

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

(21) **PI0620586-0 A2**

(22) Data de Depósito: 01/12/2006
(43) Data da Publicação: 16/11/2011
(RPI 2132)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 38/26

(54) Título: FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA AQUOSA PARA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL E USO DE UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA AQUOSA PARA ELABORAR UM MEDICAMENTO

(30) Prioridade Unionista: 02/12/2005 US 11/293,676, 24/02/2006 US 60/776,464, 09/06/2006 US 60/804,406, 12/06/2006 US 60/804,543, 19/06/2006 US 60/805,191, 03/03/2006 US PCT/US06/8928, 24/02/2006 US 60/776,464, 09/06/2006 US 60/804,406, 19/06/2006 US 60/805,191, 03/03/2006 US PCT/US06/8928, 24/02/2006 US 60/776,464, 09/06/2006 US 60/804,406, 12/06/2006 US 60/804,543, 03/03/2006 US PCT/US06/8928, 03/03/2006 US PCT/US06/8928, 24/02/2006 US 60/776,464, 12/06/2006 US 60/804,543, 03/03/2006 US PCT/US06/8928, 09/06/2006 US 60/804,406, 19/06/2006 US 60/805,191

(73) Titular(es): Natestch Pharmaceutical Company Inc.

(72) Inventor(es): Alexis Kays Leonard, Henry R. Costantino, Joshua O. Sestak, Mary S. Kleppe, Michael V. Templin, Steven C. Quay

(74) Procurador(es): David do Nascimento Advogados Associados

(86) Pedido Internacional: PCT US2006061503 de 01/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/065156 de 07/06/2007

(57) Resumo: FORMULAÇÃO FARMACEUTICA AQUOSA PARA ADMINISTRAÇÃO INTPANASAL E USO DE UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA AQUOSA PARA ELABORAR UM MEDICAMENTO A presente invenção refere-se a uma formulação farmacêutica que contém uma mistura de uma quantidade farmacêuticamente activa de péptido que regula glucose (GRP) e intensificadores, onde formulação farmacêutica é empregue no tratamento de um síndrome metabólico.

FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA AQUOSA PARA ADMINISTRAÇÃO
INTRANASAL E USO DE UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA AQUOSA PARA
ELABORAR UM MEDICAMENTO

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

5 Os peptídeos reguladores de glucose ("GRP") são uma
classe de peptídeos que têm potencial terapêutico não
tratamento de diabetes mellitus insulino-dependente (DMID),
diabetes gestacional ou diabetes mellitus não insulino-
dependente (DMNID), não tratamento de obesidade, e não
10 tratamento de dislipidemia. Ver Patente E.U.A N° 6 506 725,
OU.S Patent Application Publication N° 20030036504A1; Patente
Europeia N° EP1083924B1; International Patent Application
Publication N° WO 98/30231A1; ~~e~~ International Patent
Application N° WO 00/73331A2. Estes GRPs incluem ou peptídeo
15 semelhante ao glucagom (GLP), por exemplo ou GLP-1; as
exendinas, especialmente a exendina-4, também conhecida como
exenatide; e peptídeos damilina e análogos damilina, ~~ta~~ como
pramlintide. Não entanto, até à data estes GRP apenas foram
administrados em humanos através de injeção.

20 Uma grande desvantagem de administração de
medicamentos através de injeção é que é muitas vezes
necessário pessoal formado para administrar a
droga. Adicionalmente, ou pessoal formado é colocado numa
posição de risco quando administra uma droga através de
25 injeção. Para medicamentos auto-administrados, muitos
pacientes estão relutantes ou incapazes de darem injeções a
se próprios num com base regular. A injeção está também
associada a riscos aumentados de infecção. Outras desvantagens
de injeção de medicamentos incluem variabilidade dos
30 resultados entregues entre indivíduos, assim como intensidade
e duração imprevisível de ação do medicamento.

A administração oral está disponível como
alternativa; não entanto, alguns agentes terapêuticos mostram

uma biodisponibilidade muito baixa e um atraso considerável parâctuarem quando administrados por esta via devido a um metabolismo hepático de primeira passagem e degradação não tracto gastrointestinal. Logo, há uma necessidade de
5 desenvolver modos de administração parnosGRP diferentes de injeção e/ou administração oral.

A administração através da mucosa de compostos terapêuticos oferece certas vantagens em relação à injeção e outros modos de administração, por exemplo conveniência e
10 eficácia de entrega, assim como a redução ou eliminação dois problemas de compatibilidade e efeitos secundários inerentes à entrega. Não entanto, a entregatravés da mucosa de agentes biologicamente ativos está limitada pelas funções de barreira mucosa e outros factores. As células epiteliais compõem a
15 barreira mucosa e fornecnum interface crucial entre ou meio externo e os tecidos da mucosa e submucosa e compartimentos extracelulares. Uma das funções mais importantes das células epiteliais da mucosa é determinar e regular a permeabilidade da mucosa. Neste contexto, as células epiteliais criam
20 barreiras de permeabilidade selectiva entre diferentes compartimentos fisiológicos. A permeabilidade selectiva é ou resultado de um transporte regulado de moléculas através do citoplasma (ou caminho transcelular) e a permeabilidade regulada dois espaços entre as células (ou caminho
25 paracelular).

Sabe-se que as junções intercelulares entre células epiteliais estão envolvidas tanto na manutenção como na regulação de função de barreira epitelial, e adesão célula-célula. As junções estreitas (TJ) das células epiteliais e
30 endoteliais são particularmente importantes paràs junções célula-célula que regulam a permeabilidade do caminho paracelular, e também dividem superfície celular em compartimentos apicais e basolaterais. As junções estreitas

formam contactos circunferenciais intercelulares contínuos entre as células epiteliais e criam uma barreira regulada para ou movimento paracelular de água, solutos, e células imunitárias. Fornecem também um segundo tipo de barreira que contribui para polaridade celular limitando a troca de lípidos membranares entre os domínios de membranapical e basolateral.

Não contexto de entrega de medicamento, a capacidade de dois fármacos permearem as camadas de células epiteliais das superfícies da mucosa, assistência de agentes aumento de entrega, parece estar relacionada com um número de factores, incluindo tamanho molecular, solubilidade lipídica, e ionização. Em geral, as moléculas pequenas, menores que cerca de 300-1000 daltons, são muitas vezes capazes de penetrar as barreiras da mucosa. Não entanto, à medida que o tamanho molecular aumenta, a permeabilidade decresce rapidamente. A entrega transdérmica do fármaco permite a permeação de moléculas maiores através das camadas celulares epiteliais de pele. A administração transdérmica, como um adesivo dérmico, é outra via de entrega alternativa para fármacos macromoleculares maiores. Não entanto, a entrega transdérmica poderá ainda apresentar mais limitações de tamanho do que a injeção. Por estas razões, a administração de fármacos por via da mucosa e epidérmica requer tipicamente maiores quantidades de fármaco do que a administração por injeção. Outros compostos terapêuticos, incluindo fármacos de moléculas maiores, são muitas vezes refractários à entrega através da mucosa. Adição à fraca permeabilidade intrínseca, os grandes fármacos macromoleculares são muitas vezes sujeitos a difusão limitada, assim como degradação enzimática no lúmen e celular e clearance rápido nos locais da mucosa. Logo, de forma a entregar estas moléculas maiores em quantidades terapeuticamente eficazes, são necessários

agentes potenciadores de permeação celular parâjudar à sua passagem através destas superfícies da mucosa e dérmicas e parâ circulação sistémica onde podagir rapidamente no tecido alvo.

5 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

FIGURA 1: Decréscimo na concentração de glucose sanguíneapós administração IN de GLP-1 comparada à Exenatide (SQ) e controlo Salino (IN) (corrigido para glucose endógena) em ratos.

10 Resposta insulínicaapós administração intranasal de GLP-1 em ratos.

FIGURA 3: Esvaziamento Gástrico após administração intranasal de GLP-1 em ratos.

FIGURA 4: Farmacocinética potenciada parâ Exendine-
15 4 administrada IN com potenciadores 2X, IN com potenciadores 2X + gelatina, e IN com potenciadores 1X + gelatina comparada com controlo IN e IV em coelhos

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Um aspecto da presente invenção inclui a utilidade
20 terapêutica de formulações farmacêuticas parâ entrega de GRP, análogos do GRP, fragmentos do GRP, e derivados funcionais do GRP na superfície epitelial para utilização não tratamento de doenças humanas incluindo a obesidade e a diabetes.

A presente invenção preenche necessidades prementes
25 e satisfaz objectivos e vantagens adicionais fornecendo novos e eficazes métodos, utilizações e composições para entrega trans-epitelial, especialmente trans-mucosal, de GRP tais como GLP e análogos do GLP, amilina e análogos damilina, e exendines e análogos do exendine, para tratar a diabetes
30 mellitus insulino-dependente (DMID), diabetes gestacional ou diabetes mellitus não insulino-dependente (DMNID), dislipidemia, hiperglicemia, obesidade, induzir a saciedade num indivíduo, e promover a perda de peso num indivíduo.

Nas materializações exemplificativas, os métodos e composições de entrega potenciados da presente invenção fornecem uma entrega terapeuticamente eficaz do agonista do GRP através de uma camada de células biológicas para prevenção ou tratamento de obesidade e desordens alimentares em mamíferos. Num aspecto da invenção, são fornecidas formulações farmacêuticas adequadas para administração epitelial que contém uma quantidade de um GRP terapeuticamente eficaz e um ou mais agentes potenciadores de entrega epitelial como descrito doravante, cujas formulações são eficazes num método de entrega epitelial da invenção para prevenir a instalação ou progressão de obesidade ou desordens alimentares num mamífero. A entrega trans-epitelial de uma quantidade terapeuticamente eficaz do agonista do GRP e um ou mais agentes potenciadores de entrega epitelial resulta em níveis terapêuticos elevados do agonista do GRP no indivíduo.

Os métodos e composições de entrega potenciada da presente invenção fornecem uma entrega terapeuticamente eficaz de um GRP para prevenção ou tratamento de uma variedade de doenças e condições em mamíferos. O GRP pode ser administrado através de uma variedade de vias epiteliais, por exemplo colocando o GRP em contacto com o epitélio da mucosa nasal, o epitélio da mucosa bronquial ou nasal, a superfície oral bucal e uma pequena superfície da mucosa intestinal ou uma superfície epidérmica. Nas materializações exemplificativas, os métodos e composições estão dirigidos para ou formulados para entrega intranasal (por exemplo entrega na mucosa nasal ou entrega na mucosa intranasal). Estas composições e métodos podem envolver formulação combinatória ou coordenar a administração de um ou mais GRPs com um ou mais agentes potenciadores de entrega epitelial. Entre os agentes de potenciamento de entrega epitelial a serem escolhidos para alcançar estas formulações e métodos

estão (A) agentes de solubilização; (B) agentes modificadores de carga; (C) agentes de controlo do pH; (D) inibidores de degradamento enzimático; (E) agentes de limpeza do muco ou mucolíticos; (F) agentes ciliostáticos; (G) agentes de

5 potenciamento de entrada na membrana (por exemplo, (i) um surfactante, (ii) um sal biliar, (iii) um aditivo fosfolipídio ou ácido gordo, micélio, lipossoma, ou transportador misturado, (iv) um álcool, (v) uma enamina; (vi) um composto doador de óxido nítrico, (vii) uma

10 moléculanfipática de cadeia longa, (viii) um pequeno potenciador de penetração hidrofóbico; (ix) um derivado do sódio ou ácido salicílico; (x) um ester de glicerol ou ácido acetoacético (xi) um derivado de ciclodextrina ou beta-ciclodextrina, (xii) um ácido gordo de cadeia média, (xiii)

15 um agente quelante, (xiv) um aminoácido ou um seu sal, (xv) um N-acetilaminoácido ou um seu sal, (xvi) um degradante enzimático para um composto da membrana seleccionado, (xvii) um inibidor de síntese dois ácidos gordos, (xviii) um inibidor de síntese do colesterol; ou (xix) qualquer

20 combinação dois agentes de potenciação de penetração membranar de (i)-(xviii); (H) agentes moduladores de fisiologia de junção epitelial, tais como estimulantes do óxido nítrico (NÃO), e derivados do óxido nítrico; (I) agentes vasodilatadores; (J) agentes selectivos de

25 potenciação do transporte; e (K) veículos de entrega estabilizantes, transportadores, apoios ou espécies formuladores de complexos com as quais ou(s) GRP(s) seja/m efetivamente combinado(s), associado(s), contido(s), encapsulado(s) ou ligado(s) para estabilizar ou agente ativo

30 para entrega epitelial potenciada.

Em várias materializações da invenção, um GRP é combinado com um, dois, três, quatro ou mais agentes potenciadores de entrega epitelial descritos em (A)-(K), em cima. Estes

agentes potenciadores de entrega epitelial podem ser misturados, sozinhos ou em conjunto, ao GRP, ou de outra forma combinados numa formulação farmacologicamente aceitável ou veículo de entrega. A formulação de um GRP com um ou mais
 5 agentes potenciadores de entrega epitelial de acordo com os ensinamentos seguintes (incluindo opcionalmente qualquer combinação de dois ou mais agentes potenciadores de entrega epitelial selecionados de entre (A)-(K) em cima) proporciona uma biodisponibilidade aumentada do peptídeo de
 10 ligação regulador de glucose após a entrega do mesmo numa superfície epitelial de um mamífero. Adicionalmente à adição de agentes potenciadores de entrega epitelial à formulação, a modificação do GRP, como através da adição de um grupo hidrofóbico pode ser utilizada para tornar eficaz a
 15 biodisponibilidade do peptídeo.

Logo, a presente invenção é um método de supressão do apetite, promovendo a perda de peso, diminuindo a ingestão de alimento, ou tratando a obesidade e/ou a diabetes num mamífero consistindo na administração trans-epitelial de um
 20 formulação contendo um GRP.

A presente invenção proporciona também disso a utilização de um GRP para produção de medicamentos para administração trans-epitelial de um GRP para tratamento de hiperglicemia, diabetes mellitus, síndrome metabólica,
 25 dislipidemia, supressão do apetite, promoção de perda de peso, diminuição de ingestão de alimentos, ou tratamento de obesidade num mamífero.

Uma dose de GRP eficaz na mucosa dentro do âmbito das formulações farmacêuticas da presente invenção contém, por exemplo, entre cerca de 0,001 pmol a cerca de 100 pmol
 30 por kg de peso corporal, entre cerca de 0,01 pmol a cerca de 10 pmol por kg de peso corporal, ou entre cerca de 0,1 pmol a cerca de 5 pmol por kg de peso corporal. Em posteriores

materializações exemplificativas a dosagem de GRP é entre cerca de 0,5 pmol a cerca de 1 pmol por kg de peso corporal. Numa materialização preferencial uma dose intranasal irá variar entre 0,1 - 100 µg/kg, ou cerca de 7 - 7000 µg, mais
5 preferencialmente 0,5 - 30 µg/kg ou 35 a 2100 µg. Doses mais específicas do GRP intranasal incluem 20 µg, 50 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg a 400 µg, 500 µg, 800 a 1000 µg e 1200 a 1800 µg. As formulações farmacêuticas da presente invenção podem ser administradas uma ou mais vezes por dia, ou 3 vezes por
10 semana ou uma vez por semana entre uma semana e pelo menos 96 semanas ou mesmo durante toda a vida do paciente ou indivíduo. Nalgumas materializações, as formulações farmacêuticas da invenção são administradas uma ou mais vezes por dia, duas vezes ao dia, quatro vezes ao dia, seis vezes ao dia, ou oito
15 vezes ao dia.

Os agentes potenciadores de entrega epitelial são empregues para potenciar a entrega do GRP na ou através de camada celular, incluindo a superfície da mucosa nasal. Para fármacos absorvidos passivamente, a contribuição relativa
20 dois caminhos paracelulares e transcelulares para o transporte do fármaco depende do pKa, coeficiente de partição, raio molecular e carga do fármaco, ou pH do ambiente luminal não qual o fármaco é entregue, e a área da superfície absorvente. OU agente potenciador de entrega
25 epitelial da presente invenção poderá ser um agente de controlo do pH. OU pH de formulação farmacêutica da presente invenção é um factor que afecta a absorção do GRP através dos dois caminhos paracelulares e transcelulares para o transporte do fármaco. Numa materialização, a formulação farmacêutica da
30 presente invenção tem o pH ajustado entre 2 e 8. Numa posterior materialização, a formulação farmacêutica da presente invenção tem o pH ajustado entre cerca de 3 a 6. Numa posterior materialização, a formulação farmacêutica da

presente invenção tem ou pH ajustado entre cerca de 3,5 a 5,5. Geralmente, ou Ph é $4,5 \pm 0,5$.

Como mencionado em cima, a presente invenção proporciona métodos melhorados e composições para entrega
5 epitelial de GRP a mamíferos para tratamento ou prevenção de uma variedade de doenças e condições. Exemplos de mamíferos para tratamento e profilaxia de acordo com os métodos da invenção incluem, mas não estão limitados a, primatas humanos e não humanos, espécies de gado vivo, tais como cavalos,
10 gado, ovelhas e cabras, e espécies de investigação e domésticas, incluindo cães, gatos, ratos, ratazanas, porcos de Guiné e coelhos.

De forma proporcionar um melhor entendimento da presente invenção, são fornecidas as seguintes definições:

15 Peptídeos similares ao Glucagom (GLP)

Incluídos na invenção estão análogos, fragmentos, miméticos, e derivados funcionais de proteínas e peptídeos do GLP. As incretinas são hormonas derivadas de saliva que estimulam a secreção de insulina em resposta ingestão de
20 nutrientes (num processo dependente de glucose). Duas incretinas que ocorrem naturalmente incluem ou peptídeo insulínico dependente de glucose (GIP) e ou peptídeo-1 semelhante ao glucagom (GLP-1). OU GLP-1 é libertado a partir das células presentes na saliva em resposta alimento. OU
25 GLP-1 liga-se aos receptores GLP-1 nas células beta do pâncreas, estimulando a libertação de insulina. OU GLP-1[7-36]NH₂, também conhecido como proglucagom[78-107] e mais comumente como "GLP-1", num efeito insulínico, estimulando a secreção de insulina; ou GLP-1 também inibe a
30 secreção do glucagom [Orskov, et para ou., *Diabetes* 42:658-61, 1993; D'Alessio, et para ou., *J. Clin. Invest.* 97:133-38, 1996]. Está reportado que ou GLP-1 inibe ou esvaziamento gástrico [Williams B., et para ou., *J. Clin. Endocrinol Meta.*

81:(1):327-32, 1996; Wettergren A., et para ou., *Dig. Dis. Sci.* 38:(4):665-73, 1993], e a secreção de ácido gástrico. [Schjoldager B.T., et para ou., *Dig. Dis. Sci.* 34(5):703-8, 1989; OU'Halloran D.J., et para ou., *J. Endocrinol.* 5 126(1):169-73, 1990; Wettergren A., et para ou., *Dig. Dis. Sci.* 38:(4):665-73, 1993]. OU GLP-1[7-37], que num resíduo adicional de glicina na sua extremidade carboxi, também estimula secreção de insulina em humanos [Orskov, et para ou., *Diabetes* 42:658-61, 1993]. Um receptor transmembranar 10 adenilato-ciclasa de proteína G que se acreditava ser responsável pelo efeito insulínico do GLP-1 foi reportado com tendo sido clonado de uma linha de células beta [Thorens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8641-45, 1992].

