : 99,5, 0,6 : 99,4, 0,7 : 99,3, 0,8 : 99,2, 0,9 : 99,1, 1 : 99, 2 : 98, 3 : 97, 4 : 96, 5 : 95, 6 : 94, 7 : 93, 8 : 92, 9 : 91, 10 : 90, 12 : 88, 14 : 86, 16 : 84, 18 : 82, 20 : 80, 22 : 78, 24 : 76, 25 : 75, 26 : 74, 28 : 72, 30 : 70, 32 : 68, 34 : 66, 36 : 64, 38 : 62, 40 : 60, 42 : 58, 44 : 56, 46 : 54, 48 : 52 e/ou 50 : 50.

[0135]Podem ser preparadas formas de dosagem ou composições contendo ingrediente ativo na faixa de 0,005 % a 5 % com o equilíbrio constituído por portadores não tóxicos.

[0136]A composição exata dessas formulações pode variar amplamente, dependendo das propriedades particulares do fármaco em questão. Em certas modalidades, eles compreendem de 0,01 % a 5 % e, de preferência, de 0,05 % a 1 % de ingrediente ativo para fármacos altamente potentes e de 2 % a 4 % para fármacos moderadamente ativos.

[0137]A porcentagem de ingrediente ativo contida em tais composições parentéricas é altamente dependente da natureza específica do mesmo, bem como da atividade do ingrediente ativo e das necessidades do sujeito. Contudo, são empregues percentagens de ingrediente ativo de 0,01 % a 5 % em solução, e serão mais elevadas se a composição for um sólido que será subsequentemente diluído para as percentagens acima. Em certas modalidades, a composição compreende 0,2 % a 2,0 % do agente ativo em solução.

Administração

[0138]As formulações podem ser empregues em misturas com excipientes convencionais, isto é, substâncias transportadoras orgânicas ou inorgânicas farmaceuticamente aceitáveis, adequadas para administração oral, parentérica, nasal,

intravenosa, subcutânea, entérica ou qualquer outro modo de administração adequado, conhecido na técnica. As preparações farmacêuticas podem ser esterilizadas e, se desejado, misturadas com agentes auxiliares, por exemplo, lubrificantes, conservantes, estabilizadores, agentes umectantes, emulsificantes, sais para influenciar tampões de pressão osmóticos, corantes, aromas e/ou substâncias aromáticas e semelhantes. Eles também podem ser combinados quando desejado com outros agentes ativos, por exemplo, outros agentes analgésicos.

[0139]As vias de administração de qualquer uma das composições da invenção incluem oral, nasal, retal, intravaginal, parenteral, bucal, sublingual ou tópica. Os compostos e/ou composições para utilização na invenção podem ser formulados para administração por qualquer via adequada, como por via oral ou parentérica, por exemplo, transdérmica, transmucosa (por exemplo, sublingual, lingual, (trans)bucal, (trans)uretral), vaginal (por exemplo, trans e perivaginal), (intra)nasal e (trans)retal), intravesical, intrapulmonar, intraduodenal, intragástrica, intratecal, subcutânea, intramuscular, intradérmica, intra-arterial, intravenosa, intrabrônquica, inalatória e administração tópica.

[0140]As composições e formas de dosagem adequadas incluem, por exemplo, comprimidos, cápsulas, *caplets*, pílulas, cápsulas de gel, trociscos, dispersões, suspensões, soluções, xaropes, grânulos, *beads*, adesivos transdérmicos, géis, pós, *pellets*, magmas, pastilhas, cremes, pastas, emplastos, loções, discos, supositórios, sprays líquidos para administração nasal ou oral, pó seco ou formulações em aerossol para inalação, composições e formulações para administração intravesical e semelhantes. Deve ser entendido que as formulações e composições que seriam úteis na presente invenção não estão limitadas às formulações e composições particulares aqui descritas.

Administração Oral

[0141]Para aplicação oral, são particularmente adequados comprimidos,

drágeas, líquidos, gotas, supositórios ou cápsulas, *caplets* e cápsulas de gel. As composições destinadas à utilização oral podem ser preparadas de acordo com qualquer método conhecido na técnica e tais composições podem conter um ou mais agentes selecionados do grupo que consiste em excipientes farmaceuticamente inertes e não tóxicos do ponto de vista farmacêutico adequados para a fabricação de comprimidos. Tais excipientes incluem, por exemplo, um diluente inerte como a lactose; agentes de granulação e desintegração, como amido de milho; agentes aglutinantes como amido; e agentes lubrificantes tais como estearato de magnésio. Os comprimidos podem não ser revestidos ou podem ser revestidos por técnicas conhecidas ou para atrasar a liberação dos ingredientes ativos. As formulações para utilização oral também podem ser apresentadas como cápsulas de gelatina dura, em que o ingrediente ativo é misturado com um diluente inerte.

[0142]Para administração oral, os compostos e/ou composições da invenção podem estar na forma de comprimidos ou cápsulas preparados por meios convencionais com excipientes farmaceuticamente aceitáveis, tais como agentes de ligação (por exemplo, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulose ou hidroxipropilmetylcelulose); enchedores (por exemplo, amido de milho, lactose, celulose microcristalina ou fosfato de cálcio); lubrificantes (por exemplo, estearato de magnésio, talco ou sílica); desintegrantes (por exemplo, glicolato de amido sódico); ou agentes umectantes (por exemplo, lauril sulfato de sódio). Se desejado, os comprimidos podem ser revestidos utilizando métodos e materiais de revestimento adequados, como os sistemas de revestimento de filmes OPADRY™ disponíveis da Colorcon, West Point, Pa. (Por exemplo, OPADRY™ OY Type, OYC Type, Organic Enteric OY-P Type, Aqueous Enteric OY-A Type, OY-PM Type e OPADRY™ White, 32K18400). A preparação líquida para administração oral pode estar na forma de soluções, xaropes ou suspensões. As preparações líquidas podem ser preparadas por meios convencionais com aditivos farmaceuticamente aceitáveis, tais como

agentes de suspensão (por exemplo, xarope de sorbitol, metilcelulose ou gorduras comestíveis hidrogenadas); agente emulsificante (por exemplo, lecitina ou acácia); portadores não aquosos (por exemplo, óleo de amêndoas, ésteres oleosos ou álcool etílico); e conservantes (por exemplo, p-hidróxi benzoatos de metila ou propila ou ácido sórbico).

[0143]As técnicas de granulação são bem conhecidas na técnica farmacêutica para modificar pós de partida ou outros materiais particulados de um ingrediente ativo. Os pós são normalmente misturados com um material aglutinante em aglomerados ou grânulos de fluxo livre permanentes maiores referidos como uma “granulação”. Por exemplo, os processos de granulação “úmida” utilizando solvente são geralmente caracterizados pelos pós serem combinados com um material aglutinante e umedecidos com água ou um solvente orgânico sob condições que resultam na formação de uma massa granulada úmida a partir da qual o solvente deve então ser evaporado.

[0144]A granulação por fusão geralmente consiste na utilização de materiais sólidos ou semi-sólidos à temperatura ambiente (ou seja, com um intervalo de amolecimento ou ponto de fusão relativamente baixo) para promover a granulação de materiais em pó ou outros, essencialmente na ausência de adição de água ou outros solventes líquidos. Os sólidos com baixo ponto de fusão, quando aquecidos a uma temperatura na faixa do ponto de fusão, liquefazem para atuar como um aglutinante ou meio de granulação. O sólido liquefeito se espalha sobre a superfície dos materiais em pó com os quais é contatado e, no resfriamento, forma uma massa granulada sólida na qual os materiais iniciais estão ligados. A granulação por fusão resultante pode então ser fornecida a uma prensa de comprimidos ou ser encapsulada para preparar a forma de dosagem oral. A granulação por fusão melhora a taxa de dissolução e a biodisponibilidade de um ativo (isto é, fármaco), formando uma dispersão sólida ou solução sólida.

[0145]A Patente U.S. Nº 5.169.645 descreve grânulos contendo cera diretamente compressíveis com propriedades de fluxo aperfeiçoadas. Os grânulos são obtidos quando as ceras são misturadas na massa fundida com certos aditivos para melhorar o fluxo, seguidos de resfriamento e granulação da mistura. Em certas modalidades, apenas a própria cera derrete na combinação de cera(s) e aditivo(s) e, em outros casos, tanto a(s) cera(s) quanto o(s) aditivo(s) derretem.

[0146]A presente invenção também inclui um comprimido de múltiplas camadas compreendendo uma camada que proporciona a liberação retardada de um ou mais compostos e/ou composições da invenção, e uma camada adicional que proporciona a liberação imediata de um fármaco para tratamento de doenças ou distúrbios. Utilizando uma mistura de polímero sensível à cera/pH, pode ser obtida uma composição insolúvel gástrica na qual o ingrediente ativo é aprisionado, garantindo sua liberação retardada.