Uma grande limitação do GLP-1 para terapêutica é a 15 sua rápida degradação pela ubíqua enzima dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV). Os inibidores de DPP-IV (LAF237; MK-0431) têm sido usados para melhorar a duração da atividade endógena do GLP-1. A O.U.S. Food and Drug Administration (FDA) aprovou o JANUVIA™ (fosfato de sitagliptina), Merck & Co., 20 Inc., um inibidor oral de DPP-IV disponível nos Estados Unidos para o tratamento de diabetes tipo 2. Um método para o tratamento de doenças metabólicas em mamíferos consistindo na co-administração de um composto capaz de se ligar a um local de ligação secundário de DPP-IV e enzimas semelhantes a 25 DPP-IV e pelo menos um agente anti-diabético foi descrito na Patente E.O.U.A N° 20060234940.

Os miméticos de incretina são uma classe de fármacos que imitam as ações antidiabéticas ou redutoras de glucose das hormonas de incretina humanas geradas 30 naturalmente como o GLP-1. As ações dos miméticos de incretina incluem estimular a capacidade do corpo para produzir insulina em resposta a níveis elevados de glucose no sangue, inibir a libertação de hormona glucagon, abrandar a

absorção dois nutrientes para corrente sanguínea, abrandar a taxa de esvaziamento gástrico, promover a saciedade e reduzir ou aporte de alimentos. Os miméticos de incretina foram desenvolvidos para utilização não tratamento de diabetes tipo 2 e incluem os seguintes: derivados do GLP-1 (Liraglutide e CJC-1131) e ou Exenatide. CJC-1131 (ConjuChem, Montreal, Canadá) é um ligador reagente que permite a ligação covalente à albumina do soro resultando num aumento de resistência à degradação de DPP-IV. OU Liraglutide (Novo Nordisk, Copenhaga, Dinamarca) é um derivado do GLP-1 concebido para ultrapassar os efeitos de degradação de DPP-IV através da conjugação com uma cadeia de ácidos gordos. A estrutura do Liraglutide é mostrada na WHO Drug Information, Vol. 17, Nº 2 (2003).

A invenção inclui modificações dos GRPs por anexação de um grupo hidrofóbico, como ácidos gordos, ao peptídeo. Mais exemplos de derivados modificados do GLP-1 com propriedades farmacocinéticas desejáveis são descritos em Knudsen et al., *J. Med. Chem.* 43:1664-1669, 2000, e são doravante incorporados como referência. Estes compostos GLP-1 foram derivados com ácidos gordos de forma a estender a sua acção facilitando a ligação à albumina do soro. Os seguintes peptídeos parentais e substituições acil foram descritos: K⁸R^{26,34}-GLP-1(7-37) (K⁸: γ-Glu-C16); K¹⁸R^{26,34}-GLP-1(7-37) (K¹⁸: γ-Glu-C16); K²³R^{26,34}-GLP-1(7-37) (K²³: γ-Glu-C16); R³⁴-GLP-1(7-37) (K²⁶: γ-Glu-C16); K²⁷R^{26,34}-GLP-1(7-37) (K²⁷: γ-Glu-C16); R²⁶-GLP-1(7-37) (K³⁴: γ-Glu-C16); K³⁶R^{26,34}-GLP-1(7-37) (K³⁶: γ-Glu-C16); R^{26,34}-GLP-1(7-38) (K³⁸: γ-Glu-C16); GLP-1(7-37) (K^{26,34}: bis-C16-diácido); GLP-1(7-37) (K^{26,34}: bis-γ-Glu-C16); GLP-1(7-37) (K^{26,34}: bis-γ-Glu-C14); GLP-1(7-37) (K^{26,34}: bis-C12-diácido); R³⁴-GLP-1(7-37) (K²⁶: C16-diácido); R³⁴-GLP-1(7-37) (K²⁶: C14-diácido); R³⁴-GLP-1(7-37) (K²⁶: γ-Glu-C18); R³⁴-GLP-1(7-37) (K²⁶: γ-Glu-C14); R³⁴-GLP-1(7-37) (K²⁶: γ-

Glu-C12); desamino-H⁷R³⁴-GLP-1(7-37) (K²⁶: γ -Glu-C16); R³⁴-GLP-1(7-37) (K²⁶: GABA-C16); R³⁴-GLP-1(7-37) (K²⁶: β -Ala-C16); R³⁴-GLP-1(7-37) (K²⁶: Iso-Nip-C16); desamino-H⁷R²⁶-GLP-1(7-37) (K³⁴: γ -Glu-C16); desamino-H⁷R²⁶-GLP-1(7-37) (K³⁴: C8);
 5 desamino-H⁷R²⁶-GLP-1(7-37) (K³⁴: γ -Glu-C8); K^{36,34}-GLP-1(7-36) (K³⁶: C20-diacid); K^{36,34}-GLP-1(7-36) (K³⁶: C16-diácido); K^{36,34}-GLP-1(7-36) (K³⁶: γ -Glu-C18); R^{26,34}-GLP-1(7-38) (K³⁸: C16-diácido); R^{26,34}-GLP-1(7-38) (K³⁸: C12-diácido); R^{26,34}-GLP-1(7-38) (K³⁸: γ -Glu-C18); R^{26,34}-GLP-1(7-38) (K³⁸: e-Glu-C14);
 10 C⁸R^{26,34}-GLP-1(7-38) (K³⁸: γ -Glu-C16); E³⁷R^{26,34}-GLP-1(7-38) (K³⁸: γ -Glu-C16); E³⁷C⁸R^{26,34}-GLP-1(7-38) (K³⁸: γ -Glu-C16); e E³⁷C⁸R^{26,34}-GLP-1(7-38) (K³⁸: γ -Glu-C18).

A sequênciâminoácido do GLP-1 é dada i.a. por Schmidt, et para ou., *Diabetologia* 28:704-707, 1985. OU GLP-1 humano é um resíduo peptídeo do aminoácido 37 originado a partir do pré-proglucagon ou qual é sintetizado, i.a. nas células L não íleo distal, não pâncreas e não cérebro. OU processamento de pré-proglucagom em GLP-1(7-36)amido, GLP-1(7-37) e GLP-2 ocorre principalmente nas células L. Emboràs
 20 interessantes propriedades farmacológicas do GLP-1(7-37) e análogos do mesmo tenham atraído muitâtenção nos anos mais recentes, apenas pouco é conhecido sobre a estrutura destas moléculas. A estrutura secundária do GLP-1 nas micelas foi descrita por Thorton, et para ou., *Biochemistry* 33:3532-3539,
 25 1994), mas em solução normal, ou GLP-1 é considerado uma molécula muito flexível.

OU GLP-1 e análogos do GLP-1 e fragmentos do mesmo são úteis i.a. não tratamento de diabetes Tipo 1 e Tipo 2 e de obesidadee. Os análogos do GLP-1, fragmentos do GLP-1 e derivados funcionais do GLP-1 como descrito em Holst, J., *Expert Opin. Emerg. Drugs* 9(1):155-161, 2004; Rolin, R., et para ou., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283:E745-E752, 2002; Deacon, C., *Diabetes* 53:2181-2187, 2004;

Perry, T., et para ou., *Trends Pharmacol. Sci.* 24(7):377-383, 2003; Holz, G., et para ou., *Curr. Med. Chem.* 10(22):2471-2481, 2003; Naslund, E., et para ou., *Regul. Pept.* 106:89-95, 2002; nas aplicações para patente WO 87/06941; WO 90/11296; 5 WO 91/11457; nas patentes EP 0708179-A2 e EP 0699686-A2 são incorporados doravante como referência na sua totalidade:

A WO 87/06941 descreve os fragmentos do GLP-1, incluindo ou GLP-1(7-37), e derivados funcionais do mesmo e ou seu uso como agente insulino-trópico.

10 A WO 90/11296 descreve os fragmentos do GLP-1, incluindo ou GLP-1(7-36), e derivados funcionais do mesmo que têm uma atividade insulino-trópica qual excede a atividade insulino-trópica do GLP-1(1-36) ou GLP-1(1-37) e ou seu uso como agentes insulino-trópicos.

15 A WO 91/11457 descreve os análogos dois peptídeos ativos do GLP-1 7-34, 7-35, 7-36, e 7-37 os quais podem também ser úteis como partes do GLP-1.

A EP 0708179-A2 (Eli Lilly & Co.) descreve os análogos do GLP-1 e derivados que incluem um grupo imidazol 20 terminal N e opcionalmente um grupo acil C₆ -C₁₀ não ramificado anexado ao resíduo lisina na posição 37.

A EP 0699686-A2 (Eli Lilly & Co.) descreve alguns fragmentos de terminal N truncados do GLP-1 que estão reportados como sendo biologicamente ativos.

25 A sequência aminoácido do GLP-1 (1-37) é: HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID N°: 1).

A sequência aminoácido do GLP-1(7-37) é: HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID N°: 2).

A sequência aminoácido do GLP-1 (7-36) é: 30 HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR (SEQ ID N°: 3).

A sequência aminoácido do GLP-1 (7-34) é: HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVK (SEQ ID N°: 4).

A sequência aminoácido do GLP-1 (9-36) é:

EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR (SEQ ID N°: 5).

Os análogos do GLP-1 listados em baixo tem resistênciãumentada à DPP-IV.

A sequênciãminoácido do análogo do GLP-1, GG é:
5 HEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR (SEQ ID N°: 6).

A sequênciãminoácido do análogo do GLP-1, GG₁ é:
HEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRPSS (SEQ ID N°: 7).

A sequênciãminoácido do análogo do GLP-1, GG₂ é:
HEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRPSSGAP (SEQ ID N°: 8).

10 A sequênciãminoácido do análogo do GLP-1, GG₃ é:
HEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRPSSGAPPPS (SEQ ID N°: 9).

A sequênciãminoácido do análogo do GLP-1, GLP-1 ET
é: HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGGPSSGAPPPS (SEQ ID N°: 10).

A sequênciãminoácido do análogo sintético do GLP-1,
15 NN2211 é: HAEGTFTSDVSSYLEGQAAK*EFIAWLVRGRG (SEQ ID N°: 11)
onde K* na posição 26 de cadeia do aminoácido é modificado
por acilação para gerar uma cadeia lateral hexadecanol (i.e.,
K-N-ε-(γ-Glu (N-α-hexadecanol)).

A sequênciãminoácido do análogo sintético do GLP-1,
20 CJC-1131 é: HA*EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRK* (SEQ ID N°: 12)
onda* na posição 8 de cadeia do aminoácido é uma D-alanina
substituída por uma L-alanina e ou K* na posição 37 de cadeia
do aminoácido tnum ligador [2-[2-[2-
maleimidopropionamido(etoxi)etoxi]acetamida não seu grupo
25 amino ε.

A sequênciãminoácido do análogo sintético do GLP-1,
LY315902 é:

des- HAEGTFTSDVSSYLEGQAAREFIAWLVK*GRG (SEQ ID N°:
13) onde ou resíduo de histidina não terminal N (des-H) não
30 contém um grupo amino e ou K* na posição 34 é modificado por
acilação para gerar uma cadeia lateral octanol (i.e., K-
(octoanoyl)).

Dacordo com a presente invenção ou GLP-1 também inclui bases livres, sais dadição ácida ou sais metálicos, tais como sais sódicos ou potássicos dois peptídeos, e peptídeos GLP-1 que foram modificados por processos como
5 àmidação, glicosilação, acilação, sulfação, fosforilação, acetilação, ciclização e outros métodos de modificação covalente bem conhecidos.

Exendinas e Agonistas de Exendina

Incluídos dentro da invenção estão análogos,
10 fragmentos e derivados funcionais de peptídeos e proteínas exendina. As exendinas são peptídeos que foram primeiro isolados a partir de secreções salivares do monstro de Gila, um lagarto encontrado não Arizona, e do Lagarto-de-Contas-Mexicano. A Exendina-3 está presente nas secreções salivares
15 do *Heloderma horridum*, e exendina-4 está presente nas secreções salivares do *Heloderma seuspectum* [Eng, J., et para ou., *J. Biol. Chem.* 265:20259-62, 1990; Eng., J., et para ou., *J. Biol. Chem.* 267:7402-05, 1992]. As exendinas têm alguma semelhança nas sequências com vários membros de
20 família do peptídeo semelhante ao glucagom, com a maior homologia, 53%, na hormona incretina GLP-1[7-36]NH₂ [Goke, et para ou., *J. Biol. Chem.* 268:19650-55, 1993].

OU nome genérico parà exendina-4 sintética é exenatida [WHO Drug Information, Vol. 18, N°. 1, 2004].
25 Exenatida é uma Exendina-4 sintética. A exenatida reproduz os efeitos do GLP-1, mas é mais potente devido à sua resistência à degradação de DPP-IV. BYETTA® é a versão comercialmente disponível de exenatida (Amylin & Lilly). A FDA nos E.OU.Àprovou a injeção de BYETTA (Exenatida) como
30 terapiãadjuntiva à diabetes tipo 2 sempre que ou tratamento com metformina oral e/ou sulfonilureias não sejãdequado para alcançar ou controlo glicémico. Adicionalmente ao controlo glicémico melhorado, os indivíduos dois estudos a usarem

exenatida experimentaram também perda de peso.

A presente invenção está dirigida a novos métodos para tratamento de diabetes e condições que seriam beneficiadas pela redução de glucose plasmática ou atraso e/ou abrandamento do esvaziamento gástrico ou inibição de ingestão de alimento consistindo na administração intranasal de uma exendina, um análogo de exendina, um agonista de exendina, uma exendina modificada, um análogo modificado de exendina ou um agonista modificado de exendina, ou quaisquer combinações dos mesmos, com por exemplo:

Exendina-3:

His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu
Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly
Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser (SEQ ID N°: 14),

ou, exendina-4 (exendina-4 sintética (exenatida)):

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln
Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn
Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser onde a serina do
Terminal C é amidada (SEQ ID N°: 15),

ou fragmentos insulínotropicos de exendina-4:

Exendina-4(1-31) His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser
Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile
Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro (SEQ ID N°: 16); e, sup. 31
Exendina-4(1-31) His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser
Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu
Lys Asn Gly Gly Tyr (SEQ ID N°: 17),

ou fragmentos inibidores de exendina-4:

Exendina-4(9-39) Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala
Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser
Gly Ala Pro Pro Pro Ser (SEQ ID N°: 18),

ou outros agonistas de exendina preferidos:

exendina-4 (1-30) His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp
Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu

Trp Leu Lys Asn Gly Gly (SEQ ID N°: 19), exendina-4 (1-30)
 amida His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met
 Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly
 Gly-NH.sub.2 (SEQ ID N°: 20), exendina-4 (1-28) amide His Gly
 5 Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu
 Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn-NH.sub.2 (SEQ ID
 N°: 21), .sup.14 Leu, .sup.25 Phe exendina-4 amida His Gly Glu
 Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala
 Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser
 10 Gly Ala Pro Pro Pro Ser-NH.sub.2 (SEQ ID N°: 22), .sup.14
 Leu, .sup.25 Phe exendina-4 (1-28) amida His Gly Glu Gly Thr
 Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg
 Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH.sub.2 (SEQ ID N°: 23), e
 .sup.14 Leu, .sup.22 Ala, .sup.25 Phe exendina-4 (1-28) amida
 15 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu
 Glu Glu Ala Val Arg Leu Ala Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH.sub.2
 (SEQ ID N°: 24).

ou sequências incorporadas por referência que tenham
 sido descritas nas Patentes E.OU.A n° 5 424 286; Patente
 20 E.OU.A N° 6 506 724; Patente E.OU.A N° 6 528 486; Patente
 E.OU.A N° 6 593 295; Patente E.OU.A N° 6 872 700; Patente
 E.OU.A N° 6 902 744; Patente E.OU.A N° 6 924 264; e Patente
 E.OU.A N° 6 956 026,
 ou outros compostos que se liguem efetivamente ao receptor
 25 não qual a exendina exerce as suas ações que são benéficas
 não tratamento de diabetes e condições que seriam
 beneficiadas pela redução de glucose plasmática ou atraso
 e/ou abrandamento do esvaziamento gástrico ou inibição de
 ingestão de alimentos. A utilização de exendina-3 e exendina-4
 30 como agentes insulínotropicos para o tratamento de diabetes
 mellitus e prevenção de hiperglicemia foi descrita na Patente
 E.OU.A N° 5 424 286. As exendinas mostraram também ser úteis
 na modulação dos níveis de triglicéridos e não tratamento de

dislipidemia.

Logo a invenção fornece peptídeos ou fragmentos de peptídeos, fabricados sinteticamente ou purificados a partir de fontes naturais, os quais incorporam àctividadee biológica
5 das exendinas ou fragmentos das mesmas, como descrito pela presente especificação.

Dacordo com a presente invenção as exendinas também inclunas bases livres, sais dadição ácida ou sais metálicos, tais como sais sódicos ou potássicos dois peptídeos, e
10 peptídeos de enxedina que foram modificados por processos tais como amidação, glicosilação, acilação, sulfação, fosforilação, acetilação, ciclização e outros métodos de modificação covalente bem conhecidos.

Logo, dacordo com a presente invenção, os peptídeos
15 acima mencionados são incorporados em formulações adequadas para entrega transepitelial, especialmente entrega intranasal e dérmica.

Membranas Biológicas

"Membrana biológica" define-se como ou material
20 membranar presente dentro de um organismo vivo, preferencialmente um animal, mais preferencialmente um humano, que separa uma área do organismo de outra. Em muitas instâncias, a membrana biológica separa ou organismo dois suas limites exteriores ou ambiente. Exemplos não limitativos
25 incluem membranas da mucosa e de pele não ser humano.

Agentes Potenciadores de Entrega Epitelial

"Agentes potenciadores de entrega epitelial" são definidos como químicos ou outros excipientes que, quando adicionados a uma formulação contendo água, sais e/ou
30 ``buffers`` comuns e GRP (a formulação de controlo) produznuma formulação que produz um aumento significativo não transporte do GRP através de uma membrana biológica como medido pela concentração máxima do sangue, soro, ou fluido

espinal cerebral ($C_{\max}$) ou pela área sob a curva, AUC, num gráfico de concentração versus tempo. As membranas biológicas epiteliais poderão incluir as superfícies nasal, oral, intestinal, bucal, broncopulmonar, vaginal, rectal, e dérmica. Os agentes potenciadores de entrega trans-epitelial são algumas vezes denominados transportadores.

Agentes Potenciadores de Entrega Mucosal

"Agentes potenciadores de entrega mucosal" são definidos como químicos ou outros excipientes que, quando adicionados a uma formulação contendo água, sais e/ou "buffers" comuns e GRP (a formulação de controlo) produzem uma formulação que produz um aumento significativo no transporte do GRP através de uma mucosa como medido pela concentração máxima do sangue, soro, ou fluido espinal cerebral ($C_{\max}$) ou pela área sob a curva, AUC, num gráfico de concentração versus tempo. As membranas biológicas epiteliais poderão incluir as superfícies mucosas nasal, oral, intestinal, bucal, broncopulmonar, vaginal, rectal e de facto inclui todas as membranas secretoras de muco que revestem todas as cavidades corporais ou passagens que comunicam com o exterior. Os agentes potenciadores de entrega mucosal são por vezes denominados transportadores.

Formulação livre de endotoxina

"Formulação livre de endotoxina" significa uma formulação que contém um GRP e um ou mais agentes potenciadores de entrega epitelial que é substancialmente livre de endotoxinas e/ou substâncias pirogênicas relacionadas. As endotoxinas incluem toxinas que estão confinadas dentro de um microorganismo e são libertadas apenas quando os micro-organismos são partidos ou morrem. As substâncias pirogênicas incluem substâncias indutoras de febre, termoestáveis (glicoproteínas) da membrana exterior de bactéria e outros organismos. Ambas as substâncias podem

causar febre, hipotensão e choque se administradas em humanos. Podrizar formulações livres de endotoxinas pode requerer equipamento especial, peritos, e pode ser significativamente mais dispendioso do que fazer formulações
 5 que não estejam livres de endotoxinas. Devido a administração intravenosa de GLP ou amilina simultaneamente com infusão de endotoxina em roedores ter mostrado prevenir a hipotensão e mesmo morte associada com a administração de endotoxina sozinha (Patente E.OU.A N° 4 839 343), não seria
 10 necessário esperar a produção de formulações sem endotoxinas destes agentes para administração não parental (não injectada).

Administração Não infundida

"Administração não infundida", significa qualquer
 15 método de administração que não envolva uma injeção directamente numãrtéria ou veia, um método que força ou acciona (tipicamente um fluido), em algo e especialmente para introduzir numa parte do corpo por meio de umãgulla, seringa ou outros métodos invasivos. A administração não infundida
 20 inclui injeção subcutânea, injeção intramuscular, injeção intraperitoneal e os métodos sem injeção de administração numa membrana biológica. Métodos e Composições de administração

Os métodos e composições melhoradas para
 25 administração epitelial de GRP a sujeitos mamíferos, optimiza programas de dosificação de GRP. A presente invenção proporciona administração epitelial de GRP formulado com um ou mais agentes que intensificam a administração epitelial, onde libertação de dose de GRP é substancialmente normalizada
 30 e/ou controlada por um período de administração efetivo de intervalos de libertação de GRP desde aproximadamente 0.1 até 2.0 horas; 0.4 até 1.5 horas; 0.7 até 1.5 horas; ou 0.8 até 1.0 horas; depois de administração epitelial. A libertação

controlada de GRP tentada, pode ser facilitada por administração repetida de GRP exógeno utilizando métodos e composições da presente invenção.

Composições e Métodos de Libertação Prolongada

5 As composições e métodos melhorados para administração epitelial de GRP a sujeitos mamíferos, optimiznos programas de dosificação de GRP. A presente invenção proporcionã administração epitelial melhorada (por exemplo, nasal) de uma formulação que contém GRP em
10 combinação com um ou mais agentes que intensificam a administração epitelial e um agente ou agentes que intensificam a libertação prolongada. Agentes que intensificam a administração epitelial da presente invenção, proporcionam um aumento efetivo nã administração, por exemplo,
15 um aumento na concentração máxima de plasma ($C_{\max}$) para melhorar à actividade terapêutica de GRP epitelialmente administrada. Um segundo factor que afectã actividade terapêutica de GRP no plasma do sangue e a SNC é a tempo de residência (RT). Os agentes que intensificam a libertação
20 prolongada, em combinação com agentes que intensificam a administração intranasal, incrementam a $C_{\max}$ e incrementam ou tempo de residência (RT) de GRP. Os veículos de administração polimérica e outros agentes e métodos da presente invenção que proporcionam formulações que intensificam a libertação
25 prolongada, por exemplo, descreve-se aqui polietileno glicol (PEG). A presente invenção proporciona um método de administração melhorado de GRP e forma de dosificação para ou tratamento de sintomas relacionados com obesidade, diabetes, hiperglicemia, síndrome metabólico, síndrome coronário,
30 cancro do cólon, cancro de exendina, cancro de mama, enfarte do miocárdio, promoção de neurogénese, supressão do apetite, promoção de perda de peso, e redução de absorção dalimentos em sujeitos mamíferos.

Dentro das formulações de administração epitelial e métodos da invenção, a GRP é frequentemente combinado ou coordenadamente administrado com um portador ou veículo adequado para administração epitelial. Como se usàqui, a

5 termo "portador", significa material de enchimento, diluente ou encapsulante sólido ou líquido farmaceuticamente aceitável. Um portador líquido que contém água pode conter aditivos farmaceuticamente aceitáveis tais como agentes acidificantes, agentes alcalinizantes, conservantes

10 antimicrobianos, antioxidantes, agentes amortecedores, agentes quelantes, agentes formadores de complexo, agentes solubilizantes, humidificadores, solventes, agentes que incrementam a viscosidade e/ou suspensão, agentes de tonicidade, agentes humidificadores ou outros materiais

15 biocompatíveis. Uma tabela de ingredientes listados pelas categorias anteriores se pode encontrar em *OU.S. Pharmacopeia National Formulary*, 1857-1859, 1990. Alguns exemplos dos materiais os quais podem servir como portadores farmaceuticamente aceitáveis são açúcares, tais como lactose,

20 glucose e sacarose; amidos tais como amido de milho e amido de papa; celulose e seus derivados tais como carboximetilcelulose de sódio, etilcelulose e acetato de celulose; gomâdragante em pó; malta; gelatina; talco; excipientes tais como manteiga de cacau e supositórios de

25 cera; óleos tais como óleo de maní, óleo de semilla dalgodão, óleo de cártamo, óleo de sésamo, óleo dazeitona, 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 etilo e laurato de etilo;

30 agar; agentes amortecedores tais como hidróxido de magnésio e hidróxido dalumínio; ácido algínico; água livre de pirógeno; salina isotónica; solução de Ringer, álcool etílico e soluções amortecedoras de fosfato, assim como também outras

substâncias compatíveis não tóxicas usadas em formulações farmacêuticas. Agentes humidificadores, emulsificadores e lubrificantes tais como lauril sulfato de sódio e estearato de magnésio, assim como também agentes colorantes, agentes de libertação, agentes de revestimento, adoçantes, agentes 5 saborizantes e perfumantes, conservantes e antioxidantes, podem também estar presentes nas composições, em conformidade com os desejos do formulador. Exemplos dantioxidantes farmaceuticamente aceitáveis incluem, antioxidantes solúveis 10 em água tais como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfito de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e similares; antioxidantes solúveis em água tais como ascorbil palmitato, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propil galato, alfa-tocoferol e similares; e agentes quelantes metálicos tais 15 como ácido cítrico, ácido etilendiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico e similares. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com os materiais portadores para produzir uma forma de dosificação, 20 variará dependendo do modo particular de administração.

Dentro das composições de administração epitelial e métodos da invenção, vários agentes que intensificam a administração são empregues, os quais melhoram a administração de GRP em ou através de uma capa celular. Neste 25 sentido, a administração de GRP através do epitélio, pode ocorrer "intracelularmente" ou "paracelularmente". A magnitudee na qual estas trajectórias contribuem para ou fluxo total e biodisponibilidade do GRP, depende do ambiente da membrana biológica, das propriedades psico-químicas do 30 agente ativo, e das propriedades do epitélio. OU transporte paracelular englobâpenas difusão passiva, enquanto ou transporte transcelular pode ocorrer por processos passivos, facilitados ou ativos. Em geral, os solutos polares,

passivamente transportados, hidrofílicos, se difundem através de rota paracelular, enquanto mais solutos lipofílicos usam a rota transcelular. A absorção e biodisponibilidade (por exemplo, como se reflecte por um coeficiente de permeabilidade ou ensaio fisiológico), para solutos diversos, passivamente e activamente absorvidos, podem ser facilmente avaliada em termos de componentes de administração tanto paracelular como transcelular, por qualquer GRP seleccionado dentro da invenção. Para fármacos passivamente absorvidos, a contribuição relativa de trajectórias paracelulares e intracelulares para o transporte do fármaco, depende do coeficiente de partição, pKa, raio molecular e carga do fármaco, o pH do ambiente luminal na qual o fármaco é administrado, e a área da superfície de absorção. A rota paracelular representa uma fração relativamente pequena de área da superfície acessível do epitélio mucosal nasal. Em termos gerais, reportou-se que as membranas celulares ocupam uma área da superfície mucosa que é mil vezes maior que a área ocupada pelos espaços paracelulares. Deste modo, a área acessível é mais pequena, e o tamanho e discriminação com base de carga contra permeação macromolecular poderia sugerir que a rota paracelular poderia ser uma rota em geral menos favorável que a administração transcelular para o transporte de fármaco. De maneira surpreendente, os métodos e composições da invenção proporcionam transporte significativamente melhorado de bioterapêuticos em e através do epitélio mucosal através da rota paracelular. Por isso, os métodos e composições da invenção dirigem ambas rotas paracelular e transcelular, alternativamente ou dentro de um método ou composição única.

Como se usará aqui, agentes que intensificam a administração epitelial incluem agentes os quais melhoram a libertação ou solubilidade (por exemplo, de um veículo de

administração de formulação), taxa de difusão, capacidade e sincronização de penetração, absorção, tempo de residência, estabilidade, vida média efetiva, níveis de concentração prolongados ou máximos, separação e outras características de administração epitelial desejadas (por exemplo, medidas na sítio de administração, ou num sítio objectivo seleccionado da actividade tal como a corrente sanguínea ou a sistema nervoso central) de GRP ou outros compostos biologicamente ativos. A intensificação da administração epitelial pode deste modo, ocorrer por qualquer de uma variedade de mecanismos, por exemplo, aumentando a difusão, transporte, persistência ou estabilidade de GRP, aumentando a fluidez da membrana, modulando a capacidade ou ação de cálcio e outros iões que regulam a permeação intracelular ou paracelular, solubilização de componentes da membrana (por exemplo, lípidos), mudança de níveis do seu hidrilo de proteína e não proteína em tecidos mucosais, incrementar a fluxo do água através de capa celular, modular a fisiologia de união epitelial, reduzir a viscosidade do muco que passa epitélio mucosa, reduzir As taxas de separação mucociliares e outros mecanismos.

Como se usáqui, uma "quantidade efetiva de GRP", contempla administração efetiva de GRP a um sítio dirigido para actividade de fármaco no sujeito que pode envolver uma variedade de rotas de administração ou transferência. Por exemplo, um agente ativo dado pode encontrar a sua forma através de separações entre células da mucosa e alcançar uma parede vascular adjacente, enquanto por outra rota agente pode, ainda que seja passivamente ou activamente, ser tomado em células mucosais para actuar dentro das células ou ser descarregadas ou transportadas fora das células para alcançar um sítio objectivo secundário, tal como a circulação sistémica. Os métodos e composições da invenção podem

promover a deslocação de agentes ativos ao largo de uma ou mais rotas alternativas, ou podem actuar directamente sobre ou tecido mucosal ou tecido vascular próximo para promover a absorção ou penetração dos agentes ativos. A promoção de absorção ou penetração neste contexto, não está limitada a estes mecanismos.

Como se usàqui, "concentração máxima (C_{max}) de GRP num plasma do sangue", "concentração de área sob a curva (AUC) de GRP num plasma do sangue", "tempo a concentração máxima de plasma (t_{max}) de GRP num sangue de plasma", são parâmetros farmacocinéticos conhecidos por um perito na técnica. Laursen, et para ou., *Eur. J. Endocrinology* 135:309-315, 1996. A "concentração contra curva de tempo", medida de concentração de GRP num soro do sangue de um sujeito contra tempo depois de administração de uma dosificação de GRP para ou sujeito ainda que seja por rotas de administração intranasal, intramuscular, subcutânea ou outra parental. A " C_{max} " é a concentração máxima de GRP no soro do sangue de um sujeito depois de uma dosificação única de GRP para ou sujeito. " T_{max} " é a tempo para alcançar a concentração máxima de GRP num soro do sangue de um sujeito depois de administração de uma dosificação única de GRP para ou sujeito.

Como se usàqui, "concentração de área sob a curva de tempo (AUC) de GRP num plasma do sangue", se calcula em conformidade com a regra trapezoidal linear e com adição das áreas residuais. Uma redução de 23% ou um aumento de 30% entre duas doses poderia ser detectada com uma probabilidade de 90% (erro β tipo II = 10%). A "taxa de administração" ou "taxa de absorção", é estimada por comparação do tempo (t_{max}) para alcançar a concentração máxima (C_{max}). Tanto C_{max} como t_{max} , são analisadas usando métodos não paramétricos. As comparações das farmacocinéticas das administrações de GRP

intramusculares, subcutâneas, intravenosas e intranasais, se realizaram por análise de variação (ANOVA). Para comparações em forma de par, se usa um procedimento sequencial Bonferroni-Holmes para avaliar a significância. A relação de
 5 resposta de dose entre As três dose nasais é estimada por análise de regressão. $P < 0.05$ é considerado significativo. Os resultados dão-se como valores médios $\pm$ SEM.

Enquanto o mecanismo de promoção de absorção pode variar com diferentes agentes da invenção que intensificam a
 10 administração epitelial, agentes úteis neste contexto não afetarão substancialmente de maneira adversa o tecido e serão seleccionados em conformidade com As características físico-químicas do GRP particular ou outro agente de intensificação de administração ou ativo. Neste contexto, agentes que
 15 intensificam a administração que incrementam a penetração ou permeabilidade de tecidos mucosais, frequentemente resultaram em alguma alteração de barreira de permeabilidade protectora da mucosa. Para tais agentes que intensificam a administração para ser de valor dentro da invenção, se deseja em geral, que
 20 qualquer mudança significativa na permeabilidade da membrana biológica seja reversível dentro de uma estrutura de tempo adequada duração desejada de administração de fármaco. Além disso, não deve haver toxicidade cumulativa, substancial, nem alguma mudança eliminadora permanente induzida nas
 25 propriedades de barreira da membrana biológica com uso de longo termo.

Dentro de certos aspectos da invenção, os agentes que promovem a absorção para administração coordenada ou formulação combinatorial com GRP da invenção, se seleccionam
 30 de moléculas hidrofílicas pequenas, que incluem mas não se limitam a, dimetil sulfoxido (DMSO); dimetilformamida, etanol, propilenoglicol, e 2-pirrolidonas. Alternativamente, moléculas anfipáticas de cadeia longa, por exemplo,

deacilmetilsulfóxido, azona, laurilsulfato de sódio, ácido oleico e sais biliares, podem ser empregues para melhorar a penetração da membrana biológica do GRP. Aspectos adicionais, são empregues tensioativos (por exemplo, polisorbatos) como compostos adjuntos, agentes de processamento, ou aditivos de formulação para melhorar a administração trans-epitelial do GRP. Agentes tais como DMSO, polietileno glicol, e etanol, podem se apresentam em concentrações suficientemente altas nãmbiente de administração (por exemplo, por pré-administração ou incorporação numa formulação terapêutica), entrar na fase aquosa da mucosa e alterar suas propriedades solubilizantes, e com isso, melhorar a divisão do GRP do veículo na membrana biológica.

Agentes que intensificam a administração epitelial adicional que são empregues dentro de administração coordenada e métodos de processamento e formulações combinatoriais da invenção incluem, mas não se limitam a, micélios misturados, enaminas; doadores de óxido nítrico (por exemplo, S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina, NOR1, NOR4, os quais são preferencialmente co-administrados com um depurador de NO tal como carboxi-PITO ou diclofenac sódico); salicilato de sódio; ésteres de glicerol de ácido acetoacético (por exemplo, gliceril-1,3-diacetoacetato ou 1,2-isopropilidenglicerina-3-acetoacetato); e outros agentes que promovem a libertação-difusão ou intra ou trans-penetração epitelial que são fisiologicamente compatíveis para administração epitelial. Outros agentes que promovem a absorção, se seleccionam de uma variedade de portadores, bases e excipientes que melhoram a administração epitelial, estabilidade, actividade ou penetração trans-epitelial do GRP. Estes incluem, entre outras coisas, ciclodextrinas e derivados de β -ciclodextrinas (por exemplo, 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina e heptakis (2,6-di-OU-metil- β -ciclodextrina).

Estes compostos, opcionalmente conjugados com um ou mais dos ingredientes ativos e Além disso, opcionalmente formulado numcom base oleaginosa, melhorà biodisponibilidade nas formulações epiteliais da invenção. Agentes que melhoram a absorção adicional após, adaptados para administração epitelial incluem ácidos gordos de cadeia média, que incluem mono e diglicéridos (por exemplo, extractos de caprato sódico de óleo de coco, Capmul), e triglicéridos (por exemplo, amilodextrina, Estaram 299, Migliol 810).

As composições terapêuticas epiteliais e profiláticas da presente invenção, podem ser suplementadas com qualquer agente que promove a penetração, que facilità absorção, difusão ou penetração de GRP através das barreiras da membrana biológica. OU promotor de penetração pode ser qualquer promotor que é farmacêuticamente aceitável. Deste modo, nos aspectos mais detalhados das composições da invenção, se proporciona que incorporem ou mais agentes que promovem a penetração, seleccionados de salicilato de sódio e derivados de ácido salicílico (acetil salicilato, salicilato de colina, salicilamida, etc.); aminoácidos e sais dos mesmos (por exemplo, ácidos monoaminocarboxílicos tais como glicina, alanina, fenilalanina, prolina, hidroxiprolina, etc.; hidroxiaminoácidos tais como serina; aminoácidos acídicos tais como ácido aspártico, ácido glutâmico, etc.; e aminoácidos básicos tais como lisina etc. -inclusiva do seus sais de metais álcalis ou metais alcalino térreos); e N-acetilaminoácidos (N-acetilalanina, N-acetilfenilalanina, N-acetilserina, N-acetilglicina, N-acetillisina, ácido N-acetilglutâmico, N-acetilprolina, N-acetilhidroxiprolina, etc.) e seus sais (sais de metais álcalis e metais alcalino térreos). Também proporcionados como agentes que promovem a penetração com os métodos e composições da invenção, estão substâncias as quais são em geral usadas como emulsionantes

(por exemplo, oleil fosfato de sódio, lauril fosfato de sódio, laurilsulfato de sódio, miristil sulfato de sódio, polioxietilenalquil éteres, polioxietilenalquil ésteres, etc.), ácido capróico, ácido láctico, ácido málico e ácido cítrico e sais de metais álcalis do mesmo, ácidos pirrolidincarboxílico, ésteres de ácido alquilpirrolidincarboxílico, N-alquilpirrolidonas, ésteres de ácido prolina e similares.