Administração Parenteral

[0147]Para administração parenteral, os compostos e/ou composições da invenção podem ser formulados para injeção ou infusão, por exemplo, injeção ou infusão intravenosa, intramuscular ou subcutânea, ou para administração em dose em bolus e/ou infusão contínua. Podem ser utilizadas suspensões, soluções ou emulsões em um portador oleoso ou aquoso, contendo opcionalmente outros agentes de formulação, tais como agentes de suspensão, estabilização e/ou dispersão.

Administração Pulmonar

[0148]Uma composição farmacêutica da invenção pode ser preparada, embalada ou vendida em uma formulação adequada para administração pulmonar através da cavidade bucal. Esta formulação pode compreender partículas secas que compreendem o ingrediente ativo e que têm um diâmetro na faixa de cerca de 0,5 a cerca de 7 mícrons e, preferivelmente, de cerca de 1 a cerca de 6 mícrons. Tais composições estão convenientemente sob a forma de pós secos para administração

utilizando um dispositivo compreendendo um reservatório de pó seco para o qual uma corrente de propulsor pode ser dirigida para dispersar o pó ou utilizando um recipiente dispensador de pó/solvente autopropulsor, tal como um dispositivo que compreende o ingrediente ativo dissolvido ou suspenso em um propulsor de baixo ponto de ebulição em um recipiente fechado. De preferência, esses pós compreendem partículas em que pelo menos 98 % das partículas em peso têm um diâmetro maior que 0,5 mícrons e pelo menos 95 % das partículas em número têm um diâmetro menor que 7 mícrons. Mais preferivelmente, pelo menos 95 % das partículas em peso têm um diâmetro maior que 1 nanômetro e pelo menos 90 % das partículas em número têm um diâmetro menor que 6 mícrons. As composições de pó seco incluem, de preferência, um diluente sólido em pó fino, como o açúcar, e são convenientemente fornecidas na forma de dose unitária.

[0149]Os propulsores com baixo ponto de ebulição geralmente incluem propulsores líquidos com um ponto de ebulição abaixo de 65 °F (18,3 °C) à pressão atmosférica. Geralmente o propulsor pode constituir 50 a 99,9 % (p/p) da composição e o ingrediente ativo pode constituir 0,1 a 20 % (p/p) da composição. O propulsor pode ainda compreender ingredientes adicionais, como um tensoativo aniónico sólido ou não iônico líquido ou um diluente sólido (de preferência com um tamanho de partícula da mesma ordem que as partículas que compreendem o ingrediente ativo).

[0150]As composições farmacêuticas da invenção formuladas para administração pulmonar também podem fornecer o ingrediente ativo na forma de gotículas de uma solução ou suspensão. Estas formulações podem ser preparadas, embaladas ou vendidas como soluções ou suspensões alcoólicas aquosas ou diluídas, opcionalmente estéreis para a administração por injeção, compreendendo o ingrediente ativo, e podem ser administradas convenientemente utilizando qualquer dispositivo de nebulização ou atomização. Em certas modalidades, os compostos e/ou composições da invenção são filtrados esterilmente antes da administração ao sujeito.

Tais formulações podem ainda compreender um ou mais ingredientes adicionais, incluindo, mas não se limitando a, um agente aromatizante, como sacarina sódica, um óleo volátil, um agente tampão, um agente ativo de superfície ou um conservante como metil-hidroxibenzoato. As gotículas proporcionadas por esta via de administração têm preferivelmente um diâmetro médio na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 200 mícrons.

Liberação Intransal

[0151]As formulações aqui descritas como sendo úteis para administração pulmonar também são úteis para administração intransal de uma composição farmacêutica da invenção.

[0152]Outra formulação adequada para administração intransal é um pó grosso compreendendo o ingrediente ativo e possuindo uma partícula média de cerca de 0,2 a 500 mícrons. Esta formulação é administrada da maneira em que o rapé é tomado, isto é, por inalação rápida através da passagem nasal de um recipiente do pó mantido próximo às narinas.

[0153]As formulações adequadas para administração nasal podem, por exemplo, compreender desde cerca de 0,1 % (p/p) e até 75 % (p/p) do ingrediente ativo, e pode ainda compreender um ou mais dos ingredientes adicionais aqui descritos.

Liberação Bucal

[0154]Uma composição farmacêutica da invenção pode ser preparada, embalada ou vendida em uma formulação adequada para administração bucal. Tais formulações podem, por exemplo, estar na forma de comprimidos ou pastilhas feitas utilizando métodos convencionais e podem, por exemplo, 0,1 a 20 % (p/p) de ingrediente ativo, o equilíbrio compreendendo uma composição oralmente dissolúvel ou degradável e, opcionalmente, um ou mais dos ingredientes adicionais aqui descritos. Alternativamente, as formulações adequadas para administração bucal

podem compreender um pó ou uma solução ou suspensão aerossolizada ou atomizada compreendendo o ingrediente ativo. Tais pós aerossolizados ou formulações aerossolizadas, quando dispersos, têm preferivelmente um tamanho médio de partícula ou gotícula na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 200 micrões, e podem ainda compreender um ou mais dos ingredientes adicionais aqui descritos.

Administração Oftálmica

[0155]Uma composição farmacêutica da invenção pode ser preparada, embalada ou vendida em uma formulação adequada para administração oftálmica. Tais formulações podem, por exemplo, estar na forma de colírios, incluindo, por exemplo, uma solução ou suspensão de 0,1 % a 1,0 % (p/p) do ingrediente ativo em um portador líquido aquoso ou oleoso. Tais gotas podem ainda compreender agentes tamponantes, sais ou um ou mais dos outros ingredientes aqui descritos. Outras formulações administradas oftalmicamente que são úteis incluem aquelas que compreendem o ingrediente ativo na forma microcristalina ou em uma preparação de construto lipídico.

Formas de Administração Adicionais

[0156]Formas de dosagem adicionais desta invenção incluem formas de dosagem como descritas nas Patentes U.S. N^{os}s 6.340.475; 6.488.962; 6.451.808; 5.972.389; 5.582.837; e 5.007.790. As formas de dosagem adicionais desta invenção também incluem formas de dosagem como descritas nos Pedidos de Patente U.S. N^{os}s 20030147952; 20030104062; 20030104053; 20030044466; 20030039688; e 20020051820. As formas de dosagem adicionais desta invenção também incluem formas de dosagem como descritas nos Pedidos PCT N^{os}s WO 03/35041; WO 03/35040; WO 03/35029; WO 03/35177; WO 03/35039; WO 02/96404; WO 02/32416; WO 01/97783; WO 01/56544; WO 01/32217; WO 98/55107; WO 98/11879; WO 97/47285; WO 93/18755; e WO 90/11757.

Formulações de Liberação Controlada e Sistemas de Administração de

Fármacos

[0157]Em certas modalidades, as formulações da presente invenção podem ser, mas não estão limitadas a formulações de curto prazo, deslocamento rápido, bem como controladas, por exemplo, de liberação sustentada, liberação retardada e liberação pulsátil.

[0158]O termo liberação sustentada é utilizado em seu sentido convencional para se referir a uma formulação de fármaco que fornece liberação gradual de um fármaco por um longo período de tempo e que, embora não necessariamente, possa resultar em níveis sanguíneos substancialmente constantes de um fármaco durante um período prolongado. O período de tempo pode ser de até um mês ou mais e deve ser uma liberação maior que a mesma quantidade de agente administrada na forma de bolus.

[0159]Para liberação sustentada, as composições podem ser formuladas com um polímero ou material hidrofóbico adequado que fornece propriedades de liberação sustentada aos compostos e/ou composições. Como tal, as composições e/ou composições para utilização do método da invenção podem ser administradas na forma de micropartículas, por exemplo, por injeção ou na forma de bolachas ou discos por implantação.

[0160]Em certas modalidades, os compostos e/ou composições da invenção são administrados a um paciente, sozinho ou em combinação com outro agente farmacêutico, utilizando uma formulação de liberação sustentada.

[0161]O termo liberação retardada é aqui utilizado, no seu sentido convencional, para se referir a uma formulação de fármaco que fornece uma liberação inicial do fármaco após algum atraso após a administração do fármaco e que, embora não necessariamente, inclua um atraso de cerca de 10 minutos até cerca de 12 horas.

[0162]O termo liberação pulsátil é aqui utilizado no seu sentido convencional para se referir a uma formulação de fármaco que proporciona liberação do fármaco

de modo a produzir perfis de plasma pulsados do fármaco após administração do fármaco.

[0163]O termo liberação imediata é utilizado no seu sentido convencional para se referir a uma formulação de fármaco que proporciona a liberação do fármaco imediatamente após a administração do fármaco.

[0164]Como aqui utilizado, curto prazo refere-se a qualquer período de tempo que inclui cerca de 8 horas, incluindo cerca de 8 horas, cerca de 7 horas, cerca de 6 horas, cerca de 5 horas, cerca de 4 horas, cerca de 3 horas, cerca de 3 horas, cerca de 2 horas, cerca de 1 hora, cerca de 40 minutos, cerca de 20 minutos ou cerca de 10 minutos e qualquer um ou todos os incrementos totais ou parciais após a administração do fármaco.