Dentro de vários aspectos da invenção, se proporcionam formulações e métodos de administração mucosal nasal melhorados, que permitem a administração de GRP e outros agentes terapêuticos dentro da invenção através das barreiras da membrana biológica entre a administração e sítios objectivo seleccionado. Certas formulações são especificamente adaptadas para uma célula, tecido ou órgão objectivo seleccionado, ou após um estado de doença particular. Em certos aspectos, formulações e métodos proporcionados por endo ou transcitosis eficiente, selectiva de GRP especificamente dirigido junto com uma trajectória intracelular ou intercelular definida. Tipicamente, a GRP é eficientemente carregada a níveis de concentração efetivos num portador ou outro veículo de administração, e é administrado e mantido numa forma estabilizada, por exemplo, na mucosa nasal e/ou durante a passagem através de compartimentos intracelulares e membranas a um sítio objectivo remoto de ação de fármaco (por exemplo, a corrente do sangue ou um tecido definido, órgão ou compartimento extracelular). OU GRP pode ser proporcionado num veículo de administração ou de outro modo modificado (por exemplo, na forma de um profármaco), onde libertação ou activação do GRP é activada por um estímulo fisiológico (por exemplo, mudança de pH, enzimas lisossomais, etc.). Frequentemente, a GRP é farmacologicamente inativo até que alcança o seu sítio

objectivo por actividade. Em muitos casos, a GRP e outros componentes de formulação são não tóxicos e não imunogénicos. Neste contexto, portadores e outros componentes de formulação são em geral seleccionados por ou sua capacidade para ser rapidamente degradados e excretados sob condições fisiológicas. Para o mesmo tempo, as formulações são química e fisicamente estáveis em forma de dosificação para armazenamento efetivo.

Peptídeos e Análogos de Proteína e Miméticos

Incluídos dentro de definição de peptídeos e proteínas biologicamente ativos para uso dentro da invenção, estão peptídeos sintéticos, terapêuticamente ou profilaticamente ativos (contendo de dois ou mais aminoácidos covalentemente ligados), proteínas, peptídeos ou fragmentos de proteínas, peptídeos ou análogos de proteínas e derivados quimicamente modificados ou sais de peptídeos ou proteínas ativos. Uma ampla variedade de análogos e miméticos úteis de GRP estão contemplados para uso dentro da invenção, e podem ser produzidos e testados pela sua atividade biológica em conformidade com métodos conhecidos. Frequentemente, os peptídeos ou proteínas de GRP ou outros peptídeos ou proteínas biologicamente ativos para uso dentro da invenção, são mutações que são facilmente obtíveis por substituição, adição ou supressão parcial de aminoácidos dentro de um peptídeo ou sequência de proteína que se origina naturalmente ou nativa (por exemplo, mutante que se origina naturalmente, de tipo nativo, ou variante alélica). Adicionalmente, os fragmentos biologicamente ativos de peptídeos ou proteínas estão incluídos. Tais derivados e fragmentos mutantes retêm substancialmente a atividade biológica desejada do peptídeo ou proteínas nativas. No caso de peptídeos ou proteínas que têm cadeias de carboidratos, as variantes biologicamente activas marcadas por alterações nestas espécies de carboidratos,

também estão incluídas dentro da invenção.

Como se usãqui, "substituição de aminoácido conservativo", refere-se a capacidade de intercâmbio geral de resíduos de aminoácido que têm cadeias laterais similares.

5 Por exemplo, um grupo comumente intermutável de aminoácidos que têm cadeias laterais alifáticas é alanina, valina, leucina e isoleucina; um grupo de aminoácidos que têm cadeias laterais hidroxilo alifáticas é serina e treonina; um grupo de aminoácidos que têm cadeias laterais que contém amida, é

10 asparagina e glutamina; um grupo de aminoácidos que têm cadeias laterais aromáticas é fenilalanina, tirosina e triptofano; um grupo de aminoácidos que têm cadeias laterais básicas é lisina, arginina, histidina; e um grupo de aminoácidos que têm cadeias laterais que contém enxofre é

15 cisteína e metionina. Exemplos de substituições conservativas incluem a substituição de um resíduo não polar (hidrofóbico) tal como isoleucina, valina, leucina ou metionina por outro. Do mesmo modo, a presente invenção contemplà substituição de um resíduo polar (hidrofílico) tal

20 como entre arginina e lisina, entre glutamina e asparagina e entre treonina e serina. Adicionalmente, a substituição de um resíduo básico tal como lisina, arginina ou histidina por outro ou a substituição de um resíduo acídico tal como ácido aspártico ou ácido glutâmico por outro, também se contempla.

25 Grupos de substituição de aminoácidos conservativos exemplares são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina e asparagina-glutamina. Alinhando um peptídeo ou proteína análoga

30 otimamente com um peptídeo ou proteína nativa correspondente, e usando ensaios adequados, por exemplo, proteína dadesão ou ensaio de ligação de receptor, para determinar uma atividade biológica seleccionada, se pode identificar facilmente, análogos de proteína e peptídeo

operáveis para uso dentro dos métodos e composições da invenção. Análogos de proteínas e peptídeos operáveis são tipicamente especificamente imunoreagentes com anticorpos originados para ou peptídeo ou proteína nativa correspondente.

Um procedimento para estabilizar formulações de proteínas sólidas da invenção, é incrementar a estabilidade física de proteína liofilizada, por exemplo, purificada. Isto inibirá àgregação através interações hidrofóbicas, assim como também através trajectórias covalentes que podem incrementar conforme as proteínas se desprendem. As formulações estabilizantes neste contexto, frequentemente incluem formulações com base de polímeros, por exemplo, um sistema de formulação/administração de hidrogel biodegradável. Como se notou anteriormente, o papel crítico da água na estrutura de proteína, função e estabilidade, é bem conhecido. Tipicamente, as proteínas são relativamente estáveis no estado sólido com volume de água removido. Não obstante, As formulações de proteína terapêutica sólida podem chegar a ser hidratadas depois do armazenamento a humidades elevadas ou durante a administração de uma composição ou dispositivo de libertação prolongada. A estabilidade de proteínas em geral cai com o aumento de hidratação. A água pode também desempenhar um papel significante na agregação de proteína sólida, por exemplo, aumentando a flexibilidade de proteína que resulta em acessibilidade aumentada de grupos reagentes, proporcionando uma fase móvel para reagentes, e servindo como um reagente em vários processos eliminatórios tais como beta-eliminação e hidrólise.

As preparações de proteína que contêm entre aproximadamente 6% até 28% de água, são as mais instáveis. Por desobediência deste nível, a mobilidade de ligações de água e porções internas de proteína são substituídas. Arriba

deste nível, a mobilidade do água e porções de
proteína alcançam aquelas de hidratação completa. Até um ponto,
a susceptibilidade aumentada até à agregação de fase sólida com
hidratação aumentada, foi observada em vários sistemas. Não
5 obstante, com conteúdo de água superior, se observa menos
agregação devido ao efeito de diluição.

Em conformidade com estes princípios, um método
efetivo para estabilizar peptídeos e proteínas contra agregação
destado sólido para administração mucosal, é controlar com
10 conteúdo de água numa formulação sólida e manter a atividade
da água na formulação a níveis ótimos. Este nível depende da
natureza da proteína, mas em geral, as proteínas mantidas por
de sob da sua cobertura de água "monocapa", mostraram
estabilidade destado sólido superior.

15 Se proporciona uma variedade de aditivos, diluentes,
bases e veículos de administração dentro da invenção, que
controlam efetivamente com conteúdo de água para melhorar a
estabilidade de proteína. Estes reagentes e materiais
portadores efetivos como agentes anti-agregação neste sentido
20 incluem, por exemplo, polímeros de várias funcionalidades,
tais como polietileno glicol, dextran, dimetilaminoetil
dextran e carboximetilcelulose, os quais incrementam
significativamente a estabilidade e reduzem a agregação de fase
sólida de peptídeos e proteínas misturados junto com estes ou
25 ligados a estes. Nalguns casos, a atividade ou estabilidade
física das proteínas também pode ser melhorada por vários
aditivos a soluções aquosas do peptídeo ou fármacos de
proteína. Por exemplo, aditivos tais como polióis (que
incluem açúcares), aminoácidos, proteínas tais como colagénio
30 e gelatina e vários sais, podem ser usados.

Certos aditivos, em particular açúcares e outros
polióis, também conferem estabilidade física significativa a
proteínas liofilizadas, por exemplo, secas. Estes aditivos

também podem ser usados dentro da invenção para proteger as proteínas contra agregação não apenas durante a liofilização, se não também durante ou armazenamento no estado seco. Por exemplo, sacarose e Ficoll 70 (um polímero com unidades de sacarose), exibem protecção significativa contra peptídeo ou agregação de proteína durante a incubação da fase sólida sob várias condições. Estes aditivos também podem melhorar a estabilidade de proteínas sólidas incrustadas com matrizes poliméricas.

Após aditivos adicionais, por exemplo, sacarose, estabilizarem proteínas contra agregação em estado sólido nas atmosferas húmidas a temperaturas elevadas, como pode ocorrer em certas formulações de libertação prolongada da invenção. Proteínas tais como gelatina e colagénio, também servem como agentes estabilizantes ou de volume para reduzir a desnaturalização e agregação de proteínas instáveis neste contexto. Estes aditivos podem ser incorporados em processos de fusão polimérica e composições dentro da invenção. Por exemplo, micropartículas de polipeptido podem ser preparadas liofilizando simplesmente ou atomizando por secagem numa solução que contém vários aditivos estabilizantes descritos anteriormente. A libertação prolongada de peptídeos e proteínas não agregados pode e com isso, obter-se sobre um período prolongado de tempo.

Vários componentes e métodos preparativos adicionais, assim como também aditivos de formulação específicos, se proporcionam aqui, os quais proporcionam formulações para administração epitelial de peptídeos e proteínas da agregação propensas, onde ou peptídeo ou proteína é estabilizado numa forma substancialmente pura, não agregada usando um agente de solubilização. Num intervalo, componentes e aditivos estão contemplados para uso dentro destes métodos e formulações. Exemplares destes agentes de solubilização são

ciclodextrinas (CDs), As quais ligam selectivamente cadeias laterais hidrofóbicas de polipeptidos.

Estas CD encontraram-se por ligar em pares hidrofóbicos de proteínas numa maneira que inibe
5 significativamente àgregação. Esta inibição é selectiva com respeito tanto a CD como à proteína envolvida. Tal inibição selectiva da agregação de proteína proporciona vantagens adicionais dentro dos métodos de administração intranasal e composições da invenção. Agentes adicionais para uso neste
10 contexto incluem, dímeros, trímeros e tetrámeros de CD com geometrias variantes controladas pelos conectores que especificamente bloqueiam àgregação de peptídeos e proteínas. Após agentes de solubilização e métodos para incorporação dentro da invenção envolverem, ou uso de peptídeos e
15 miméticos peptídicos para bloquear selectivamente as interações de proteína-proteína. Num aspecto, a ligação específica de cadeias laterais hidrofóbicas reportada para multímeros de CD, estende-se a proteínas através do uso de peptídeos e miméticos peptídicos que bloqueiam similarmente
20 àgregação de proteína. Um amplo intervalo de métodos adequados e agentes anti-agregação estão disponíveis para incorporação dentro das composições e processos da invenção. Modificação da Carga e Agentes de Controlo de pH e Métodos

25 Para melhorar as características de transporte de agentes biologicamente ativos (que incluem GRP, outros peptídeos e proteínas ativos, e fármacos moleculares pequenos e macromoleculares) para administração melhorada através das barreiras da membrana biológica hidrofóbica, a invenção
30 também proporciona técnicas e reagentes para modificação da carga de agentes biologicamente ativos seleccionados ou agentes que intensificam a administração descritos neste documento. Neste sentido, as permeabilidades relativas de

macromoléculas estão em geral, relacionadas com os seus coeficientes de divisão. OU grau de ionização das moléculas, ou qual é dependente do pK_a da molécula e ou pH na superfície da membrana biológica, também afectam a permeabilidade das moléculas. A permeação e divisão dos agentes biologicamente ativos, que incluem GRP e análogos da invenção, para administração epitelial, pode ser facilitada por alteração da carga ou dispersão de carga do agente ativo ou agente permeabilizante, ou qual se consegue por exemplo, por alteração de grupos funcionais carregados, modificando ou pH do veículo de administração ou solução na qual ou agente ativo é administrado, ou por administração coordenada de um reagente que altera o pH ou carga com agente ativo.

Consistente com estes ensinamentos gerais, administração epitelial de espécies macromoleculares carregadas, que incluem GRP e outros peptídeos e proteínas biologicamente activas, dentro dos métodos e composições da invenção, é substancialmente melhorada quando ou agente ativo é administrado na superfície epitelial num estado de carga eléctrica substancialmente não ionizada ou neutra.

Certos GRP e outros componentes de proteínas e peptídeos biologicamente ativos de formulação epitelial para uso dentro da invenção, serão modificados na carga para proporcionar um aumento na densidade da carga positiva do peptídeo ou proteína. Estas modificações se estendem também a cationização de conjugados de peptídeo e proteína, portadores e outras formas de administração descritas aqui. A cationização oferece um meio conveniente para alterar a biodistribuição e propriedades de transporte de proteínas e macromoléculas dentro da invenção. A cationização é empreendida de uma maneira que substancialmente preservará actividade biológica do agente ativo e limitará efeitos laterais potencialmente adversos, que incluem ou dano e

toxicidade dos tecidos.

Um "amortecedor" é em geral, usado para manter ou pH de uma solução num valor aproximadamente constante. Um amortecedor mantém o pH de uma solução, ou após, quando
 5 quantidades menores de ácido forte ou base forte são agregados à solução, prevenindo ou neutralizando as trocas de carga em concentrações de iões de hidrogénio e hidróxido. Um amortecedor em geral, consiste de um ácido débil e ou seu sal adequado (ou um com base débil e ou seu sal adequado). Ou sal
 10 adequado para um ácido débil contém os mesmos iões negativos como se apresentam no ácido débil (ver, Lagowski, *Macmillan Encyclopedia of Chemistry*, Vol. 1, Simon & Schuster, New York, 1997, p. 273-4). A equação Henderson-Hasselbach, $\text{pH} = \text{pK}_a + \log_{10} [\text{A}^-]/[\text{HA}]$, é usada para descrever um amortecedor,
 15 e baseia-se na equação padrão para dissociação ácido débil, $\text{HA} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{A}^-$. Exemplos de fontes de amortecedor comumente usadas incluem as seguintes: glutamato, acetato, citrato, glicina, histidina, arginina, lisina, metionina, lactato, formiato, glicolato, tartrato e misturas dos mesmos.

20 A "capacidade amortecedora", significa a quantidade de ácido ou base que pode ser agregada a uma solução amortecedora antes que ocorra uma mudança de pH significativa. Se o pH cai dentro do intervalo de $\text{pK}-1$ e $\text{pK}+1$ do ácido débil, a capacidade amortecedora é apreciável, mas
 25 fora deste intervalo, cai a tal magnitude que é de pouco valor. Por isso, um sistema dado apenas tem uma amortecedora útil num intervalo de uma unidade de pH em qualquer lado do pK do ácido débil (ou base débil) (ver Dawson, *Data for Biochemical Research*, Third Edition, Oxford
 30 Science Publications, 1986, p. 419). Em geral, elegem-se concentrações adequadas de maneira que o pH da solução seja próximo do pK_a do ácido débil (ou base débil) (ver Lide, *CRC*

Handbook of Chemistry and Physics, 86th Edition, Taylor & Francis Group, 2005-2006, p. 2-41). Além disso, soluções de ácidos e bases fortes não são normalmente classificadas como soluções amortecedoras, e não exibem capacidade amortecedora entre os valores de pH 2.4 a 11.6.

Agentes Inibidores de Enzima Degradativa e Métodos

Outro excipiente que pode ser incluído numa preparação trans-epitelial é um inibidor de enzima degradativa. Complexos inibidores de polímero-enzima mucoadesivos exemplares que são empregues dentro das formulações de administração epitelial e métodos da invenção incluem, mas não se limitam a: Carboximetilcelulose-pepstatina (com actividadanti-pepsina); poli(ácido acrílico)-inibidor Bowman-Birk (anti-quimiotripsina); poli(ácido acrílico)-quimiostatina (anti-quimiotripsina); poli(ácido acrílico)-elastatinal(anti-elastase); Carboximetilcelulose-elastatinal(anti-elastase); Policarbofilo-elastatinal(anti-elastase); Quitosan-antipaína(anti-tripsina); poli(ácido acrílico)-bacitrina (anti-aminopeptidase N); Quitosan-EDTA (anti-aminopeptidase N, anti-carboxipeptidase A); Quitosan-EDTA-antipaína (anti-tripsina, antiquimiotripsina, anti-elastase). Como se descreve em mais detalhe adicional, certas modalidades da invenção incorporaram opcionalmente um novo derivado de quitosano ou forma química modificada de quitosano. Um novo derivado para uso dentro da invenção denota-se como polímero β -[1 $\rightarrow$ 4]-2-guanidino-2-desoxi-D-glucose (poli-GuD).

Qualquer inibidor que inibe actividade de uma enzima para proteger os agentes biologicamente ativos, pode ser utilmente empregue nas composições e métodos da invenção. Os inibidores enzimáticos úteis para protecção de proteínas e peptídeos biologicamente ativos incluem, por exemplo, inibidores de dipeptidil aminopeptidase (DPP) IV, inibidor de

tripsina de soja, inibidor de tripsina exendina, inibidor de quimiotripsina e inibidor de tripsina e quimiotripsina isolado de tubérculos de papa (*solanum tuberosum* L). Uma combinação ou misturas de inibidores pode ser empregue.

5 Inibidores adicionais de enzimas proteolíticas para uso dentro da invenção incluem, enzima ovomucoide, gabaxato mesilato, alfa 1-antitripsina, aprotinina, amastatina, bestatina, puromicina, bacitracina, leupepsina, alfa2-macroglobulina, pepstatina e inibidor de tripsina de ovo
10 branco ou soja. Estes e outros inibidores podem ser usados solos ou em combinação. Os inibidores podem ser incorporados em ou unidos a um portador, por exemplo, um polímero hidrofílico, revestido na superfície de forma dosificada a qual está em contacto com a mucosa nasal, ou incorporado na
15 fase superficial do seuperfície, em combinação com agente biologicamente ativo numa formulação separadamente administrada (por exemplo, pré-administrada) (por exemplo, pastilhas orais).

A quantidade do inibidor, por exemplo, de inibidor
20 enzimático proteolítico que é opcionalmente incorporada nas composições da invenção, variará dependendo de (a) As propriedades do inibidor específico, (b) a número de grupos funcionais presentes na molécula (a qual pode se pode fazer reagir para introduzir insaturação etilénica necessária para
25 copolimerização com monómeros que formam hidrogel), e (c) ou número de grupos lectina, tais como glicósidos, os quais estão presentes na molécula inibidora. Também podem depender do agente terapêutico específico que é proposto para ser administrado. Falando de maneira geral, uma quantidade útil
30 de um inibidor enzimático é de aproximadamente 0.1 mg/ml até aproximadamente 50 mg/ml, frequentemente, de aproximadamente 0.2 mg/ml até aproximadamente 25 mg/ml, e mais comummente, de aproximadamente 0.5 mg/ml até 5 mg/ml de formulação (isto é,

uma formulação inibidora da protease separada ou formulação combinada com ou inibidor e agente biologicamente ativo).