[0165]Como aqui utilizado, deslocamento rápido refere-se a qualquer período de tempo que inclui cerca de 8 horas, incluindo cerca de 8 horas, cerca de 7 horas, cerca de 6 horas, cerca de 5 horas, cerca de 4 horas, cerca de 3 horas, cerca de 2 horas, cerca de 1 hora, cerca de 40 minutos, cerca de 20 minutos ou cerca de 10 minutos e todos e quaisquer incrementos totais ou parciais após a administração do fármaco.

Dosagem

[0166]A quantidade ou dose terapeuticamente eficaz de um composto e/ou composição da presente invenção depende da idade, sexo e peso do paciente, da condição médica atual do paciente e da progressão de uma doença ou distúrbio aqui contemplado no paciente a ser tratado. O especialista na técnica é capaz de determinar dosagens apropriadas, dependendo desses e de outros fatores.

[0167]Uma dose adequada de um composto e/ou composição da presente invenção pode estar na faixa de cerca de 0,01 mg a cerca de 5.000 mg por dia, tal como de cerca de 0,1 mg a cerca de 1.000 mg, por exemplo, de cerca de 1 mg a cerca de 500 mg, como cerca de 5 mg a cerca de 250 mg por dia. A dose pode ser

administrada em uma dose única ou em doses múltiplas, por exemplo, de 1 a 4 ou mais vezes por dia. Quando são utilizadas doses múltiplas, a quantidade de cada dose pode ser igual ou diferente. Por exemplo, uma dose de 1 mg por dia pode ser administrada como duas doses de 0,5 mg, com um intervalo de cerca de 12 horas entre as doses.

[0168]Entende-se que a quantidade de composto e/ou composição doseada por dia pode ser administrada, em exemplos não limitativos, todos os dias, em dias alternados, a cada 2 dias, a cada 3 dias, a cada 4 dias ou a cada 5 dias. Por exemplo, com qualquer administração em dias alternados, uma dose de 5 mg por dia pode ser iniciada na segunda-feira com uma primeira dose subsequente de 5 mg por dia administrada na quarta-feira, uma segunda dose subsequente de 5 mg por dia administrada na sexta-feira e assim por diante.

[0169]No caso em que o estado do paciente não melhorar, a critério do médico, a administração do inibidor da invenção é opcionalmente administrada continuamente; alternativamente, a dose do fármaco administrado é temporariamente reduzida ou temporariamente suspensa por um certo período de tempo (isto é, uma “suspensão de fármacos”). A duração da suspensão de fármacos varia opcionalmente entre 2 dias e 1 ano, incluindo apenas a título de exemplo, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 10 dias, 12 dias, 15 dias, 20 dias, 28 dias, 35 dias, 50 dias, 70 dias, 100 dias, 120 dias, 150 dias, 180 dias, 200 dias, 250 dias, 280 dias, 300 dias, 320 dias, 350 dias ou 365 dias. A redução da dose durante uma suspensão de fármacos inclui de 10 % a 100 %, incluindo, apenas a título de exemplo, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 100 %.

[0170]Uma vez que a melhoria das condições do paciente tenha ocorrido, uma dose de manutenção é administrada, se necessário. Posteriormente, a dosagem ou a frequência da administração, ou ambas, são reduzidas, em função da carga viral, a

um nível em que a doença melhorada é retida. Em certas modalidades, os pacientes requerem tratamento intermitente a longo prazo após qualquer recorrência de sintomas e/ou infecção.

[0171]Os compostos e/ou composições para utilização no método da invenção podem ser formulados na forma de dosagem unitária. O termo “forma de dosagem unitária” refere-se a unidades fisicamente distintas adequadas como dosagem unitária para pacientes em tratamento, com cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de material ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado, opcionalmente em associação com um portador farmacêutico adequado. A forma de dosagem unitária pode ser para uma dose diária única ou uma de várias doses diárias (por exemplo, cerca de 1 a 4 ou mais vezes por dia). Quando são utilizadas doses diárias múltiplas, a forma de dosagem unitária pode ser igual ou diferente para cada dose.

[0172]A toxicidade e eficácia terapêutica de tais regimes terapêuticos são opcionalmente determinadas em culturas celulares ou animais experimentais, incluindo, entre outros, a determinação da LD₅₀ (dose letal para 50 % da população) e da ED₅₀ (a dose terapeuticamente eficaz em 50 % da população). A razão da dose entre os efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico, que é expresso como a razão entre LD₅₀ e ED₅₀. Os dados obtidos a partir de ensaios de cultura de células e estudos em animais são opcionalmente utilizados na formulação de uma faixa de dosagem para utilização em humanos. A dosagem de tais compostos e/ou composições situa-se preferivelmente dentro de uma gama de concentrações que incluem o ED₅₀ em circulação com uma toxicidade mínima. A dosagem opcionalmente varia dentro deste intervalo, dependendo da forma de dosagem utilizada e da via de administração utilizada.

Definições

[0173]A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e

científicos aqui utilizados geralmente têm o mesmo significado que é comumente entendido por um especialista na técnica ao qual a invenção pertence. Geralmente, a nomenclatura aqui utilizada e os procedimentos de laboratório em química orgânica e química de proteínas são aqueles bem conhecidos e comumente empregados na técnica.

[0174]Os artigos “um/uma” são utilizados aqui para se referir a um ou mais de um (ou seja, a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título de exemplo, “um elemento” significa um elemento ou mais de um elemento.

[0175]Como aqui utilizado, o termo “aproximadamente” é entendido pelo especialista na técnica e varia até certo ponto no contexto em que é utilizado. Como aqui utilizado, quando se refere a um valor mensurável, como uma quantidade, uma duração temporal e semelhantes, o termo “aproximadamente” deve abranger variações de $\pm 20\%$ ou $\pm 10\%$, mais preferivelmente $\pm 5\%$, ainda mais preferivelmente $\pm 1\%$, e ainda mais preferivelmente $\pm 0,1\%$ do valor especificado, pois estas variações são apropriadas para realizar os métodos divulgados.

[0176]Como aqui utilizado, o termo “ingrediente ativo” refere-se a um agente terapêutico que deve ser liberado a um sujeito para produzir um efeito terapêutico no sujeito. Exemplos não limitativos de ingredientes ativos contemplados na invenção são insulina, interferon, hormônio paratireoide, calcitonina, serotonina, agonista da serotonina, inibidor da recaptação de serotonina, hormônio do crescimento humano, GIP, anticorpo monoclonal anti-GIP, metformina, bromocriptina, dopamina, glucagon e/ou GLP-1.

[0177]O termo “lipídeo anfipático” significa uma molécula lipídica com uma extremidade polar e não polar.

[0178]Por “meio aquoso” entende-se água ou água contendo tampão ou sal.

[0179]O termo “biodisponibilidade” refere-se a uma medida da taxa e extensão em que a insulina atinge a circulação sistêmica e está disponível nos locais de ação.

[0180]Em um aspecto, os termos “coadministrado” e “coadministração”, relacionados a um sujeito, referem-se à administração ao sujeito de um composto da invenção ou de um sal do mesmo, juntamente com um composto que também pode tratar qualquer doença ou distúrbio aqui contemplado e/ou com um composto que é útil no tratamento de outras condições médicas, mas que por si só elas podem causar ou facilitar qualquer doença ou distúrbio aqui contemplado. Em certas modalidades, os compostos coadministrados são administrados separadamente ou em qualquer tipo de combinação como parte de uma única abordagem terapêutica. O composto coadministrado pode ser formulado em quaisquer tipos de combinações como misturas de sólidos e líquidos sob uma variedade de formulações sólidas, em gel e líquidas e como uma solução.

[0181]Como aqui utilizado, uma “doença” é um estado de saúde de um indivíduo, em que o sujeito não pode manter a homeostase, e em que, se a doença não é melhorada, em seguida, a saúde do sujeito continua a deteriorar-se.

[0182]Como aqui utilizado, uma “desordem” em um sujeito é um estado de saúde em que o sujeito é capaz de manter a homeostase, mas em que o estado de saúde do sujeito é menos favorável do que seria na ausência da doença. Não tratada, a doença não causaria necessariamente uma redução ainda maior no estado de saúde do sujeito.

[0183]Como aqui utilizado, o termo “ED₅₀” refere-se à dose eficaz de uma formulação que produz 50 % do efeito máximo em indivíduos que é administrada com a formulação.

[0184]Como aqui utilizado, uma “quantidade eficaz”, “quantidade terapeuticamente eficaz” ou “quantidade farmaceuticamente eficaz” de um composto é a quantidade de composto que é suficiente para proporcionar um efeito benéfico para o sujeito ao qual é administrado o composto.

[0185]O termo “ingrediente ativo livre” ou “agente terapêutico livre” refere-se

a um ingrediente ativo ou agente terapêutico que não está disperso na partícula lipídica (isto é, localizado dentro, adsorvido e/ou ligado à membrana da partícula lipídica).

[0186]Os termos “glargina” e “insulina glargina” se referem a um análogo de insulina humana recombinante que difere da insulina humana, pois o aminoácido asparagina na posição A21 é substituído pela glicina e duas argininas são adicionadas ao terminal C da cadeia B. Quimicamente, é a insulina humana 21^A-Gli-30^{Ba}-L-Arg-30^{Bb}-L-Arg e tem a fórmula empírica C₂₆₇H₄₀₄N₇₂O₇₈S₆ e um peso molecular de 6.063.

[0187]“Material instrucional”, tal como o termo é aqui utilizado, inclui uma publicação, uma gravação, um diagrama ou qualquer outro meio de expressão que pode ser utilizado para comunicar a utilidade da composição e/ou o composto da invenção em um kit. O material instrucional do kit pode, por exemplo, ser afixado em um recipiente que contém o composto e/ou composição da invenção ou ser transportado junto com um recipiente que contém o composto e/ou composição. Alternativamente, o material instrucional pode ser enviado separadamente do recipiente com a intenção de que o destinatário use o material instrucional e o composto cooperativamente. A liberação do material instrucional pode ser, por exemplo, a liberação física da publicação ou outro meio de expressão que comunique a utilidade do kit ou, alternativamente, ser obtida por transmissão eletrônica, por exemplo, por meio de um computador, como por meio eletrônico correio ou faça o download de um site.

[0188]O termo “insulina” refere-se a formas naturais ou recombinantes de insulina e derivados das insulinas acima mencionadas. Exemplos de insulina incluem, entre outros, insulina lispro, insulina aspártica (como, por exemplo, FIASP®, Novo Nordisk), insulina regular, insulina glargina, insulina zinco, insulina zinco humana prolongada, insulina isofana, insulina regular tamponada humana, insulina glulisina, insulina regular humana recombinante e insulina isofana humana recombinante.

Também estão incluídas as insulinas animais, como a insulina bovina ou suína.

[0189]O termo “ponto isoelétrico” refere-se ao pH no qual as concentrações de cargas positivas e negativas na proteína são iguais e, como resultado, a proteína expressará uma carga líquida nula. No ponto isoelétrico, uma proteína existirá quase inteiramente na forma de um *zwitterion*, ou híbrida entre as formas da proteína. As proteínas são menos estáveis em seus pontos isoelétricos e são mais facilmente coaguladas ou precipitadas nesse pH. No entanto, as proteínas não são desnaturadas por precipitação isoelétrica, pois este processo é essencialmente reversível.

[0190]O termo “construto lipídico” refere-se a uma partícula lipídica e/ou fosfolipídica na qual moléculas lipídicas individuais interagem para criar uma membrana lipídica bipolar que define os limites do construto lipídico.

[0191]Como o termo é aqui utilizado, “modular” ou “modulação” de um processo ou estado biológico ou químico refere-se à alteração do curso normal do processo biológico ou químico ou à alteração do estado do processo biológico ou químico para um novo estado que é diferente do estado atual. Por exemplo, a modulação do ponto isoelétrico de um polipeptídio pode envolver uma alteração que aumenta o ponto isoelétrico do polipeptídio. Alternativamente, a modulação do ponto isoelétrico de um polipeptídio pode envolver uma alteração que diminui o ponto isoelétrico de um polipeptídio.

[0192]O termo “insulina não glarginha” refere-se a todas as insulinas, naturais ou recombinantes, que não são insulina glarginha. O termo inclui porções semelhantes à insulina, incluindo fragmentos de moléculas de insulina, que possuem atividade biológica de insulinas.

[0193]Como aqui utilizado, o termo “composição farmacêutica” ou “composição” refere-se a uma mistura de pelo menos um composto útil dentro da invenção com um portador farmaceuticamente aceitável. A composição farmacêutica facilita a administração do composto a um sujeito.

[0194]Como aqui utilizado, o termo “farmaceuticamente aceitável” refere-se a um material, como um portador ou diluente, que não anula a atividade biológica ou as propriedades do composto útil dentro da invenção e é relativamente não-tóxico, ou seja, o material pode ser administrado a um sujeito sem causar efeitos biológicos indesejáveis ou interagir de maneira prejudicial com qualquer um dos componentes da composição em que está contido.

[0195]Como aqui utilizado, o termo “portador farmaceuticamente aceitável” significa um material, composição ou portador farmaceuticamente aceitável, como um agente de enchimento líquido ou sólido, estabilizador, agente dispersante, agente de suspensão, diluente, excipiente, agente espessante, solvente ou material encapsulante, envolvido no transporte ou transporte de um composto útil dentro da invenção dentro ou para o sujeito, de modo que ele possa desempenhar sua função pretendida. Tipicamente, esses construtos são carregados ou transportados de um órgão, ou parte do corpo, para outro órgão, ou parte do corpo. Cada portador deve ser “aceitável” no sentido de ser compatível com os outros ingredientes da formulação, incluindo o composto útil dentro da invenção, e não prejudicial ao sujeito. Alguns exemplos de materiais que podem servir como portadores farmaceuticamente aceitáveis incluem: açúcares, como lactose, glicose e sacarose; amidos, tais como amido de milho e amido de batata; celulose e seus derivados, tais como carboximetilcelulose de sódio, etilcelulose e acetato de celulose; tragacanto em pó; malte; gelatina; talco; excipientes, como manteiga de cacau e ceras para supositórios; óleos, tais como óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de açafrão, óleo de gergelim, azeite, óleo de milho e óleo de soja; glicóis, tais como propilenoglicol; polióis, tais como glicerina, sorbitol, manitol e polietileno glicol; ésteres, tais como oleato de etila e laurato de etila; ágar; agentes tamponantes, tais como hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio; agentes tensoativos; ácido algínico; água livre de pirogênio; solução salina isotônica; solução de Ringer; álcool etílico; soluções tampão

de fosfato; e outras substâncias compatíveis não tóxicas empregadas em formulações farmacêuticas. Como aqui utilizado, “portador farmaceuticamente aceitável” também inclui todos e quaisquer revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos e agentes retardadores de absorção, e semelhantes que sejam compatíveis com a atividade do composto útil dentro da invenção e sejam fisiologicamente aceitáveis para o sujeito. Compostos ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições. O “portador farmaceuticamente aceitável” pode ainda incluir um sal farmaceuticamente aceitável do composto útil dentro da invenção. Outros ingredientes adicionais que podem ser incluídos nas composições farmacêuticas utilizadas na prática da invenção são conhecidos na técnica e descritos, por exemplo em Remington’s Pharmaceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA), que é aqui incorporado por referência.

[0196]Como aqui utilizado, a linguagem “sal farmaceuticamente aceitável” refere-se a um sal do composto administrado preparado a partir de ácidos e bases não-tóxicos farmaceuticamente aceitáveis, incluindo ácidos inorgânicos, bases inorgânicas, ácidos orgânicos, bases inorgânicas, solvatos, hidratos e clatratos dos mesmos.

[0197]O termo “prevenir”, “prevenindo” ou “prevenção”, como aqui utilizado, significa evitar ou retardar o aparecimento de sintomas associados com uma doença ou estado em um sujeito, que não desenvolveu estes sintomas no momento em que a administração de um agente ou composto começa. Doença, condição e distúrbio são aqui utilizados indiferentemente.

[0198]Pelo termo “ligar especificamente” ou “liga-se especificamente”, como aqui utilizado, entende-se que uma primeira molécula se liga preferivelmente a uma segunda molécula (por exemplo, um receptor ou enzima particular), mas não necessariamente, se ligar apenas a esta segunda molécula.

[0199]Como aqui utilizado, um “sujeito” pode ser um mamífero humano ou não

humano ou um pássaro. Mamíferos não humanos incluem, por exemplo, gado e animais de estimação, como mamíferos ovinos, bovinos, suínos, caninos, felinos e murinos. Em certas modalidades, o sujeito é humano.

[0200]O termo “tratar”, “tratando” ou “tratamento”, como aqui utilizado, significa a redução da frequência ou gravidade com o qual os sintomas de uma doença ou condição são experimentadas por um sujeito em virtude da administração de um agente ou composto ao sujeito.

[0201]Ao longo desta divulgação, vários aspectos da invenção podem ser apresentados em um formato de faixa. Deve ser entendido que a descrição no formato de faixa é meramente por conveniência e brevidade e não deve ser interpretada como uma limitação inflexível no escopo da invenção. Por conseguinte, a descrição de uma faixa deve ser considerada como tendo sido divulgado especificamente todos as subfaixas possíveis, bem como valores numéricos individuais dentro dessa faixa e, quando apropriado, números inteiros parciais dos valores numéricos dentro das faixas. Por exemplo, a descrição de uma faixa como 1 a 6 deve ser considerada como tendo subfaixas especificamente divulgadas, como 1 a 3, 1 a 4, 1 a 5, 2 a 4, 2 a 6, de 3 a 6 etc., bem como números individuais dentro dessa faixa, por exemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 e 6. Isso se aplica independentemente da amplitude da faixa.