No caso da inibição da tripsina, podem ser seleccionados inibidores adequados como por exemplo, aprotinina, BBI, inibidor de tripsina de soja, ovomucóide de frango, ovoinibidor de frango, inibidor de tripsina exendina humana, mesilato camostat, inibidores flavonóides, antipaína, leupeptina, p-aminobenzamidina, AEBSF, TLCK (tosilisina clorometilcetona), APMSF, DFP, PMSF e derivados de poli(acrilato). No caso da inibição da quimiotripsina, inibidores adequados podem ser seleccionados de entre por exemplo, aprotinina, BBI, inibidor de tripsina de soja, quimioestatina, benciloxycarbonil-Pro-Phe-CHO, FK-448, ovoinibidor de frango, complexos de ácidos bifenilborónicos daçúcar, DFP, PMSF, β -fenilpropionato, e derivados de poli(acrilato). No caso de inibição de elastase, os inibidores adequados podem ser seleccionados de por exemplo, elastinal, metoxisuccinil-Ala-Ala-Pro-Val-clorometilcetona (MPCMK), BBI, inibidor de tripsina de soja, ovoinibidor de frango, DFP e PMSF.

Inibidores enzimáticos adicionais para uso dentro da invenção, se seleccionam de um amplo intervalo de inibidores não de proteína que variam não seu grau de potência e toxicidade. Como se descreve em mais detalhe em baixo, a imobilização destes agentes adjuntos em matrizes ou outros veículos de administração, ou desenvolvimento danálogos quimicamente modificados, pode ser facilmente implementada para reduzir ou após eliminar os efeitos tóxicos, quando estes se encontram. Entre este amplo grupo de inibidores de enzima candidatos para uso dentro da invenção, estão inibidores organofosforosos, tais como diisopropilfluorofosfato (DFP) e fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), os quais são inibidores

irreversíveis, potentes de serina protease (por exemplo, tripsina e quimiotripsina). A inibição adicional de acetilcolinesterase por estes compostos, torna-os altamente tóxicos em ajustes de administração não controlados. Outro

5 inibidor candidato, fluoruro de 4-(2-aminoetil)-bencensulfonilo (AEBSF), tem actividade inibidora comparável com DFP e PMSF, mas é marcadamente menos tóxico. O Cloridrato fluoruro de (4-aminofenil)-metansulfonilo (APMSF), é outro inibidor potente de tripsina, mas é tóxico em ajustes

10 não controlados. Contrariamente a estes inibidores, metansulfonato 1,2,3,4-tetrahydro-1-naftanoato de 4-(4-isopropilpiperadinocarbonil)fenilo (FK-448), é uma substância tóxica baixa, que representa um inibidor específico e potente de quimiotripsina. Representantes adicionais deste grupo sem

15 proteína de candidatos inibidores, e que também exibem riscos tóxicos, são mesilato de camostat (metan-sulfonato de N,N'-dimetil carbamoilmetil-p-(p'-guanidino-benzoiloxi)fenilacetato).

Também outros tipos de agentes inibidores da

20 enzima para uso dentro dos métodos e composições da invenção são, aminoácidos e aminoácidos modificados que interferem com a degradação enzimática de compostos terapêuticos específicos. Para uso neste contexto, aminoácidos e aminoácidos modificados, são substancialmente não tóxicos e

25 podem ser produzidos a baixo custo. Não obstante, devido ao seu tamanho molecular baixo e boa solubilidade, são facilmente diluídos e absorvidos em ambientes mucosais. Não obstante, sob condições apropriadas, os aminoácidos podem actuar como inibidores competitivos, reversíveis de enzimas

30 protease. Certos aminoácidos modificados podem exibir uma actividade inibidora muito mais forte. Um aminoácido modificado desejado neste contexto, conhece-se como um inibidor de "estado de transição". Actividade inibidora forte

destes compostos baseia-se na sua semelhança estrutural com um substrato na sua geometria de estado de transição, enquanto são em geral, seleccionados por ter uma afinidade muito superior para o local ativo de uma enzima que se substitui a se mesma. Os inibidores de estado de transição são inibidores competitivos, reversíveis. Exemplos deste tipo de inibidor são derivados de ácido α -aminoborónico, tais como boro-leucina, boro-valina e boro-alanina. O átomo de boro nestes derivados pode formar um ion boronato tetrahédrico que se assemelha para o estado de transição de peptídeos durante ou sua hidrólise por aminopeptidasas. Estes derivados de aminoácido são inibidores reversíveis e potentes aminopeptidasas e se reporta que a boro-leucina é mais de 100 vezes mais efetivo na inibição enzimática que a bestatina e mais de 1000 vezes mais efetivo que puromicina. Outro aminoácido modificado para qual reportou-se que uma actividade inibitoria de protease forte, é N-acetilcisteína, a qual inibe a actividade enzimática da aminopeptidase N. Este agente adjunto exhibe propriedades mucolíticas que podem ser empregues dentro dos métodos e composições da invenção, para reduzir os efeitos de barreira de difusão do muco.

Todavia outros inibidores enzimáticos úteis para uso dentro dos métodos de administração coordenada e formulações combinatoriais da invenção, podem ser seleccionados de peptídeos e inibidores enzimáticos peptídicos modificados. Um representante importante desta classe de inibidores é o dodecapéptido cíclico, bacitracina, obtido de *Bacillus licheniformis*. Além disso destes tipos de peptídeos, certos peptídeos e tripeptídeos exibem actividade inibidora não específica, débil, até algumas proteases. Por analogia com aminoácidos, ou sua actividade inibitoria pode ser melhorada por modificações químicas. Por exemplo, análogos de dipéptido de ácido fosfórico também são

inibidores de "transição-estado", com uma actividade inibitoria forte até aminopeptidasas. Han sido según se informa, usados para estabilizar leucina encefalina nasalmente administrada. Outro exemplo de um análogo de
5 transição-estado, é a pepstatina de pentapéptido modificado, a qual é um inibidor muito potente de pepsina. Análise estrutural de pepstatina, testando a actividade inibidora de vários análogos sintéticos, de amostras características de função-estrutura principais de molécula responsável da
10 actividade inibitória. Outro tipo especial de peptídeo modificado inclui inibidores com uma função de aldeído terminalmente localizada na sua estrutura. Por exemplo, a sequência benciloxycarbonil-Pro-Phe-CHO, a qual cobre completamente os requisitos de especificidade primária e
15 secundária conhecidos de quimiotripsina, foi encontrada por ser um inibidor reversível potente desta proteinase alvo. As estruturas químicas de inibidores adicionais com uma função aldeído terminalmente localizado, por exemplo, antipaína, leupeptina, quimiostatina e elastatinal, também são
20 conhecidos na técnica, como são as estruturas de outros inibidores peptídicos modificados, reversíveis, conhecidos, tais como fosforamidon, betatina, puromicina e amastatina.

Devido à sua massa molecular comparavelmente alta, inibidores de protease de polipéptido, são mais receptivos
25 que os compostos mais pequenos a administração concentrada em matrizes que transportam fármaco. Agentes adicionais para inibição de protease dentro das formulações e métodos da invenção, envolvem o uso de agentes formadores de complexos. Estes agentes medeiam a inibição enzimática evitando o
30 ambiente intranasal (ou composição preparativa ou terapêutica), de catiões divalentes, os quais são co-factores para muitas proteases. Por exemplo, os agentes que formam complexos EDTA e DTPA, como agentes adjuntos

combinatorialmente formulados ou coordenadamente administrados, em concentração adequada, serão suficiente para inibir As proteases seleccionadas para e com isso, melhorar a administração intranasal de agentes biologicamente
5 ativos em conformidade com a invenção. Representativos adicionais desta classe de agentes inibidores são EGTA, 1,10-fenantrolina e hidroxiquinolina. Além disso, devido à sua propensão para quelar catiões divalentes, estes e outros agentes que formam complexos são empregues dentro da invenção
10 como agentes que promovem a absorção, directos.

Como se nota em detalhe noutra parte aqui, também se contempla usar vários polímeros, particularmente polímeros mucoadesivos, como agentes que inibem a enzima dentro da administração coordenada, métodos e composições de multi-
15 processamento e/ou formulação combinatorial da invenção. Por exemplo, derivados de poli(acrilato), tais como poli(ácido acrílico) e policarbófilo, podem afectar a actividade de várias proteases, que incluem tripsina, quimiotripsina. O efeito inibidor destes polímeros também se pode basear na
20 formação de complexos de catiões divalentes tais como Ca^{2+} e Zn^{2+} . Contempla-se além disso, que estes polímeros podem servir como padrões ou associados conjugados para agentes inibidores enzimáticos adicionais, como descreve-se anteriormente. Por exemplo, um conjugado quitosan-EDTA, foi
25 desenvolvido e é empregue dentro da invenção, que exhibe um efeito inibidor forte até à actividade enzimática de proteases dependentes do zinco. As propriedades mucoadesivas de polímeros depois de união covalente de outros inibidores enzimáticos neste contexto, não se espera seja
30 substancialmente comprometida, nem a utilidade geral de tais polímeros como um veículo de administração para agentes biologicamente ativos dentro da invenção, se espera que seja diminuída. Pelo contrário, a distância reduzida entre a

veículo de administração e a superfície mucosal proporcionada pelo mecanismo mucoadesivo minimizará o metabolismo pré-sistêmico do agente ativo, enquanto os inibidores de enzima covalentemente unidos permanecerão concentrados no sítio de administração do fármaco, minimizando os efeitos de diluição indesejados de inibidores, assim como também efeitos tóxicos e outros colaterais causados e com isso. Desta maneira, a quantidade efetiva de um inibidor de enzima coordenadamente administrado, pode ser reduzida a exclusão de efeitos de diluição.

Complexos inibidores de polímero-enzima mucoadesivos que são empregues dentro das formulações mucosais e métodos da invenção incluem, mas não se limitam a: Carboximetilcelulose-pepstatina (com actividade anti-pepsina); poli(ácido acrílico)-inibidor Bowman-Birk (anti-quimiotripsina); poli(ácido acrílico)-quimiostatina (anti-quimiotripsina); poli(ácido acrílico)-elastatinal(anti-elastase); Carboximetilcelulose-elastatinal(anti-elastase); Policarbofilo-elastatinal(anti-elastase); Quitosan-antipaína(anti-tripsina); poli(ácido acrílico)-bacitrina (anti-aminopeptidasa N); Quitosan-EDTA (anti-aminopeptidase N, anti-carboxipeptidasà); Quitosan-EDTA-antipaína (anti-tripsina, anti-quimiotripsina, anti-elastase).

Agentes Separadores de Muco e Mucolítico e Métodos

A administração efetiva de agentes bioterapêuticos através da administração intranasal deve ter em conta a taxa de transporte de fármaco reduzida através do revestimento mucoso protector da mucosa nasal, além da perda de fármaco devido a ligação a glicoproteínas de capa da mucosa. O muco normal é uma substância semelhante a um gel, viscoelástica que consiste de água, electrólitos, mucinas, macromoléculas e células epiteliais deslocadas. Serve principalmente como uma cobertura citoprotectora e lubrificante para os tecidos

mucosais subjacentes. O muco é secretado por células secretoras aleatoriamente distribuídas localizadas no epitélio nasal e em outros epitélios mucosais. A unidade estrutural do muco é a mucina. Esta glicoproteína é
5 principalmente responsável pela natureza viscoelástica do muco, ainda que outras macromoléculas também possam contribuir para esta propriedade. Nas mucosas das vias respiratórias, tais macromoléculas podem produzir localmente IgA, IgM, IgE, lisozima e broncotransferrina secretoras, as
10 quais também desempenham um papel importante no mecanismo de defesa hospedeiro.

Os métodos de administração coordenados da presente invenção, incorporam opcionalmente agentes de separação de muco ou mucolíticos, os quais servem para degradar; muco
15 delgado ou transparente das superfícies mucosais intranasais para facilitar a absorção de agentes bioterapêuticos intranasalmente administrados. Dentro destes métodos, um agente de separação de muco ou mucolítico, é coordenadamente administrado como um composto adjunto para melhorar a
20 administração intranasal do agente biologicamente ativo. Alternativamente, uma quantidade efetiva de agente de separação de muco ou mucolítico, se incorpora como um agente de processamento dentro de um método de processamento múltiplo da invenção, ou como um aditivo dentro de uma
25 formulação combinatorial da invenção, para proporcionar uma formulação melhorada que melhora a administração intranasal de compostos bioterapêuticos reduzindo os efeitos de barreira de muco intranasal.

Uma variedade de agentes de separação de muco ou
30 mucolíticos estão disponíveis para incorporação dentro dos métodos e composições da invenção. Baseados nos seus mecanismos de ação, os agentes de separação de muco e mucolíticos podem frequentemente, ser classificados nos

seguintes grupos: proteases (por exemplo, pronase, papaína), que desdobram o núcleo da proteína de glicoproteínas mucinas; compostos sulfidrílicos que dividem as ligações de dissulfuro de mucoproteína; e detergentes (por exemplo, Triton X-100, Tween 20), que rompem ligações não covalentes dentro do muco. Compostos adicionais neste contexto incluem, mas não se limitam a, sais biliares e tensoativos, por exemplo, desoxicolato de sódio, taurodesoxicolato de sódio, glicolato sódico e lisofosfatidilcolina.

A efetividade de sais biliares que causam rompimento estrutural do muco, é da ordem de desoxicolato > taurocolato > glicolato. Outros agentes efetivos que reduzem a viscosidade do muco ou adesão para melhorar a administração intranasal em conformidade com os métodos da invenção incluem, por exemplo, ácidos gordos de cadeia curta e agentes mucolíticos que trabalham por quelação, tais como peptídeos N-acilcolágeno, ácidos biliares e saponinas (a última funciona em parte, quelando Ca^{2+} e/ou Mg^{2+} , os quais desempenham um papel importante em manter a estrutura da capa mucosa).

Agentes mucolíticos adicionais para uso dentro dos métodos e composições da invenção incluem, N-acetil-L-cisteína (ACS), um agente mucolítico potente que reduz tanto a viscosidade como aderência do muco broncopulmonar e é reportado por incrementar modestamente a biodisponibilidade nasal de hormona de crescimento humano em ratas anestesiadas (desde 7.5 até 12.2%). Estes e outros agentes que separam o muco ou mucolíticos, são contactados com a mucosa nasal, tipicamente num intervalo de concentração desde aproximadamente 0.2 até 20 mM, coordenadamente com a administração do agente biologicamente ativo, para reduzir a viscosidade polar e/ou elasticidade do muco intranasal.

Todavia outros agentes de separação de muco ou

mucolíticos podem ser seleccionados de um intervalo de enzimas glicosidases, as quais são capazes de desdobrar ligações glicosídicas dentro de glicoproteína do muco. As α -amilase e β -amilases, são representativas desta classe de enzimas, ainda que o seu efeito mucolítico possa ser limitado. Pelo contrário, as glicosidases bacterianas permitem a estes microorganismos permear as capas mucosas dos seus hospedeiros.

Para uso combinatorial com a maioria dos agentes biologicamente ativos dentro da invenção, que incluem peptídeos e proteínas terapêuticas, detergentes não ionogénicos são em geral, também empregues como agentes de separação de muco ou mucolíticos. Estes agentes tipicamente não modificaram ou deterioraram substancialmente a actividade de polipeptídeos terapêuticos.

Agentes que Intensificam a Viscosidade

Os agentes de suspensão ou que intensificam a viscosidade, podem afectar a taxa de libertação de um fármaco a partir da formulação e absorção de dosificação. Como resultado, podem ser usados intensificadores de viscosidade para modificar a permeação de alguns peptídeos de regulação de glucose. Alguns exemplos de materiais os quais podem servir como agentes que intensificam a viscosidade farmacêuticamente aceitáveis são, metilcelulose (MC); hidroxipropilmetilcelulose (HPMC); carboximetilcelulose (CMC); celulose; gelatina; amido; amido beta; poloxámeros; plurónicos; CMC sódico; sorbitol; acacia; povidona; carbopol; polycarbófilo; quitosan; microesferas de quitosan; microesferas de alginato; glutamato de quitosan; resina amberlite; hialuronano; etil celulose; maltodextrina DE; amido de milho de forma seca em tambor (DDWM); microesferas de amido degradáveis (DSM); desoxiglicolato (GDC); hidroxietilcelulose (HEC); hidroxipropilcelulose (HPC);

celulose microcristalina (MCC); ácido polimetacrílico e polietilenoglicol; ciclodextrina do seu sulfobutiléter B; bioesferas dalmidón eldexómero reticulado; taurodiidrofusidato sódico (STDHF); cloreto de N-trimetil
 5 quitosan (TMC); microesferas dalmidón degradadas; resina amberlite; nanopartículas de quitosan; crospovidona seca por aspersão; microesferas de dextran secas por aspersão; celulose microcristalina seca por aspersão; e microesferas de amido eldexómero reticuladas.

10 Agentes Ciliostáticos e Métodos

Devido à capacidade de autolimpeza de certos tecidos mucosais (por exemplo, tecido mucosal nasal), a separação mucociliar, é necessária como uma função protectora (por exemplo, para remover pó, alérgenos e bactérias), que
 15 foi considerada em geral, que esta função não deve ser substancialmente deteriorada por medicações mucosais. O transporte mucociliar na tracto respiratório é um mecanismo de defesa particularmente importante contra infeções. Para conseguir esta unção, o golpe ciliar nas passagens das vias
 20 respiratórias e nasais move uma capa de muco junto à mucosa para remover as partículas e microorganismos inalados.

Agentes ciliostáticos encontram uso dentro dos métodos e composições da invenção, para aumentar o tempo de residência de GRP mucosalmente administrados (por exemplo,
 25 intranasalmente), análogos e miméticos e outros agentes biologicamente ativos descritos aqui. Em particular, a administração destes agentes com os métodos e composições da invenção, é significativamente melhorada em certos aspectos por administração coordenada ou formulação combinatorial de
 30 um ou mais agentes ciliostáticos que funcionam para inibir reversivelmente a actividade das células mucosais, para proporcionar um aumento reversível, temporal no tempo de residência dos agentes ativos mucosalmente administrados.

Para uso dentro destes aspectos da invenção, os factores ciliostáticos mencionados anteriormente, ainda que sejam específicos ou indirectos na sua actividade, são todos candidatos para emprego exclusivo como agentes ciliostáticos em quantidades apropriadas (dependendo de concentração, duração e modo de administração), de maneira tal que proporcionam uma redução temporal (isto é, reversível) ou cessação da separação mucociliar a um sítio mucosal de administração para melhorar a administração de GRP, análogos e miméticos, e outros agentes biologicamente ativos descritos neste documento, sem efeitos colaterais adversos inaceitáveis.