[0202]Os especialistas na técnica reconhecerão, ou serão capazes de verificar, utilizando não mais do que experimentação de rotina, numerosos equivalentes aos procedimentos específicos, modalidades, reivindicações e exemplos aqui descritos. Tais equivalentes são considerados como estando dentro do escopo desta invenção e cobertos pelas reivindicações anexas. Por exemplo, deve-se entender que as modificações nas condições da reação, incluindo, mas não se limitando a, tempos de reação, tamanho/volume da reação e reagentes experimentais, como solventes, catalisadores, pressões, condições atmosféricas, por exemplo, atmosfera de nitrogênio e agentes redutores/oxidantes, com alternativas reconhecidas

na técnica e utilizando não mais que experimentação de rotina, estão dentro do escopo do presente pedido.

[0203]Deve ser entendido que onde quer que valores e faixas sejam fornecidos aqui, todos os valores e faixas abrangidos por esses valores e faixas devem ser abrangidos pelo escopo da presente invenção. Além disso, todos os valores que caem dentro dessas faixas, bem como os limites superior ou inferior de uma faixa de valores, também são contemplados pelo presente pedido.

[0204]Os exemplos a seguir ilustram ainda aspectos da presente invenção. No entanto, eles não são de forma alguma uma limitação dos ensinamentos ou da divulgação da presente invenção, conforme estabelecido aqui.

EXEMPLOS EXPERIMENTAIS

[0205]A invenção é agora descrita com referência aos seguintes Exemplos. Estes exemplos são fornecidos apenas para fins ilustrativos e a invenção não deve, de maneira alguma, ser interpretada como limitada a esses exemplos, mas deve ser interpretada de modo a abranger toda e qualquer variação que se torne evidente como resultado do ensino aqui fornecido.

[0206]Sem descrição adicional, acredita-se que um especialista na técnica possa, utilizando a descrição anterior e os seguintes exemplos ilustrativos, fabricar e utilizar os compostos da presente invenção e praticar os métodos reivindicados. Os exemplos de trabalho a seguir, portanto, apontam modalidades específicas da presente invenção, e não devem ser interpretados como limitantes de qualquer forma ao restante da divulgação.

[0207]Os materiais e métodos utilizados nas experiências apresentadas neste Exemplo Experimental são agora descritos.

Exemplo 1:

[0208]As composições citadas na Tabela 1 foram preparadas e caracterizadas:

Tabela 1

Formulação (mg/mL)

Componente	A	B	C	D
Diestearoil fosfatidilcolina (DSPC)	10,075	8,063	10,075	7,53
Fosfato de dicetila (DCP)	2,575	2,575	2,575	2,57
Colesterol	1,330	1,330	1,330	1,33
Biotina PE	0,220	0,220	0,220	0,21
Estearoil lisofosfatidilcolina	0	2,0	0	1,21
<i>m</i> -creosol	0	0	3,000	3,00

[0209] Os compostos anfipáticos são re-solubilizados em uma mistura de clorofórmio/metanol (2 : 1), seguida pela remoção de solventes orgânicos sob evaporação por roto-evaporação e vácuo. O material seco foi então hidratado com o tampão fosfato e homogeneizado até um tamanho de partícula inferior a 100 nm.

[0210] Três formulações são ilustradas na Tabela 1. A Formulação A é uma formulação de nanopartículas de controle, que fornece um tamanho característico de partículas pequenas. O tamanho de partícula determinado para a Formulação A foi <100 nm. É interessante notar que, dentro de duas semanas de sua preparação, verificou-se que a Formulação A formava estruturas flutuantes finas, que são agregados destrutíveis de nanopartículas individuais (FIGS. 1A-1B). Os agregados de nanopartículas sofreram pequenos aumentos em tamanho ao longo do período de vários meses.

[0211] Na Formulação B, 25 % de DSPC foram substituídos por estearoil lisofosfatidilcolina. O tamanho de partícula determinado para a Formulação B foi <100 nm. As partículas formadas na Formulação B foram comparáveis em tamanho às da Formulação A, mas a Formulação B não formou estruturas finas, como as observadas na Formulação A.

[0212] A Formulação C tem a mesma quantidade de DSPC que a Formulação A, mas compreende ainda 3 % (em peso) de *m*-creosol. O *m*-cresol é incorporado de

maneira a impedir a agregação das nanopartículas, e a Formulação C de fato não forma estruturas finas, como as da Formulação A. Outras estruturas fenólicas que possuem estruturas semelhantes ao *m*-cresol podem ser utilizadas para estabilizar as nanopartículas.

[0213]Em certas modalidades, a estearoil lisofosfatidilcolina e/ou pelo menos um composto fenólico pode ser adicionado à mistura anfipática inicial antes da homogeneização. Em outras modalidades, o pelo menos um composto fenólico pode ser adicionado após a homogeneização. Sem querer estar limitado por qualquer teoria, o pelo menos um composto fenólico é absorvido pelas extremidades da membrana para estabilizar as partículas.

Exemplo 2: Bioeficácia de nanopartículas com extremidades estabilizadas:

[0214]Duas versões de nanopartículas direcionadas aos hepatócitos que compreendem insulina lispro foram testadas em cães deficientes em insulina para determinar sua eficácia como agentes hipoglicêmicos. A Formulação A foi comparada com um exemplo não limitativo de uma formulação da invenção (Formulação B). Como um estudo de controle, foi utilizada uma insulina lispro comercial sem qualquer direcionamento de hepatócitos. Os cães foram mantidos em uma instalação reconhecida de pesquisa com animais, com todos os controles regulatórios apropriados. As concentrações de nanopartículas, doses de insulina lispro, consumo de alimentos e época do estudo foram comparáveis neste estudo cruzado.

[0215]Neste estudo aberto cruzado, cães machos beagle pesando de 5 a 10 kg foram deficientes em insulina com tratamento com estreptozotocina. Depois de estabilizados com injeções parentéricas de insulina e alimentação padronizada de dietas controle, os cães foram submetidos a jejum durante a noite. Os níveis de glicose no sangue dos cães foram < 200 mg/dl/kg de peso corporal para ser utilizado para o estudo.

[0216]Os cães foram alimentados com uma quantidade prescrita de dieta

canina padrão 30 minutos após uma injeção subcutânea de insulina lispro em várias formulações: insulina lispro direcionada a hepatócitos (Formulação A), insulina lispro direcionada a hepatócitos (Formulação B) ou insulina comercial lispro sem qualquer direcionamento de hepatócitos (controle). As formulações A e B tiveram efeitos semelhantes no teste de tolerância à glicose oral (FIG. 2), mostrando uma redução acentuada dos níveis de glicose no sangue após a refeição de teste nos cães em comparação com uma dose idêntica de insulina com insulina de controle lispro. Além disso, a formulação B revelou um melhor desempenho global neste teste de tolerância que a Formulação A. Em conclusão, as membranas fosfolipídicas, que não são esferas perfeitas ou completas, melhoram a estabilidade das partículas quando materiais como estearoil lisofosfatidilcolina ou um composto fenólico (como *m*-creosol) são adicionados às membranas. Estas formulações proporcionam uma estabilidade mais desejável e evitam agregações de partículas em comparação com formulações sem esses componentes estabilizadores.

Exemplo 3:

[0217]As FIGS. 3 e 4 ilustram maior estabilidade química e estabilidade de partículas observadas após adição de quantidades crescentes de lisolecitina nas composições de HDV da invenção.

[0218]A adição de lisolecitina, substituindo, por exemplo, uma porção de diestearoil lecitina (DSPC), evita uma tendência do HDV para formar flocos brancos durante a primeira semana após a fabricação. Sem desejar estar limitado por qualquer teoria, a descamação pode ser causada por extremidades fragmentadas da estrutura de HDV, o que permite que as unidades de HDV adiram umas às outras. Em certas modalidades, a descamação pode ser um problema no processo de fabricação, exigindo etapas adicionais de filtragem.

[0219]Além disso, como demonstrado na FIG. 4, a formação de lisolecitina a partir de DSPC é inibida pela adição inicial de lisolecitina à composição. Além disso,

isso ocorre sem aumentos mensuráveis no ácido esteárico.

[0220]Tomados em conjunto, os dados apresentados demonstram que a utilização de lisolecitina para substituir uma porção de DSPC nas composições da invenção fornece vantagem para a produção de composições de HDV, pelo menos porque permite um processo de fabricação mais confiável, reduz o número geral de etapas do processo e também melhora a estabilidade das composições da invenção.

[0221]As divulgações de toda e qualquer patente, pedido de patente e publicação aqui citadas são aqui incorporadas por referência na sua totalidade. Embora esta invenção tenha sido divulgada com referência a modalidades específicas, é aparente que outras modalidades e variações desta invenção podem ser criadas por outros especialistas na técnica sem se afastar do verdadeiro espírito e escopo da invenção. As reivindicações anexas pretendem ser interpretadas para incluir todas estas modalidades e variações equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende uma nanopartícula à base de lipídeo,

em que a nanopartícula é fechado por uma membrana lipídica bipolar e, que compreende colesterol, fosfato de dicetila, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) e fosfato de 2,3-diacetoxipropil 2-(5-((3aS,6aR)-2-oxo-hexa-hidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)etila (biotina DHPE),

em que a membrana compreende ainda pelo menos um agente selecionado do grupo que consiste em estearoil lisofosfatidilcolina e m-cresol;

em que a membrana compreende colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina, m-cresol e biotina-DHPE em uma razão de % (p/p) selecionada a partir do grupo que consiste em:

(a) cerca de 9,4 : 18,1 : 56,8 : 14,1 : 0,0 : 1,5;

(b) cerca de 7,7 : 15,0 : 58,6 : 0,0 : 17,4 : 1,3; e

(c) cerca de 8,4: 16,2 : 47,5 : 7,6 : 19,0 : 1,3;

em que a biotina DHPE estende-se para fora da nanopartícula; e

em que o tamanho da nanopartícula varia de cerca de 10 nm a cerca de 150 nm.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que um agente terapêutico está disperso dentro da nanopartícula.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o agente terapêutico está ligado covalentemente à nanopartícula.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o agente terapêutico não está ligado covalentemente à nanopartícula.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o agente terapêutico compreende pelo menos um selecionado do grupo que consiste em insulina, análogos de insulina, interferon, hormônio da paratireóide,

calcitonina, serotonina, agonista da serotonina, inibidor da recaptação da serotonina, hormônio de crescimento humano, GIP, anticorpo monoclonal anti-GIP, metformina, bromocriptina, dopamina, glucagon, amilina e GLP-1.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a nanopartícula está suspensa em uma solução aquosa compreendendo um agente terapêutico dissolvido livre que não está disperso na nanopartícula.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o agente terapêutico é insulina.

8. Composição, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a insulina dispersa na nanopartícula e a insulina dissolvida livre são selecionadas independentemente do grupo que consiste em insulina lispro, insulina aspártica, insulina regular, insulina glargina, insulina zinco, suspensão prolongada de insulina humana zinco, insulina isofana, insulina regular tamponada humana, insulina glulisina, insulina regular humana recombinante, insulina isofana humana recombinante e quaisquer combinações das mesmas.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende ainda o ftalato de acetato de celulose, que está pelo menos parcialmente ligado ao agente terapêutico disperso dentro da nanopartícula.

10. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende ainda pelo menos uma molécula orgânica carregada associada ao agente terapêutico disperso na nanopartícula, em que a molécula orgânica carregada é pelo menos um selecionado do grupo que consiste em protaminas, polilisina, poli(arg-pro-thr)_n em uma razão molar de 1 : 1 : 1, poli(DL-Ala-poli-L-lis)_n em uma razão molar de 6 : 1, histonas, polímeros de açúcar compreendendo um grupo amino primário, polinucleotídeos com grupos amino primários, proteínas que compreendem resíduos de aminoácidos com grupos funcionais carboxila (COO⁻) ou sulfidral (S⁻) e polímeros ácidos.

11. Método de preparar a nanopartícula à base de lipídeo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende contatar um sistema aquoso de colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, biotina-DHPE e o pelo menos um agente.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pelo menos um agente é o m-cresol e é adicionado ao sistema aquoso, após o colesterol, fosfato de dicetila, DCPE, estearoil lisofosfatidilcolina se presente, e biotina DHPE terem sido contatados no sistema aquoso.

13. Método, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a nanopartícula compreende um agente terapêutico nela disperso.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente terapêutico, colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, pelo menos um agente e biotina-DHPE são simultaneamente contatados no sistema aquoso.

15. Método, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a nanopartícula é formada na ausência do agente terapêutico, em que opcionalmente a nanopartícula é pelo menos parcialmente concentrada, purificada ou isolada, e em que o agente terapêutico é contatado com a nanopartícula, em que pelo menos uma porção do agente terapêutico está dispersa dentro da nanopartícula.

16. Método de tratar uma doença em um mamífero, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao mamífero em necessidade do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição de acordo com a reivindicação 2.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a doença é diabetes mellitus e o agente terapêutico compreende insulina.

18. Método de ativar a glicogênio sintase hepática em um mamífero, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao mamífero em necessidade do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição de acordo com a reivindicação 2, em que o agente terapêutico compreende insulina.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o mamífero tem diabetes mellitus.

20. Composição, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende uma nanopartícula à base de lipídeo,

em que a nanopartícula está envolvida por uma membrana lipídica bipolar compreendendo colesterol, fosfato de dicetila, um lipídeo anfipático e uma molécula de ligação ao receptor de hepatócito;

em que o lipídeo anfipático compreende pelo menos um selecionado do grupo que consiste em 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocololina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-[3-fosfo-rac-(1-glicerol)], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinil), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato e 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina;

em que a membrana compreende pelo menos um agente selecionado do grupo que consiste em um estabilizador e estearoil lisofosfatidilcolina;

em que o estabilizador é selecionado do grupo que consiste em m-cresol, álcool benzílico, 4-hidroxibenzoato de metila, tiomersal e hidroxitolueno (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol) butilado e em que, se presente, o estabilizador varia de cerca de 10 % a cerca de 25 % (p/p) na membrana;

em que, se presente, a estearoil lisofosfatidilcolina varia de cerca de 5 % a cerca de 30 % (p/p) na membrana;

em que pelo menos uma molécula de ligação ao receptor de hepatócito se estende para fora da nanopartícula; e

em que o tamanho da nanopartícula varia de cerca de 10 nm a cerca de 150 nm.

21. Composição, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que um agente terapêutico está disperso dentro da nanopartícula.

22. Composição, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o agente terapêutico está ligado covalentemente à nanopartícula.

23. Composição, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o agente terapêutico não está ligado covalentemente à nanopartícula.

24. Composição, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o agente terapêutico compreende pelo menos um selecionado do grupo que consiste em insulina, interferon, hormônio da paratireoide, calcitonina, serotonina, agonista da serotonina, inibidor da recaptação da serotonina, hormônio do crescimento humano, GIP, anticorpo monoclonal anti-GIP, metformina, bromocriptina, dopamina, glucagon e GLP-1.

25. Composição, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a nanopartícula está suspensa em uma solução aquosa compreendendo um agente terapêutico dissolvido livre que não está disperso na nanopartícula.

26. Composição, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o agente terapêutico é insulina.

27. Composição, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a insulina dispersa na nanopartícula e a insulina dissolvida livre são selecionadas independentemente do grupo que consiste em insulina lispro, insulina aspártica, insulina regular, insulina glargina, insulina zinco, suspensão prolongada de insulina humana zinco, insulina isofana, insulina regular tamponada humana, insulina glulisina, insulina regular humana recombinante, insulina isofana humana recombinante e quaisquer combinações das mesmas.

28. Composição, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o lipídeo anfipático compreende pelo menos um selecionado do grupo que consiste em 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocololina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina e 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-

(succinil).

29. Composição, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a molécula de ligação ao receptor de hepatócito compreende biotina.

30. Composição, de acordo com a reivindicação 29, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a molécula de ligação ao receptor de hepatócito contendo biotina compreende pelo menos um selecionado do grupo que consiste em biotina N-hidroxissuccinimida (NHS); sulfo-NHS-biotina; biotina de cadeia longa de N-hidroxissuccinimida; biotina de cadeia longa de sulfo-N-hidroxissuccinimida; D-biotina; biocitina; sulfo-N-hidroxissuccinimida-S-S-biotina; biotina-BMCC; biotina-HPDP; iodoacetil-LC-biotina; biotina-hidrazida; biotina-LC-hidrazida; biocitina hidrazida; biotina cadaverina; carboxibiotina; fotobiotina; trifluoroacetato de *p*-aminobenzoil-biocitina; *p*-diazobenzoil-biocitina; biotina-DHPE fosfato de (2,3-diacetoxipropil 2-(5-((3aS,6aR)-2-oxo-hexa-hidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)etila); biotina-X-DHPE fosfato de (2,3-diacetoxipropil 2-(6-(5-((3aS,6aR)-2-oxo-hexa-hidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamido))etila); ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico; éster succinimidílico do ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico; S-biotinil homocisteína; biocitina-X; biocitina X-hidrazida; biotinetilenodiamina; biotina-XL; biotina-X-etilenodiamina; biotina-XX hidrazida; biotina-XX-SE; biotina-XX, SSE; biotina-X-cadaverina; biocitina α -(t-BOC); N-(biotinil)-N'-(iodoacetil) etilenodiamina; DNP-X-biocitina-X-SE; biotina-X-hidrazida; cloridreto de norbiotinamina; 3-(N-maleimidilpropionil)biocitina; ARP; biotina-1-sulfóxido; biotina éster metílico; biotina-maleimida; biotina-poli(etilenoglicol)amina; (+) biotina sal de sódio do ácido 4-amidobenzoico; biotina 2-N-acetilamino-2-desóxi- β -D-glucopiranosídeo; biotina- α -D-N-acetylneuraminida; biotina- α -L-fucosídeo; biotina lacto-N-biosídeo; biotina-Lewis-A trissacarídeo; biotina-Lewis-Y tetrassacarídeo; biotina- α -D-manopiranosídeo; e biotina 6-O-fosfo- α -D-manopiranosídeo.