Vários factores ciliostáticos bacterianos isolados e caracterizados na literatura, podem ser empregues dentro das modalidades da invenção. Os factores ciliostáticos da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, incluem um derivado de fenazina, um composto pio (2-alkyl-4-hidroxiquinolinas), e um ramnolípido (também conhecido como uma hemolisina). O composto pio produz ciliostase a concentrações de 50 µg/ml e sem lesões ultraestruturais óbvias. O derivado fenazina também inibe a mobilidade ciliar mas causa algum rompimento da membrana ainda a concentrações substancialmente maiores que 400 µg/ml. A exposição limitada de explantes traqueais para o ramnolípido, resulta em ciliostase, a qual está associada com membranas ciliares alteradas. Mais exposição extensiva a ramnolípidos está associada com a remoção de ramos dineínas daxonemas.

Agentes Ativos do seuperfície e Métodos

Dentro dos aspectos mais detalhados da invenção, um ou mais agentes de penetração da membrana podem ser empregues dentro de um método de administração epitelial ou formulação da invenção, para melhorar a administração epitelial de GRP, análogos e miméticos e outros agentes biologicamente ativos

descritos aqui. Os agentes que intensificam a penetração da membrana biológica neste contexto, podem ser seleccionados de: (i) um tensoativo, (ii) uma sal biliar, (iii) um aditivo de fosfolípido, micélios misturados, liposomas, ou portador, 5 (iv) um álcool, (v) uma enamina, (vi) um composto donador NO, (vii) uma molécula anfipática de cadeia longa, (viii) um intensificador de penetração hidrofóbico pequeno; (ix) derivado de ácido salicílico ou sódio; (x) um éster de glicerol de ácido acetoacético (xi) um derivado de 10 ciclodextrina ou beta-ciclodextrina, (xii) um ácido gordo de cadeia média, (xiii) um agente quelante, (xiv) um aminoácido ou sal do mesmo, (xv) um N-acetilaminoácido ou sal do mesmo, (xvi) uma enzima degradativa; um componente da membrana seleccionado, (xvii) um inibidor de síntese de ácido gordo, 15 (xviii) um inibidor de síntese de colesterol; ou (xiv) qualquer combinação dos agentes que intensificam a penetração da membrana mencionados em (i)-(xviii)).

Certos agentes ativos do seuperfície (tensoativos), são facilmente incorporados dentro das formulações de 20 administração epitelial e métodos da invenção como agentes que intensificam a absorção epitelial. Estes agentes, os quais podem ser coordenadamente administrados ou combinatorialmente formulados com GRP, análogos e miméticos, e outros agentes biologicamente ativos descritos aqui, podem 25 ser seleccionados de um amplo leque de tensoativos conhecidos. Os tensoativos, os quais em geral caem em três classes: (1) polioxietilen éteres não iónicos; (2) sais biliares tais como glicolato sódico (SGC) e desoxicolato (DOC); e (3) derivados de ácido fucsídico tais como 30 taurodihidrofusidato sódico (STDHF). Os mecanismos de ação destas várias classes de agentes ativos do seuperfície tipicamente incluem solubilização do agente biologicamente ativo. Para proteínas e peptídeos os quais frequentemente

formam agregados, as propriedades activas do seuperfície destes promotores de absorção podem permitir interações com proteínas, de maneira tal que unidades mais pequenas tais como monómeros revestidos de tensoativo, podem ser mais facilmente mantidos em solução. Exemplos de outros agentes ativos do seuperfície são didecanoil L- α -fosfatidilcolina (DDPC), polisorbato 80 e polisorbato 20. Estes monómeros são presumivelmente unidades mais transportáveis que os agregados. Um segundo mecanismo potencial é a protecção de peptídeo ou proteína a partir da degradação proteolítica por proteases em ambiente mucosal. Tanto os sais biliares como alguns derivados de ácido fucsídico segundo se reporta, inibem a degradação proteolítica de proteínas por homogeneizados nasais a concentrações menores que ou equivalentes àquelas requeridas para melhorar a absorção de proteína. Esta inibição de protease pode ser especialmente importante para peptídeos com vidas médias biológicas curtas.

Degradação de Enzimas e Inibidores de Síntese de Ácido Gordo e Colesterol

Em aspectos relacionados com a invenção, GRP, análogos e miméticos, e outros agentes biologicamente ativos para administração da membrana biológica, são formulados ou coordenadamente administrados com um agente que intensifica a penetração, seleccionado de uma enzima de degradação, ou um agente estimulador metabólico ou inibidor de síntese de ácidos gordos, esteróis ou outros componentes de barreira epitelial seleccionados, Patente E.U.A N° 6 190 894. Por exemplo, enzimas degradativas tais como fosfolipase, hialuronidase, neuraminidase e condroquitinase, podem ser empregues para melhorar a penetração mucosal de GRP, análogos e miméticos, e outros agentes biologicamente ativos sem causar dano irreversível à barreira mucosal. Numa modalidade, a condroquitinase é empregue dentro dum método ou composição

como se proporciona aqui, para alterar a glicoproteína ou
constituintes glicolípidos de permeabilidade de barreira da
mucosa, e com isso, intensificando a absorção mucosal de GRP,
análogos e miméticos, e outros agentes biologicamente ativos
5 descritos aqui.

Com respeito a inibidores de síntese de
constituintes da barreira mucosal, se nota que os ácidos
gordos livres contam por 20-25% de lípidos epiteliais por
peso. Dois enzimas que limitam a proporção na biosínteses de
10 ácidos gordos livres são acetil CoA carboxilase e sintetase
de ácido gordo. Através de uma série de etapas, os ácidos
gordos livres são metabolizados em fosfolípidos. Deste modo,
os inibidores de síntese de ácido gordo livre e metabolismo
para uso com os métodos e composições da invenção incluem,
15 mas não se limitam a, inibidores da acetil-CoA carboxilase
tal como ácido 5-tetradeciloxi-2-furancarboxílico (TOFA);
inibidores de sintetase de ácido gordo; inibidores de
fosfolipase tais como gomisina, ácido 2-(p-amilcinamil)amino-
4-clorobenzóico, bromuro de bromofenacilo, monoaluro, ácido
20 7,7-dimetil-5,8-eicosadienóico, nicergolina, cefarantina,
nicardipina, quercetina, AMP dibutiril-cíclico, R-24571, N-
oleoiletanolamina, N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-
il)fosfostidil serina, ciclosporina, anestésicos tópicos, que
incluem dibucaína, prenilamina, retinóides, como ácidos trans
25 e 13-cis-retinoico, W-7, trifluoperazina, R-24571
(calmidazolio), 1-hexadocil-3-trifluoroetil glicero-sn-2-
fosfomentol (MJ33); bloqueadores do canal de cálcio que
incluem nicardipina, verapamil, diltiazem, nifedipina, e
nimodipina; antimaláricos que incluem quinacrina, mepacrina,
30 cloroquina e hidroxiclороquina; beta bloqueadores que incluem
propranolol e labetalol; antagonistas de calmodulina; EGTA;
timersol; glucocorticoesteróides que incluem dexametasona e
prednisolona; e agentes anti-inflamatórios não esteróides que

incluem indometacina e naproxeno.

Esteróides livres, principalmente colesterol, contam por 20-25% dos lípidos epiteliais em peso. A enzima que limita a taxa na biosínteses de colesterol é a reductase de 3-hidroxi-3-metilglutarilo (HMG) CoA. Inibidores de síntese de colesterol para uso dentro dos métodos e composições da invenção incluem, mas não se limitam a, inibidores competitivos de reductase CoA (HMG), tal como sinvastatina, lovastatina, fluindostatina (fluvastatina), pravastatina, mevastatina, assim como também outros inibidores de reductase CoA HMG, tais como oleato de colesterol, sulfato de colesterol e fosfato, e esteróis oxigenados, tais como colesterol 25-OH-- e 26-OH--; inibidores de sintetase escualeno; inibidores de epoxidasa escualeno; inibidores de reductase DELTA7 ou DELTA24, tais como 22,25-diazacolesterol, 20,25-diazacolestenol, AY9944, e triparanol.

Cada um dos inibidores da síntese de ácido gordo ou inibidores de síntese de colesterol, podem ser coordenadamente administrados ou combinatorialmente formulados com um ou mais GRP, análogos e miméticos, e outros agentes biologicamente ativos descritos aqui, para conseguir penetração epitelial melhorada dos agentes ativos. Um intervalo de concentração efetivo para o inibidor de colesterol numa formulação terapêutica ou adjunta para administração mucosal é em geral, desde aproximadamente 0.0001% até aproximadamente 20% em peso do total, mais tipicamente desde aproximadamente 0.01% até aproximadamente 5%.

Agentes Doadores de Óxido Nítrico e Métodos

Dentro de outros aspectos relacionados com a invenção, um doador de óxido nítrico (NO) se selecciona como um agente que intensifica a penetração da membrana biológica para melhorar a administração epitelial de um ou mais GRP,

análogos e miméticos e outros agentes biologicamente ativos descritos aqui. Vários doadores de NO conhecem-se na arte e são empregues em concentrações efetivas dentro dos métodos e formulações da invenção. Doadores NO exemplares incluem, mas
 5 não se limitam a, nitroglicerina, nitroprúcido, NOC5 [3-(2-hidroxi-1-(metil-etil)-2-nitrosohidrazino)-1-propanamina], NOC12 [N-etil-2-(1-etil-hidroxi-2-nitrosohidrazino)-etanamina], SNAP [S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina], NOR1 e NOR4. Dentro dos métodos e composições da invenção, uma
 10 quantidade efetiva de um doador NO seleccionado é coordenadamente administrada ou combinatorialmente formulada com um ou mais GRP, análogos e miméticos, e/ou outros agentes biologicamente ativos descritos aqui, em ou através do epitélio.

15 Agentes para Modular a Estrutura de União Epitelial e/ou Fisiologia

A presente invenção proporciona composições farmacêuticas que contêm um ou mais GRP, análogos ou miméticos, e/ou outros agentes biologicamente ativos em
 20 combinação com agentes que intensificam a administração epitelial descritos aqui formulados numa preparação farmacêutica para a administração epitelial.

O agente permeabilizante reversivelmente intensifica o transporte paracelular epitelial mucosal, tipicamente modulando a estrutura de união epitelial e/ou fisiologia numa superfície epitelial mucosal no sujeito. Este efeito engloba tipicamente a inibição pelo agente permeabilizante de ligação homotípico ou heterotípico entre
 25 as proteínas adesivas da membrana epitelial de células epiteliais vizinhas. As proteínas alvo para este bloqueio de ligação homotípico ou heterotípico podem ser seleccionadas de várias moléculas de adesão de união relacionadas (JAMs), ocludinas, ou claudinas. Exemplos destas são anticorpos,
 30

fragmentos de anticorpo ou anticorpos de cadeia única que se ligam nos domínios extracelulares destas proteínas.

Nas modalidades detalhadas adicionais, a invenção proporciona peptídeos permeabilizantes e análogos peptídicos e miméticos para melhorar o transporte paracelular epitelial mucosal. Os peptídeos sujeito e análogos peptídicos e miméticos, tipicamente funcionam dentro das composições e métodos da invenção modulando a estrutura de união epitelial e/ou fisiologia num sujeito animal. Em certas modalidades, os peptídeos e análogos peptídicos e miméticos inibem efetivamente a ligação homotípico e/ou heterotípico de uma proteína adesiva da membrana epitelial, seleccionada de uma molécula de adesão de união (JAM), ocludina, ou claudina.

Um de tais agentes que têm sido extensivamente estudados é a toxina bacterial da *Vibrio cholerae* conhecida como a "toxina zonula occludens" (ZOT). Esta toxina medeia a permeabilidade mucosal intestinal aumentada e causa sintomas de doença que incluem diarreia em sujeitos infectados. Fasano, et para ou, *Proc. Nat. Acad. Sci., O.U.S.A.* 8:5242-5246, 1991. Quando se testa na mucosa ileal de coelho, a ZOT incrementa a permeabilidade intestinal modulando a estrutura de uniões herméticas intercelulares. Mais recentemente, verificou-se que a ZOT é capaz de abrir reversivelmente uniões herméticas na mucosa intestinal. Também reportou-se que que a ZOT é capaz de abrir reversivelmente uniões herméticas na mucosa nasal. Patente Estadounidense Não. 5,908,825.

Dentro dos métodos e composições da invenção, ZOT, assim como também vários análogos e miméticos de ZOT que funcionam como agonistas e antagonistas da actividade ZOT, são empregues para intensificar a administração nasal de agentes biologicamente ativos - aumentando a absorção paracelular em e através da mucosa nasal. Neste contexto, ZOT

tipicamente actua causando uma reorganização estrutural de uniões herméticas marcadas por localização alterada de proteína de união ZO1. Dentro destes aspectos da invenção, ZOT é coordenadamente administrado ou combinatorialmente formulado com o agente biologicamente ativo numa quantidade efetiva para proporcionar absorção significativamente melhorada do agente ativo, aumentando reversivelmente a permeabilidade da mucosa nasal sem efeitos colaterais substanciais adversos.

10 Agentes Vasodilatadores e Métodos

Após outra classe de agentes que promovem a absorção que mostram utilidade benéfica dentro da administração coordenada e métodos de formulação combinatorial e composições da invenção estão, compostos vasoativos, mais especificamente vasodilatadores. Estes compostos funcionam dentro da invenção para modular a estrutura e fisiologia da vasculatura submucosal, aumentando a taxa de transporte de GRP, análogos e miméticos e outros agentes biologicamente ativos ou através do epitélio e/ou tecidos alvo específicos ou compartimentos (por exemplo, o sistema nervoso central ou circulatório sistémico).

Agentes vasodilatadores para uso dentro da invenção, tipicamente causam relaxamento dos vasos sanguíneos submucosais devido a um decréscimo no cálcio citoplasmático, um aumento no óxido nítrico (NO) ou inibindo a síntese da cadeia longa de miosina. Em geral, dividem-se em 9 classes; antagonistas do cálcio, abridores do canal do potássio, inibidores ACE, antagonistas do receptor da angiotensina-II, antagonistas do receptor α -adrenérgico e imidazol; agonistas β 1-adrenérgicos, inibidores da fosfodiesterase, e icosanóides e doadores de NO.

Devido às diferenças químicas, as propriedades farmacocinéticas dos antagonistas do cálcio são similares. A

absorção na circulação sistémica é alta, e estes agentes por isso, submetem-se a um metabolismo considerável de primeira passagem pelo fígado, resultando em variação individual na farmacocinética. Excepto pelos fármacos mais novos do tipo dihidropiridina (amlodipina, felodipina, isradipina, nilvadipina, nisoldipina e nitrendipina), a vida média dos antagonistas do cálcio é curta. Por isso, manter uma concentração de fármaco efetiva para muitos destes, pode requerer administração por dosagem múltipla, ou formulações de libertação controlada, como se descreve noutra parte aqui. O tratamento com abridor do canal de potássio minoxidil, pode também ser limitado em maneira e nível de administração devido a efeitos colaterais potenciais adversos.

Inibidores do ACE previnem a conversão da angiotensina-I em angiotensina-II, e são mais efetivos quando a produção de renina aumenta. Dado que o ACE é idêntico à cinase-II, a qual inactiva o vasodilatador endógeno potente, bradiquinina, a inibição do ACE causa uma redução na degradação de bradiquinina. Os inibidores ACE proporcionam a vantagem agregada de efeitos cardioprotectores e cardioreparadores, prevenindo e invertendo a fibrose cardíaca e hipertrofia ventricular em modelos animais. A trajectória de eliminação predominante da maioria dos inibidores ACE é através excreção renal. Portanto, a deterioração renal está associada à eliminação reduzida e uma redução de dosificação de 25 a 50% é recomendada em pacientes com deterioração renal moderada a severa.

Com respeito a doadores NO, estes compostos são particularmente úteis dentro da invenção pelos seus efeitos adicionais na permeabilidade mucosal. Além disso dos doadores NO notados anteriormente, complexos de NO com nucleófilos chamados NO/nucleófilos, ou NONOatos, espontaneamente e não enzimaticamente libertam NO quando se dissolvem em solução

aquosa de pH fisiológico. Pelo contrário, os nitro vasodilatadores tais como nitroglicerina, requerem actividade enzimática específica para libertação de NO. Os NONOatos libertam NO com uma estequiometria definida e a taxas previsíveis variando desde <3 minutos para dietilamina/NO até aproximadamente 20 horas para dietilentriamina/NO (DETANO).

Com certos métodos e composições da invenção, um agente vasodilatador seleccionado é coordenadamente administrado (por exemplo, sistémicamente ou intranasalmente, simultaneamente ou em associação temporal combinatorialmente efetiva) ou combinatorialmente formulado com um ou mais GRP, análogos e miméticos e outros agentes biologicamente ativos numa quantidade efetiva para intensificar a absorção da mucosa dos agentes ativos para alcançar um tecido alvo ou compartimento no sujeito (por exemplo o fígado, veia portal hepática, tecido ou fluido do CNS, ou plasma do sangue).

Agentes Selectivos que Intensificam o Transporte e Métodos

As composições e métodos de administração da invenção, opcionalmente incorporam um agente que intensifica o transporte selectivo, que facilita o transporte de um ou mais agentes biologicamente ativos. Estes agentes que intensificam o transporte podem ser empregues numa formulação combinatorial ou protocolo de administração coordenado com um ou mais dos GRP, análogos e miméticos descritos aqui, para administrar coordenadamente um ou mais agentes biologicamente ativos adicionais através das barreiras de transporte da membrana biológica, para melhorar a administração epitelial dos agentes ativos para alcançar um tecido objetivo ou compartimento na sujeito (por exemplo, o epitélio mucosal, fígado, tecido ou fluido CNS ou plasma do sangue). Alternativamente, os agentes que intensificam o transporte podem ser empregues num protocolo de administração coordenada ou formulação combinatorial para intensificar directamente a

administração epitelial de um ou mais dos GRP, análogos e miméticos, com ou sem administração intensificado de um agente biologicamente ativo adicional.

Agentes que intensificam o transporte selectivo para uso dentro deste aspecto da invenção incluem, mas não se limitam a, glicósidos, moléculas que contêm açúcar, e agentes de ligação tais como agentes de ligação de lectina, os quais são conhecidos por interactuar especificamente com os componentes do transporte de barreira epitelial. Por exemplo, ligandos "bioadesivos específicos, incluem várias lectinas de plantas e bacterianas, as quais se ligam às porções de açúcar da superfície celular por interações mediadas por um receptor, podem ser empregues como portadores ou mediadores de transporte conjugados para melhorar a administração nasal, por exemplo, mucosal de agentes biologicamente ativos dentro da invenção. Certos ligandos bioadesivos para uso dentro da invenção, mediarán a transmisión de señales biológicas a células epiteliais objetivo que activan a absorção selectiva do ligando adesivo por processos de transporte celular especializado (endocitose a transcitose). Estes mediadores de transporte podem portanto, ser empregues como um "sistema portador" para estimular ou dirigir a absorção selectiva de um ou mais GRP, análogos e miméticos e outros agentes biologicamente ativos em e/ou através do epitélio mucosal. Estes e outros agentes que intensificam o transporte selectivo, intensificam significativamente a administração epitelial de biofármacos macromoleculares (particularmente peptídeos, proteínas, oligonucleótidos e vectores de polinucleótido) com a invenção. As lectinas são proteínas de planta que se ligam a açúcares específicos encontrados na superfície de glicoproteínas e glicolípidos de células eucarióticas. As soluções concentradas de lecitinas têm um efeito "mucoatractivo" e vários estudos têm demonstrado

endocitose mediada por um receptor rápido (RME) de lectinas e conjugados de lectinas (por exemplo, concavalina conjugada com partículas de ouro coloidal) através das superfícies mucosas. Estudos adicionais têm reportado que os mecanismos de absorção para lectinas, podem ser utilizados para dirigir o fármaco intestinal *in vivo*. Em certos destes estudos, as nanopartículas de poliestireno (500 nm), foram covalentemente acopladas a lectina de tomate e os rendimentos reportados melhoram a absorção sistêmica depois da administração oral a ratas.