31. Composição, de acordo com a reivindicação 29, **CARACTERIZADA** pelo

fato de que a molécula de ligação ao receptor de hepatócito contendo biotina compreende pelo menos um selecionado do grupo que consiste em biotina-DHPE e biotina-X-DHPE.

32. Composição, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende ainda o ftalato de acetato de celulose, que está pelo menos parcialmente ligado ao agente terapêutico disperso na nanopartícula.

33. Composição, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende ainda pelo menos uma molécula orgânica carregada ligada ao agente terapêutico disperso na nanopartícula, em que a molécula orgânica carregada é pelo menos um selecionado do grupo que consiste em protaminas, polilisina, poli(arg-pro-thr)_n em uma razão molar de 1 : 1 : 1, poli(DL-Ala-poli-L-lis)_n em uma razão molar de 6 : 1, histonas, polímeros de açúcar compreendendo um grupo amino primário, polinucleotídeos com grupos amino primários, proteínas que compreendem resíduos de aminoácidos com grupos funcionais carboxila (COO⁻) ou sulfidral (S⁻) e polímeros ácidos.

34. Composição, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o colesterol varia de cerca de 5 % a cerca de 15 % (p/p) na membrana.

35. Composição, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o fosfato de dicetila varia de cerca de 10 % a cerca de 25 % (p/p) na membrana.

36. Composição, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o DSPC varia de cerca de 40 % a cerca de 75 % (p/p) na membrana.

37. Composição, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a molécula de ligação ao receptor de hepatócito varia de cerca de 0,5 % a cerca de 4 % (p/p) na membrana.

38. Composição, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a quantidade de estearoil lisofosfatidilcolina na membrana é de cerca de

5 % a 30 % (p/p) da quantidade de DSPC na membrana.

39. Composição, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a membrana compreende um dos seguintes:

(a) colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina, m-cresol e pelo menos um selecionado do grupo que consiste em biotina-DHPE e biotina-X-DHPE;

(b) colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, m-cresol e pelo menos um selecionado do grupo que consiste em biotina-DHPE e biotina-X-DHPE; e

(c) colesterol, fosfato de dicetila, DSPC, estearoil lisofosfatidilcolina e pelo menos um selecionado do grupo que consiste em biotina-DHPE e biotina-X-DHPE.

40. Método de preparar a nanopartícula à base de lipídeo, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende contatar um sistema aquoso de colesterol, fosfato de dicetila, lipídeo anfipático, molécula de ligação ao receptor de hepatócito e pelo menos um agente.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos um agente compreende um estabilizador, que é adicionado ao sistema aquoso após colesterol, fosfato de dicetila, lipídeo anfipático, estearoil lisofosfatidilcolina se presente e a molécula de ligação ao receptor de hepatócito terem sido contatados no sistema aquoso.

42. Método, de acordo com a reivindicação 40, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a nanopartícula compreende um agente terapêutico nela disperso.

43. Método, de acordo com a reivindicação 42, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente terapêutico, colesterol, fosfato de dicetila, lipídeo anfipático, molécula de ligação ao receptor de hepatócito e pelo menos um agente são simultaneamente contatados no sistema aquoso.

44. Método, de acordo com a reivindicação 42, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a nanopartícula é formada na ausência do agente terapêutico, em que

opcionalmente a nanopartícula é pelo menos parcialmente concentrada, purificada ou isolada e em que o agente terapêutico é contatado com a nanopartícula, pelo qual pelo menos uma porção do agente terapêutico está dispersa dentro da nanopartícula.

45. Método de tratar uma doença em um mamífero, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao mamífero em necessidade do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição, de acordo com a reivindicação 21.

46. Método, de acordo com a reivindicação 45, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a doença é diabetes mellitus e o agente terapêutico compreende insulina.

47. Método de ativar glicogênio sintase hepática em um mamífero, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao mamífero em necessidade do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição de acordo com a reivindicação 21, em que o agente terapêutico compreende insulina.

48. Método, de acordo com a reivindicação 47, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o mamífero tem diabetes mellitus.

FIG. 1A

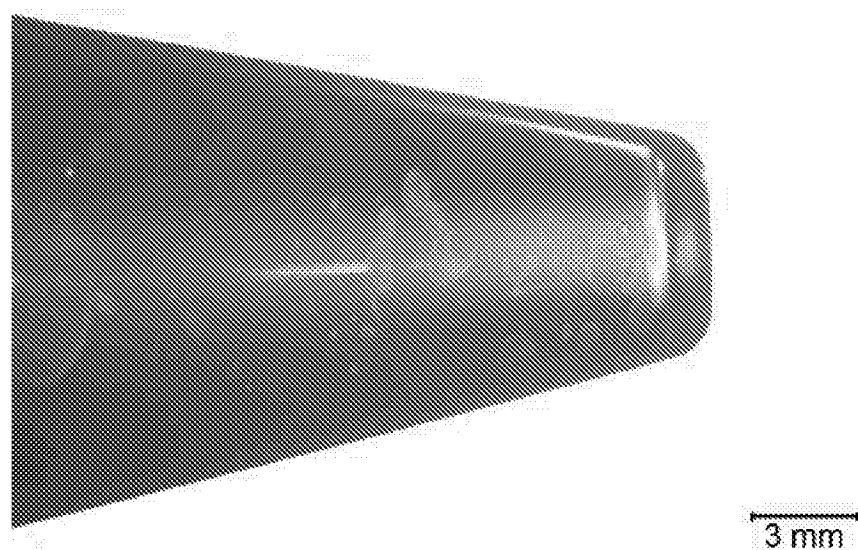


FIG. 1B

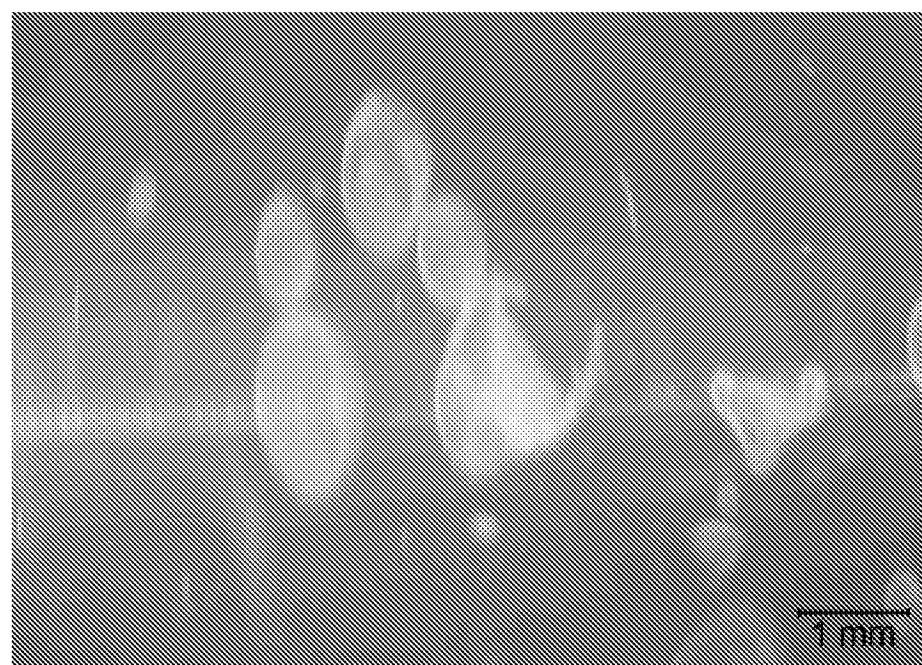


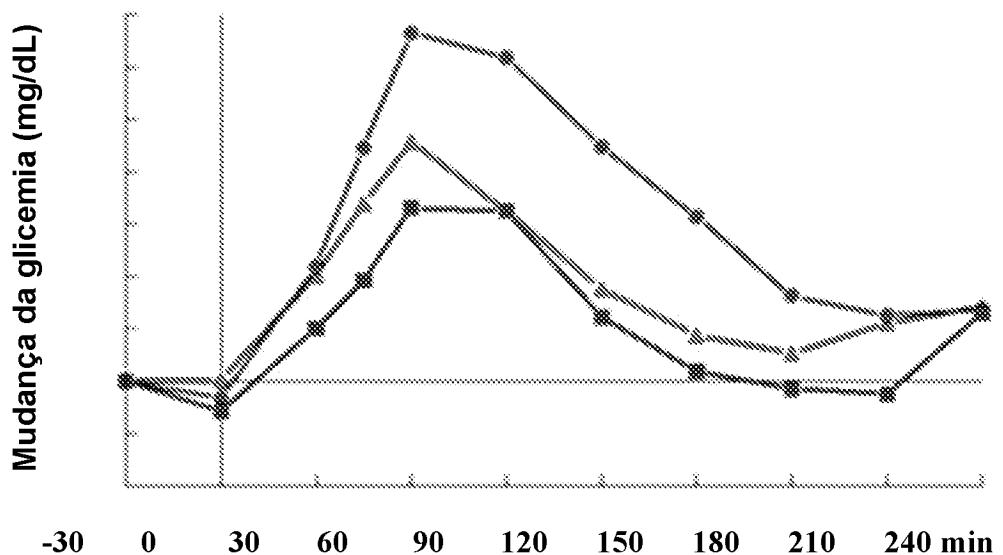
FIG. 2

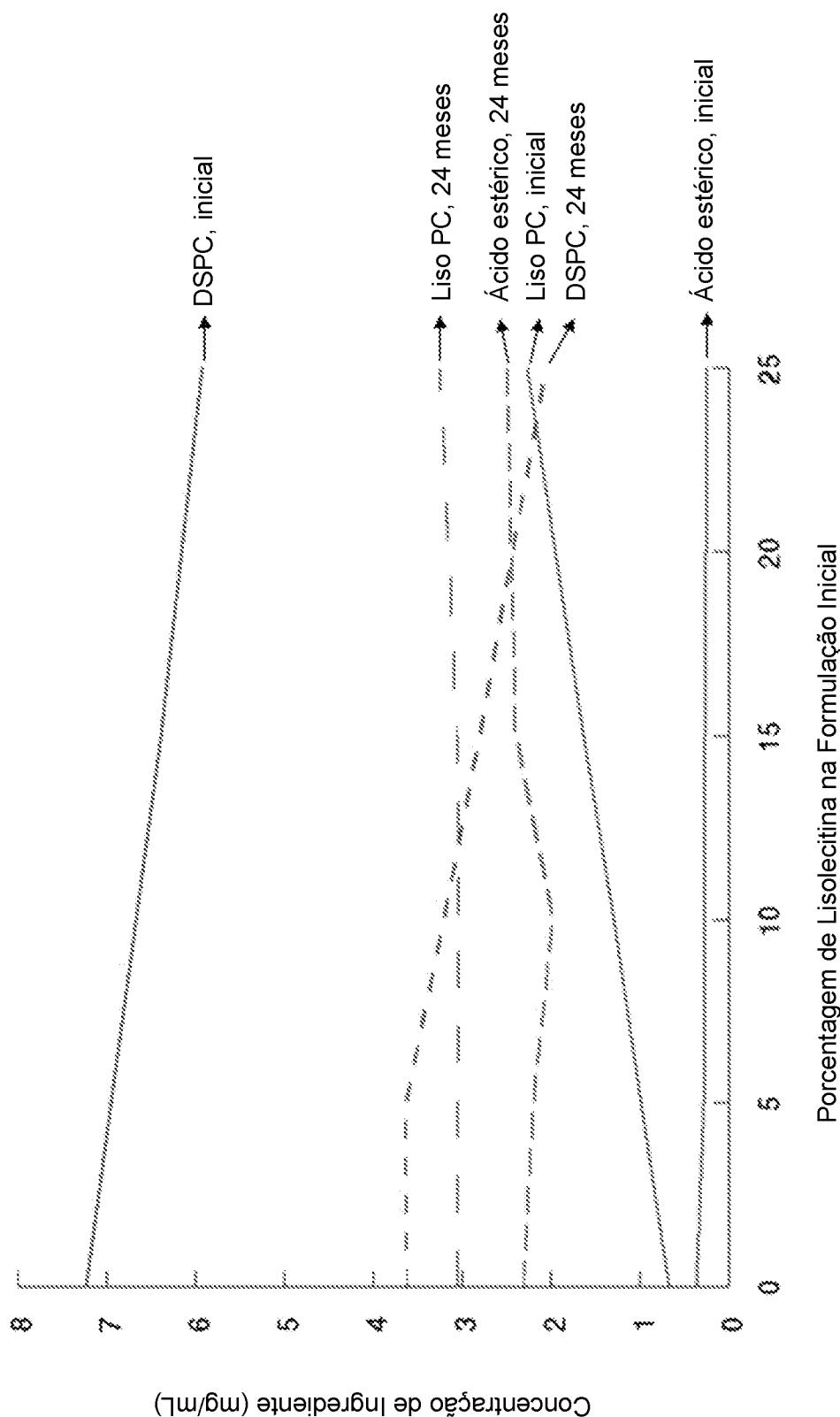
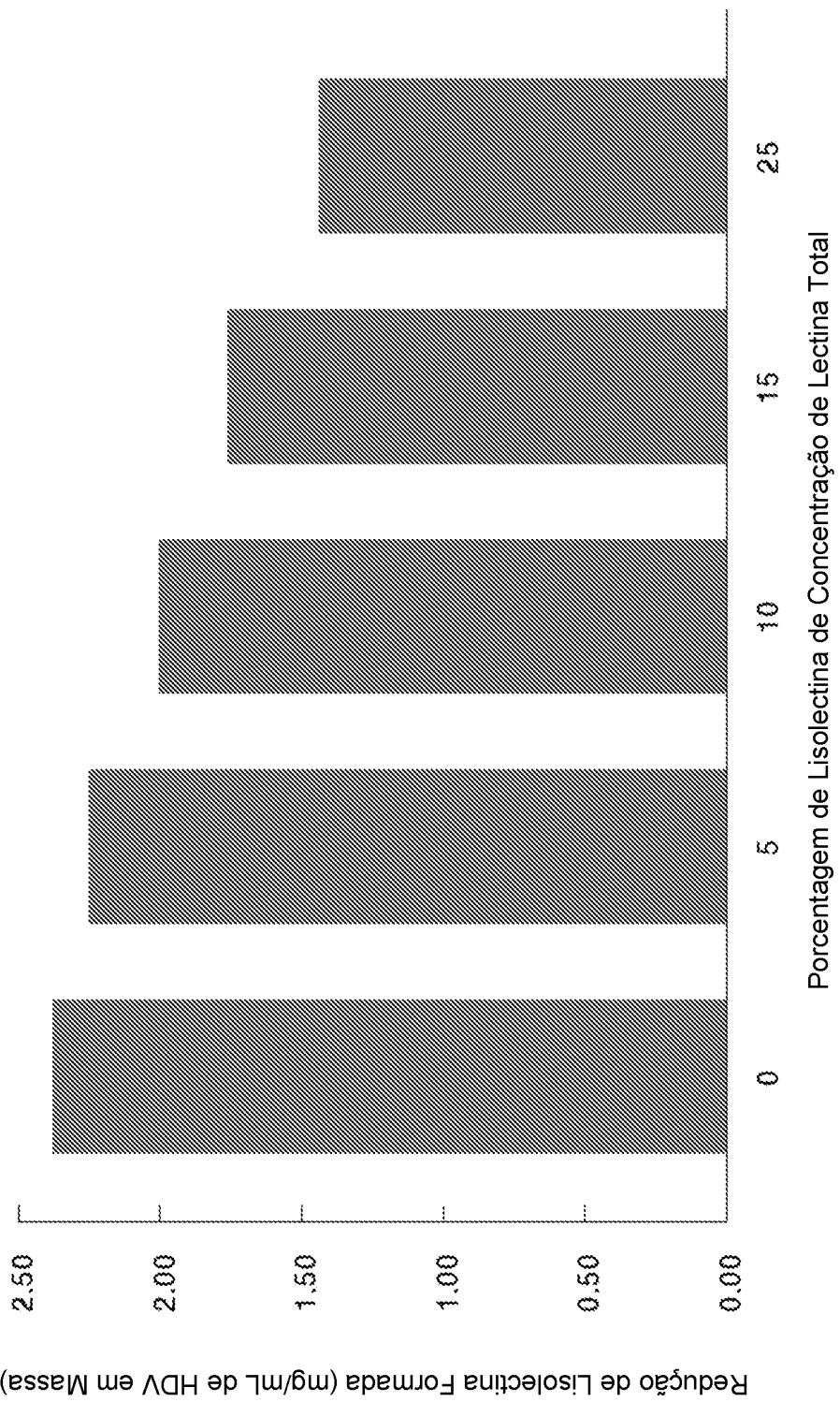
FIG. 3

FIG. 4

RESUMO

“NANOPARTÍCULAS À BASE DE LIPÍDEO COM ESTABILIDADE MELHORADA”

A invenção fornece uma nanopartícula à base de lipídeo aperfeiçoada, que pode ser utilizada para fornecer um agente terapêutico a um sujeito, como, mas não limitado a um mamífero, como, mas não limitado a um ser humano. Em certas modalidades, a nanopartícula da invenção possui propriedades de agregação reduzidas em comparação com as ensinadas na técnica anterior.