Além disso as lectinas de plantas, os factores de invasão e adesão microbiana proporcionam uma fonte rica de candidatos para uso como portadores de transporte adesivo/selectivo dentro dos métodos de administração mucosal e composições da invenção. Dois componentes são necessários para os processos de aderência bacteriana, uma "adesina" bacteriana (aderência ou factor de colonização) e um receptor na superfície e célula hospedeira. As bactérias que causam infecciones mucosas necessitam penetrar a capa mucosa antes de unir as mesmas à superfície epitelial. Esta união é usualmente mediada por fibrinas bacterianas ou estruturas do pílus, ainda outros componentes da superfície celular também podem tomar parte no processo. As bactérias aderentes colonizam o epitélio mucosal por multiplicação e iniciação de uma série de reações bioquímicas dentro de célula alvo através dos mecanismos de transdução de sinal (com ou sem ajuda de toxinas). Associados com estes mecanismos invasivos, uma ampla diversidade de proteínas bioadesivas (por exemplo, invasiva, internalina), produzidas originalmente por várias bactérias e vírus, conhecem-se. Estas permitem a união extracelular de tais microorganismos com uma selectividade impressionante para espécies hospedeiras e após tecidos particulares alvo. Os sinais transmitidos por tais interações

de receptor-ligando, activam o transporte de microorganismos
vivos, intactos em, e eventualmente através das células
epiteliais por processos endo e transcitóticos. Tais
fenómenos que se originam naturalmente, podem ser endurecidos
5 (por exemplo, formando complexos de agentes biologicamente
ativos tais como GRP com uma adesina), em conformidade com os
ensinamentos aqui descritos para administração melhorada de
compostos biologicamente ativos em ou através de uma membrana
biológica e/ou a outros sítios alvo designados para ação do
10 fármaco.

Várias toxinas de plantas e bacterianas que se
ligam às superfícies epiteliais numa maneira similar a
lectina, específica, também são empregues dentro dos métodos
e composições da invenção. Por exemplo, a toxina difteria
15 (DT) entra nas células hospedeiras rapidamente por RME. Do
mesmo modo, a subunidade B da toxina lábil para o calor de *E.*
coli, liga-se no limite da cúpula das células epiteliais
intestinais numa maneira similar à lectina, altamente
específica. A absorção desta toxina e transcitose para o lado
20 basolateral dos enterócitos, foi reportada *in vivo* ou *in*
vitro. Outros investigadores expressaram o domínio da
transmembrana da toxina da difteria em *E. coli* como uma
proteína de fusão de ligação a maltose e acoplada
quimicamente à poli-L-lisina de alto peso molecular. O
25 complexo resultante é empregue com êxito para mediar a
internalização de um gene reporter *in vitro*. Além disso
destes exemplos, a *Staphylococcus aureus* produz uma série de
proteínas (por exemplo, enterotoxina estafilococal A (SEJA),
SEB, toxina 1 de síndrome de apoplexia tóxica (TSST-1), a
30 qual actua tanto como superantígenos e toxinas. Estudos que
referem a estas proteínas têm reportado transcitose
facilitada dependente de dose de SEB e TSST-1 em células
Caco-2.

A hemaglutinina viral contém outro tipo de agente de transporte para facilitar a administração mucosal de agentes biologicamente ativos dentro dos métodos e composições da invenção. A etapa inicial em muitas infecções virais é a ligação de proteínas da superfície (hemaglutininas) a células mucosas. Estas proteínas de ligação foram identificadas por muitos vírus, que incluem rotavírus, vírus de varicela zoster, vírus do bosque Semliki, adenovírus, e reovírus. Estas e outras hemaglutininas exemplares se podem empregar numa formulação combinatorial (por exemplo, uma mistura ou formulação de conjugado) ou protocolo de administração coordenada com um ou mais dos GRP, análogos e miméticos descritos aqui, para intensificar coordenadamente a administração mucosal de um ou mais agentes biologicamente ativos adicionais. Alternativamente, as hemaglutininas virais podem ser empregues numa formulação combinatorial ou protocolo de administração coordenada para intensificar directamente a administração mucosal de um ou mais GRP, análogos e miméticos, com ou sem administração intensificada de um agente biologicamente ativo adicional.

Uma variedade de factores que medeiam ou transporte, selectivos, também estão disponíveis para uso dentro da invenção. As células do mamífero desenvolveram uma classificação de mecanismos para facilitar a internalização do substratos específicos e dirigidos a estes compartimentos definidos. Colectivamente, este processo de deformações da membrana é chamado "endocitose" e compreende a fagocitose, pinocitose, endocitose mediada por um receptor (RME mediada por clatrina), e potocitose (RME mediada não por clatrina). A RME é um processo biológico celular altamente específico pelo qual, como o seu nome implica, vários ligandos se ligam aos receptores da superfície celular e são subsequentemente internalizados e traficados dentro da célula. Em muitas

células, os processos de endocitose são activados assim que a superfície da membrana completa é internalizada e substituída em menos de meia hora. Duas classes de receptores são propostos baseados na sua orientação na membrana celular; no
5 terminal amino dos receptores Tipo I, está localizado no lado extracelular da membrana, enquanto os receptores Tipo II, têm este mesmo extremo de proteína no contorno intracelular.

Todavia outras modalidades da invenção utilizam transferrina como um portador ou estimulante de RME de
10 agentes biologicamente ativos epitelialmente administrados. A transferrina, uma glicoproteína de transporte de ião de 80 kDa, é eficientemente tomada em células por RME. Os receptores de transferina encontram-se na superfície da maioria das células proliferantes, em números elevados em
15 eritroblastos e em muitas classes de tumores. A transcitose de transferrina (Tf) e a conjugação de transferrina, segundo se reporta, são intensificadas na presença de Brefeldinã (BFA), um metabolito fúngico. Noutros estudos, ou tratamento de BFA foi reportado por incrementar rapidamente a endocitose
20 apical tanto da resina como HRP em células MDCK. Deste modo, BFA e outros agentes que estimulam ou transporte mediado por um receptor, podem ser empregues com os métodos da invenção como formulados combinatorialmente (por exemplo, conjugados) e/ou agentes coordenadamente administrados para melhorar ou
25 transporte mediado por um receptor de agentes biologicamente ativos, que incluem, GRP, análogos e miméticos.

Métodos e Veículos de Entrega Polimérica

Dentro de certos aspectos da invenção, ou GRP,
30 análogos e miméticos, outros agentes biologicamente ativos aqui descritos e os agentes potenciadores da entrega como descritos acima, são, individualmente ou combinados, incorporados dentro de uma formulação administrada

epitelialemente (por exemplo nasalmente) que inclui um polímero biocompatível a funcionar como transportador ou base. Tais transportadores de polímeros incluem pós poliméricos, matrizes ou veículos de entrega de microparticulas, entre outras formas de polímeros. OU polímero pode ser de origem vegetal, animal ou sintética. Muitas vezes o polímero é cruzado. Adicionalmente, nestes sistemas de entrega ou GRP, análogo ou mimético, pode ser funcionalizado de forma que possa ser ligado covalentemente ao polímero e tornado inseparável do polímero por simples washing. Em outras materializações, o polímero é modificado quimicamente com um inibidor enzimático ou outros agentes que possam degradar ou inactivar ou(s) agente(s) biologicamente ativo(s) e/ou agente(s) potenciador(é) da entrega. Em certas formulações, o polímero é parcial ou completamente insolúvel em água mas solúvel num polímero da água, por exemplo, um hidrogel. Os polímeros úteis neste aspecto da invenção são desejavelmente interativos com a água e/ou hidrofílicos por natureza para absorver quantidades significativas de água, e estes muitas vezes formam hidrogéis quando colocados em contacto com a água ou meios aquosos por um período de tempo suficiente para alcançar o equilíbrio com a água. Em materializações mais detalhadas, o polímero é um hidrogel que, quando colocado em contacto com água em excesso, absorve pelo menos duas vezes o seu peso em água em equilíbrio quando exposto à água à temperatura ambiente. Patente E.U.A N° 6 004 583.

Os sistemas de entrega de fármacos baseados em polímeros biodegradáveis são preferidos em muitas aplicações biomédicas porque estes sistemas são quebrados ou por hidrólise ou por reação enzimática em moléculas não tóxicas. A taxa de degradação é controlada manipulando a composição da matriz do polímero biodegradável. Estes tipos de sistemas

pode por isso ser empregues em certas situações para libertação a longo prazo de agentes biologicamente ativos. Os polímeros biodegradáveis como o ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), e ácido poli(D,L- ácido
5 láctico-co- ácido glicólico) (PLGA), receberam atenção considerável como possíveis transportadores para entrega do fármaco, uma vez que os produtos de degradação destes polímeros têm baixa toxicidade. Durante a normal função metabólica do corpo estes polímeros degradam-se em dióxido de
10 carbono e água. Estes polímeros exibiram também excelente biocompatibilidade.

Para prolongar a actividade biológica do GRP, análogos e mimética, e outros agentes biologicamente ativos aqui indicados, assim como agentes potenciadores da entrega
15 opcionais, estes agentes podem ser incorporados em matrizes poliméricas, por exemplo, poliortoésteres, polianidridos, ou poliésteres. Isto acarreta actividade e libertação sustentada do(s) agente(s) ativo(s), por exemplo, como determinado pela degradação da matriz polimérica. Embora a encapsulação de
20 moléculas bioterapêuticas dentro de polímeros sintéticos possa estabilizá-los durante o armazenamento e entrega, o maior obstáculo da tecnologia de libertação baseada em polímeros é a perda da actividade das moléculas terapêuticas durante os processos de formulação que muitas vezes envolvem
25 calor, sonicação ou solventes orgânicos.

Os polímeros promotores da absorção contemplados para utilização com a invenção podem ser derivados e versões química ou fisicamente modificadas dos tipos de polímeros expostos, além de outros polímeros sintéticos ou de origem
30 natural, gomas, resinas, e de outros agentes, bem como misturas desses uns com os outros materiais ou outros polímeros, desde que as alterações, modificações ou misturas não afectem negativamente as propriedades desejadas, tais

como a absorção da água, formação de hidrogel, e / ou estabilidade química para aplicação útil. De uma forma mais detalhada nos aspectos da invenção, polímeros tais como nylon, acrylan e outros polímeros sintéticos normalmente
 5 hidrofóbicos podem ser suficientemente modificados por reação para se tornarem solúveis em água e / ou de forma estável géis em meio aquoso.

Os polímeros promotores da absorção da invenção podem incluir ou grupo de polímeros de homo-e copolímeros
 10 baseados em várias combinações dos seguintes monómeros de vinilo: ácido acrílico e metacrílico, acrilamida, metacrilamida, hidroxiethylacrilato ou metacrilato, vinilpirrolidonas, bem como álcool polivinílico e os seus co-
 - E terpolímeros, polivinilacetato, e os seus co-terpolímeros
 15 com os acima listados monómeros e). Muito úteis são os copolímeros do ácido acrilamido-2-2-metil-propanosulfónico (AMPS®) dos acima listados monómeros com monómeros funcionais co-polimerizáveis, tais como acril ou metacrilamida-acrilato ou metacrilato ésteres onde os grupos éster ou são derivados de
 20 cadeia ramificada alquil, aril tendo até quatro anéis aromáticos que possam conter substituintes alquila de 1 a 6 carbonos; esteróides, sulfatos, fosfatos ou monómeros catiónicos tais como N, N-dimetilaminoalquil (métodos) acrilamida, dimetilaminoalquil (métodos) acrilato, (métodos)
 25 cloreto de acriloxialquilltrimetilamónio, (métodos) cloreto de acriloxialquildimetilbenzil damónio.

Os polímeros promotores de absorção adicional para utilização no âmbito são aqueles classificados como dextrans, dextrans e, a partir da classe de materiais classificados
 30 como gomas e resinas naturais, ou a partir da classe de polímeros naturais como processado colágeno, quitina, quitosana, pullulan, zooglan, alginatos e alginatos modificados como "Kelcoloid" (um polipropilenoglicol

modificado alginato), gomas gellan gengivas, como "Kelocogel", gomas Xanathan, como "Keltrol", estastin, alfa hidroxibutirato e seus copolímeros, ácido hialurônico e seus derivados, e ácido polilático ácido glicólico.

5 Uma classe muito útil de polímeros aplicáveis no âmbito da invenção instantânea são ácidos carboxílicos olefinicamente insaturados contendo pelo menos uma ligação olefínica dupla carbono-carbono activada, e, pelo menos, um grupo carboxilo; isto é, um grupo funcional ou ácido
10 facilmente convertido num ácido contendo uma ligação dupla olefínica que funciona prontamente na polimerização por causa da sua presença na molécula monómero, quer no alfa-beta posição no que diz respeito a um grupo carboxilo, ou como parte de um agrupamento terminal de metileno. Os ácidos
15 olefinicamente insaturados desta classe incluem materiais tais como ou próprio ácido acrílico, ácido alfa cianoacrílico, ácido beta metilacrílico (ácido crotónico), ácido alfa fenilacrílico, ácido betacrilóxiopropiônico, ácido cinâmico, ácido p-cloro cinâmico, Carboximetilcelulose 1-
20 fenil-4-butadieno-1, 3, Ácido itacónico, ácido citracónico, ácido mesacónico, ácido glutacónico, ácido aconítico, ácido maleico, ácido fumárico, e tricarboxietileno. Tal como aqui utilizadas, ou termo "ácidos carboxílicos" inclui os ácidos policarboxílicos e os anidridos de ácido, como anidrido
25 maleico, onde ou grupo anidrido é formado pela iminação de uma molécula de água dos dois grupos carboxilo localizados na mesma molécula de ácido carboxílico.

Os acrilatos representativos úteis como agentes promotores da absorção no âmbito da invenção incluem metil
30 acrilato, Acrilato de etilo, propilo acrilato, acrilato isopropílico, butilo acrilato, acrilato isobutílico, metacrilato de metilo, etacrilato de metilo, etilo metacrilato, octil acrilato, heptil acrilato, octil

metacrilato, metacrilato isopropílico, 2-etilhexil metacrilato, nonil acrilato, hexil acrilato, n-hexilo metacrilato, e similares. Ésteres alquil acrílico superiores são decil acrilato, isodecil metacrilato, lauril acrilato, 5 estearil acrilato, behenil acrilato e melissil acrilato e versões metacrilato do mesmo. As misturas de dois ou três ou mais ésteres de cadeia longa podem ser polimerizadas com sucesso com um dos monômeros carboxílicos. Outros co-monômeros incluem as olefinas, incluindo alfa olefinas, vinil 10 éteres, ésteres de vinilo, e suas misturas.

Outros monômeros vinilideno, incluindo os nitrilos acrílicos, podem também ser usados como agentes promotores da absorção no âmbito dos métodos e composições da invenção para reforçar a difusão e a absorção de um ou mais GRP, análogos e 15 miméticos, e outro(s) agente(s) biologicamente ativo(s), inclusive para reforçar a entrega do(s) agente(s) ativo(s) para um tecido alvo ou num compartimento do indivíduo (por exemplo, ou fígado, veia portal hepática, tecidos ou fluidos CNS, ou plasma sanguíneo). Os nitrilos alfa beta- 20 olenificamente insaturados úteis são preferencialmente nitrilos mono-olenificamente insaturados contendo de 3 a 10 átomos de carbono, tais como acrilonitrila, metacrilonitrila, e similares. Os preferidos são acrilonitrilo e metacrilonitrilo. Amidas acrílicas contendo de 3 a 35 átomos 25 de carbono incluindo amidas insaturadas mono-olefinicamente também podem ser utilizadas. As amidas representativas incluem acrilamida, metacrilamida, Nt-butil acrilamida, N-ciclohexil acrilamida, alquil amidas superiores, onde o grupo alquilo no nitrogênio contém de 8 a 32 átomos de 30 carbono, amidas acrílica incluindo n-alquilol amidas de ácidos alfa carboxílicos beta-olenificamente insaturados, incluindo aqueles que têm de 4 a 10 átomos de carbono, tais como N-metilol acrilamida, N-propanol acrilamida, N-metilol

metacrilamida, N-metilol maleimida, ésteres do ácido N-metilol maleâmico, N-metilol-p-vinil benzamida, e similares.

Materiais de promotores de absorção ainda mais úteis são as alfa-olefinas contendo de 2 a 18 átomos de carbono, mais preferencialmente a partir de 2 a 8 átomos de carbono; dienes contendo de 4 a 10 átomos de carbono; vinil ésteres e alilo ésteres tais como ou acetato de vinilo; vinil aromáticos tais como estireno, metil estireno e cloroestireno; vinil e alilo éteres e cetonas tais como vinil e éter metil vinil cetona; cloroacrilatos; cianoalquil acrilatos como alfa-cianometil acrilato, e os alfa-, beta e gama-cianopropil; alcoxiacrilatos como metoxi etil acrilato; haloacrilatos como cloroetil acrilato; halogenetos vinil e cloreto de vinilo, cloreto vinilideno e similares; divinilos, diacrilatos e outros monómeros polifuncionais, tais como divinyl éter, diacrilato dietilenoglicol, etileno glicol dimetacrilato, metileno-bis-acrilamida, alilpentaeritritol, e similares; e bis(beta-haloalquil) alquenil fosfonatos como bis(beta-cloroetil) vinil fosfonato e similares como são conhecidos por aqueles competentes na tecnologia. Copolímeros onde ou monômero contendo carboximetilcelulose é um componente menor, e os outros monômeros vinilideno presentes como principais componentes são facilmente preparados de acordo com os métodos aqui divulgados.

Quando são aplicados hidrogéis como agentes promotores da absorção no âmbito da invenção, estes podem ser compostos de copolímeros sintéticos a partir do grupo de ácidos acrílico e metacrílico, acrilamida, metacrilamida, hidroxietilacrilato (HEA) ou metacrilato (HEMA), e vinilpirrolidonas que interagem com a água e são solúveis. Exemplos ilustrativos específicos de polímeros úteis, especialmente para entrega de peptídeos ou proteínas, são os seguintes tipos de polímeros: (met) acrilamida e 0,1 a 99 WT.

% , ácido (met)acrílico; (met)acrilamidas e peso 0,1-75% wt., cloreto (met)acriloxietil trimetilamônio; (met)acrilamida e 0,1 75% wt. (met)acrilamida; ácido acrílico e peso 0.1-75% alquil (met)acrilatos ; (met)acrilamida e 0.1-75 wt.

5 AMPS.RTM%. (marca registrada da Lubrizol Corp); (met)acrilamida e de 0 a 30% peso alquil (met)acrilamidas e peso 0.1-75% AMPS.RTM.; (met)acrilamida e 0.1-99 WT. HEMA%; (met)acrilamida e 0,1 a 75% HEMA peso e de 0,1 a 99% ácido (met)acrílico; e de ácido (met)acrílico 0.1-99 peso% HEMA;

10 50% vinil éter e 50% mole danidrido maleico; (met)acrilamida e 0,1% a 75 peso cloreto de (met)acriloxialqui dimetil benzilamônio; (met) acrilamida e 0,1 a 99% peso vinil pirrolidona; (met)acrilamida e 50% vinil pirrolidona peso e peso 0.1-99.9% ácido (met)acrílico; ácido (met)acrílico e de

15 0,1 a 75% AMPS.RTM peso. 0.1-75% e peso alquil (met)acrilamida. Nos exemplos acima, alquil significa C1 a C30, de preferência C1 a C22, linear e ramificada e C4 a C16 cíclica; onde (met) é utilizado, isso significa que os monômeros com e sem ou grupo metil estão incluídos. Outros

20 polímeros de hidrogel solúvel muito úteis, mas são versões de poli (vinil pirrolidona) amido, carboximetil celulose e álcool polivinílico.

Materiais adicionais de hidrogel polimérico úteis no âmbito da invenção incluem (poli)hidroxialquil

25 (met)acrilato: hidrogéis aniônicos e catiónicos: complexos poli(eletrólito); álcoois polivinílicos, com um resíduo de acetato baixo: mistura solúvel de agar e carboximetil celulose : uma composição solúvel que inclua metil celulose misturada com um agar crosslinked; co-polímero solúvel em

30 água produzido por uma dispersão de um copolímero finamente dividido danidrido maleico com estireno, etileno, propileno, ou isobutileno; um polímero solúvel em água de N-vinil lactâmicos; sais de sódio solúveis de carboximetilcelulose; e

similares.

Outros polímeros de retenção e absorventes de fluido, gelificáveis empregues para formar o hidrogel hidrofílico para a administração mucosal de agentes biologicamente ativos dentro da invenção incluem pectina; polissacáridos tais como agar, acácia, karaya, tragacanto, e guar e suas versões reticuladas; polímeros de ácido acrílico, copolímeros e derivados de sais, poliacrilamida; polímeros de anidrido indol maleico expansíveis em água; copolímeros de enxerto de milho; polímeros e copolímeros de tipo acrilato com capacidade de absorção de água de aproximadamente 2 até 400 vezes o seu peso original; diésteres de poliglucano; uma mistura de poli(vinilalcohol) reticulado e poli(N-vinil-2-pirrolidona); geles de copolímero de bloqueio de polibutilen-poli-etileno; goma de carob; geles de poliéster; geles de poliureia; geles de poliéter; geles de poliamida; geles de poliimida; geles de polipéptido; geles de poliaminoácido; geles policelulósicos; polímeros dacrilato anidrido maleico-indeno reticulados; e polisacáridos.

Polímeros de hidrogel sintético para uso dentro da invenção podem fazer-se por uma combinação infinita de vários monómeros em várias proporções. O hidrogel pode ser reticulado e em geral, possui a capacidade para reter e absorver fluido e expandir-se ou inchar para um estado de equilíbrio ampliado. Os hidrogéis tipicamente incham ou expandem depois da administração à superfície mucosal nasal, absorvendo aproximadamente 2-5, 5-10, 10-50 até 50-100 ou mais vezes o dobro do seu peso d'água. O grau óptimo de expansibilidade para um hidrogel será determinado por diferentes agentes biologicamente ativos, dependendo de tais factores como peso molecular, tamanho, solubilidade e características de difusão do agente ativo transportado ou preso ou encapsulado dentro do polímero, e o espaçamento

específico e movimento de cadeia cooperativa associado com cada polímero individual.

Os polímeros hidrofílicos empregues com a invenção são solúveis em água mas expansíveis em água. Tais polímeros
5 expansíveis em água são como tipicamente se refere a hidrogéis ou geles. Tais geles podem ser convenientemente produzidos a partir de polímero solúvel em água pelo processo de reticulação dos polímeros por um agente de reticulação adequado. Não obstante, os hidrogéis estáveis podem também
10 ser formados a partir de polímeros específicos sob condições definidas de pH, temperatura e/ou concentração iônica, e conformidade com os métodos conhecidos na arte. Tipicamente, os polímeros são reticulados, isto é, reticulados na magnitude de que os polímeros possuem boas propriedades
15 hidrofílicas, têm integridade física melhorada (comparada com polímeros não reticulados do mesmo ou similar tipo) e exibem capacidade melhorada para reter dentro da rede de gel tanto o agente biologicamente ativo de interesse como os compostos adicionais para coadministração junto com estes, tais como
20 citocina ou inibidor de enzima, assim como retêm a capacidade para libertar os agentes ativos, no tempo e local adequados.

Em geral, os polímeros de hidrogel para uso com a invenção são reticulados com uma reticulação di-funcional na quantidade desde 0.01 até 25% em peso, baseado no peso dos
25 monómeros que formam o copolímero, e mais preferivelmente, desde 0.1 até 20 por cento em peso e mais frequentemente desde 0.1 até 15 por cento em peso do agente reticulante. Outra quantidade útil de um agente de reticulação é 0.1 a 10 por cento em peso. Agentes de reticulação multifuncional
30 tri, tetra ou superiores, podem também ser empregues. Quando tais reagentes são utilizados, quantidades inferiores podem ser requeridas para conseguir a densidade de reticulação equivalente, isto é, o grau de reticulação ou propriedades

de rede que são suficientes para conter efetivamente os agentes biologicamente ativos.

Os reticulantes podem ser ligações covalentes, iônicas ou hidrogênio com o polímero que possui a capacidade para expandir-se na presença de fluidos que contém água. Tais reticuladores e reações de reticulação são conhecidas por aqueles peritos na técnica e em muitos casos, são dependentes do sistema polimérico. Deste modo, uma rede reticulada pode ser formada por copolimerização de radical livre de monómeros insaturados. Os hidrogéis poliméricos também podem ser formados reticulando polímeros preformados fazendo reagir grupos funcionais encontrados nos polímeros, tais como álcoois, ácidos, aminas com tais grupos como glioxal, formaldeído ou glutaraldeído, bis anidridos e similares.

Os polímeros também podem ser reticulados com qualquer polieno, por exemplo, decadieno ou trivinilciclohexano; acrilamidas tais como N,N-metilen-bis(acrilamida); acrilatos polifuncionais tais como trimetilolpropantriacrilato; ou monómero de vinilideno polifuncional que contém pelo menos, 2 grupos terminais CH_2 <, que incluem por exemplo, copolímeros de divinilbenzeno, divinilnaftleno, alilo e similares. Em certas modalidades, os monómeros de reticulação para uso na preparação dos copolímeros são polialquênilpoliéteres que têm mais de um agrupamento de alquêniléter por molécula, o qual pode opcionalmente, possuir grupos alquênilo nos quais uma ligação dupla olefínica está presente unida a um agrupamento de metileno terminal (por exemplo, feito pela eterificação de um álcool polihídrico que contém pelo menos 2 átomos de carbono e ao menos 2 grupos hidroxilo). Os compostos desta classe podem ser produzidos fazendo reagir um haluro de alquênilo, tal como cloreto dalilo ou bromuro dalilo, com

uma solução aquosa fortemente alcalina de um ou mais álcoois polihídricos. O produto pode ser uma mistura complexa de poliéteres com números variantes de grupos éter. A eficiência do agente de reticulação de poliéter incrementa
 5 com o número de grupos potencialmente polimerizáveis na molécula. Tipicamente, poliéteres que contêm um promedio de dois ou mais agrupamentos de alqueniléter por molécula, são usados. Outros monómeros de reticulação incluem por exemplo, compostos de dialil ésteres, dimetalil éteres, alil ou
 10 metalil acrilatos e acrilamidas, tetravinilsilano, polialquenilmetanos, diacrilatos e dimetacrilatos, divinilo, tais como compostos de divinilbenceno, polialilfosfato, dialiloxi e ésteres de fosfito e similares. Agentes típicos são alil pentaeritritol, alilsacarose, teimetilolpropan
 15 triacrilato, 1,6-hexandiol diacrilato, trimetilolpropandialil éter, pentaeritritol triacrilato, tetrametilen dimetacrilato, etilendiácrlato, etilendimetacrilato, trietilenglicol dimetacrilato e similares. Alilpentaeritritol, trimetilolpropan dialiléter e
 20 alil sacarose, proporcionam polímeros adequados. Quando o agente de reticulação está presente, as misturaspoliméricas usualmente contêm entre aproximadamente 0.01 até 20 por cento em peso, por exemplo, 1%, 5%, ou 10% ou mais em peso do monómero de reticulação baseado no total do monómero de
 25 ácido carboxílico, mais outros monómeros.

Em aspectos mais detalhados da invenção, a administração epitelial de GRP, análogos e miméticos e outros agentes biologicamente ativos descritos aqui, é intensificado reteniendo os agentes ativos em veículo ou
 30 portador enzimaticamente ou fisiologicamente protector de libertação lenta, por exemplo, um hidrogel que cobre o agente ativo da ação das enzimas degradativas. Em certas modalidades, o agente ativo está unido por meios químicos ao

portador ou veículo, o qual também pode ser misturado ou
unido agentes adicionais tais como inibidores de enzima,
citocinas, etc. O agente ativo pode alternativamente, ser
5 imobilizado através de trampas físicas suficientes dentro do
portador ou veículo, por exemplo, uma matriz polimérica.

Os polímeros tais como os hidrogéis empregues com
a invenção, podem incorporar agentes ligados funcionais tais
como glicósidos quimicamente incorporados no polímero para
intensificar a biodisponibilidade intranasal de agentes
10 ativos formulados junto com estes. Exemplos de tais
glicósidos são glucósidos, fructósidos, galactósidos,
arabinósidos, manósidos e seus derivados alquílicos
substituídos e glicósidos naturais tais como arbutina,
florizina, amigdalina, digitonina, saponina e indicam.
15 Existem várias formas nas quais um glicósido típico se pode
unir a um polímero. Por exemplo, o hidrogénio dos grupos
hidroxilo de um glicósido ou outro carbohidrato similar pode
ser substituído pelo grupo alquílico a partir de um polímero
de hidrogel para formar um éter. Também, os grupos hidroxilo
20 dos glicósidos podem fazer-se reagir para esterificar os
grupos carboxilo de um hidrogel polimérico para formar
ésteres poliméricos *in situ*. Outro procedimento é empregar
condensação de acetobromoglucose com colest-5-em-3beta-ol
num copolímero de ácido maleico. N-poliacrilamidas
25 substituídas podem ser sintetizadas pela reação de polímeros
activados com omega-aminoalquílglicósidos; (1) (espaçador de
carbohidrato) (n)-poliacrilamida, "pseudopolisacáridos"; (2)
(espaçador de carbohidrato) (n)-fosfatidiletanolamina(m)-
poliacrilamida, neoglicolípidos, derivados de
30 fosfatidiletanolamina; (3) (espaçador de carbohidrato) (n)-
biotina(m)-poliacrilamida. Estes derivados biotinilados
podem unir-se a lectinas na superfície mucosal para
facilitar a absorção dos agentes biologicamente ativos por

exemplo, um GRP encapsulado em polímero.

Dentro dos aspectos mais detalhados da invenção, um ou mais GRP, análogos e miméticos, e/ou outros agentes biologicamente ativos, descritos aqui, opcionalmente incluem
5 agentes ativos secundários tais como, inibidores de proteases, citocinas, moduladores adicionais de fisiologia da união intercelular, etc., são modificados e unidos a uma matriz ou portador polimérico. Por exemplo, isto pode ser realizado ligando quimicamente um agente de peptídeo ou
10 proteína ativo e modificando agentes opcionais com uma rede polimérica reticulada. Também é possível modificar quimicamente o polímero separadamente com um agente interativo tal como uma molécula que contém glicosidal. Em certos aspectos, os agentes biologicamente ativos e agentes
15 secundários ativos opcionais, podem ser funcionalizados, isto é, em donde um grupo reagente adequado é identificado ou é quimicamente agregado nos agentes ativos. Mais muitas vezes, se agrega um grupo polimerizável etilénico, e o agente ativo funcionalizado é então copolimerizado com
20 monómeros e um agente de reticulação usando um método de polimerização padrão tal como solução de polimerização (usualmente em água), emulsão, suspensão ou polimerização de dispersão. Muitas vezes, o agente funcionalizante se proporciona com uma concentração suficientemente alta de
25 grupos funcionais ou polimerizáveis para assegurar que vários sitios nos agentes ativos são funcionalizados. Por exemplo, num polipéptido que compreende 16 sitios amina, é geralmente desejado, funcionalizar ao menos, 2, 4, 5, 6 e até 8 ou mais dos sitios.

30 Depois da funcionalização, os agentes ativos funcionalizados é/são misturados com monómeros e um agente de reticulação que compreendem reagentes a partir dos quais se forma o polímero de interesse. A polimerização é então

induzida neste meio para criar um polímero que contém os agentes ativos unidos. O polímero é então combinado com água ou outros solventes adequados e de outro modo, purificados para remover impurezas rastro sem reagir e, se é necessário, 5 triturar ou romper por meios físicos tais como por agitação, forçando através de uma malha, ultrasonicação u outros meios adequados, a um tamanho de partícula desejado. O solvente usualmente água, é então removido numa maneira tal para não se desnaturalizar ou de outro modo degradar os agentes 10 ativos. Um método desejado é liofilização (secagem por congelamento), mas outros métodos estão disponíveis e podem ser usados (por exemplo, secagem por vácuo, secagem por ar, secagem por aspersão, etc.).

Para introduzir grupos polimerizáveis em 15 peptídeos, proteínas e outros agentes ativos com a invenção, é possível fazer reagir grupos reagentes amino, hidroxilo, tiol e outros disponíveis, com grupos insaturados que contêm electrófilos. Por exemplo, grupos N-hidroxi succinimidilo que contêm monómeros insaturados, carbonatos ativos, tais 20 como p-nitrofenil carbonato, triclorofenil carbonatos, trêsilato, oxicarbonilimidazoles, epóxido, isocianatos e aldeídos, e carboximetilazidas insaturadas e ortopiridil-disulfuro insaturado, pertencem a esta categoria de reagentes. Exemplos ilustrativos de reagentes insaturados 25 são alil glicidil éter, cloreto dalilo, bromuro dalilo, yoduro dalilo, cloreto dacriloilo, isocianato dalilo, cloreto dalilsulfonilo, anídrido maleico, copolímeros danídrido maleico e alil éter e similares.

Todos os derivados ativos de lisina, excepto 30 aldeído, podem em geral, reagir com outros aminoácidos tais como grupos imidazol de histidina e grupos hidroxilo de tirosina e os grupos tiol de cistina se o ambiente local intensifica a nucleofilicidade destes grupos. Os reagentes

funcionalizantes que contêm aldeído são específicos a lisina. Estes tipos de reações com grupos disponíveis de lisinas, cisteínas, tirosinas, foram extensivamente documentados na literatura e são conhecidos por aqueles peritos na técnica.

No caso de agentes biologicamente ativos que contêm grupos amina, é conveniente fazer reagir tais grupos com um cloreto daciloilo, tal como cloreto dacriloloilo, para introduzir o grupo acrílico polimerizável no agente que se faz reagir. Depois durante a preparação do polímero, tal como durante a reticulação do copolímero dacrilamida e ácido acrílico, o agente ativo funcionalizado, através dos grupos acrílicos, é unido ao polímero e chega a unir-se a este.

Em aspectos adicionais da invenção, agentes biologicamente ativos que incluem peptídeos, proteínas, nucleósidos e outras moléculas as quais são bioactivas *in vivo*, são de conjugação estabilizada unindo covalentemente um ou mais agentes ativos a um polímero que incorpora como uma parte integral do mesmo, tanto uma porção hidrofílica, por exemplo, um polialquilenoglicol linear, uma porção lipofílica (ver por exemplo, patente E.U.A No. 5,681,811). Num aspecto, um agente biologicamente ativo é covalentemente acoplado com um polímero que compreende (i) uma porção de polialquilenoglicol linear, e (ii) uma porção lipofílica, onde o agente ativo, porção de polialquilenoglicol linear, e a porção lipofílica, são conformacionalmente tornados relativos entre si, de maneira tal que o agente terapêutico ativo em uma resistência *in vivo* intensificada a degradação enzimática (isto é, relativa à sua estabilidade sob condições similares numa forma não conjugada desprovida do polímero acoplado a este). Em outro aspecto, a formulação de conjugação estabilizada numa conformação tri-dimensional que compreende o agente biologicamente ativo acoplado com um

complexo de polisorbato que compreende (i) uma porção de polialquilenglicol linear, e (ii) uma porção lipofílica, onde o agente ativo, a porção polialquilenglicol linear e a porção lipofílica, estão conformacionalmente tornadas
5 relativas entre si, de maneira tal que (a) a porção lipofílica é exteriormente disponível na conformação tri-dimensional, e (b) o agente ativo na composição numa resistência *in vivo* intensificada para degradação enzimática.

10 Num aspecto adicional relacionado, se proporciona um complexo conjugado de ligando múltiplo, o qual compreende um agente biologicamente ativo acoplado covalentemente com uma porção de estrutura de triglicérido através de um grupo espaçador de polialquilenglicol unido a um átomo de carbono
15 da porção de estrutura de triglicérido, e ao menos uma porção de ácido gordo covalentemente unida seja directamente a um átomo de carbono da porção de estrutura de triglicérido ou covalentemente unida através de uma porção espaçadora de polialquilenoglicol (ver por exemplo, Patente E.U.A No.
20 5,681,811). Em tais complexos de agentes terapêuticos conjugados de ligandos múltiplos, os átomos de carbono alfa e beta da porção bioactiva de triglicéridos, podem ter partes de ácido gordo unidas unindo covalentemente seja directamente a esta, ou indirectamente unindo covalentemente
25 a esta através de partes espaçadoras de polialquilenglicol. Alternativamente, uma porção de ácido gordo pode ser covalentemente unida seja directamente ou através de uma porção espaçadora de polialquilenoglicol nos carbonos alfa e alfa' da porção de estrutura de triglicérido, com o agente
30 terapêutico bioativo siendo covalentemente acoplado com o gama-carbono da porção de estrutura de triglicérido, seja directamente covalentemente unido a este ou indirectamente unido a este através de uma porção espaçadora de

polialquilenos. Se reconhecerá que uma ampla variedade de formas estruturais, composicionais e conformacionais são possíveis, para o complexo de agente terapêutico conjugado de ligando múltiplo que compreenda porção de estrutura de triglicérido, dentro do campo da invenção. Além disso, se nota que em tal complexo de agente terapêutico de ligando múltiplo, os agentes biologicamente ativos podem ser vantajosamente covalentemente acoplados com a porção de estrutura modificada de triglicérido através de grupos espaçadores alquilo, ou alternativamente, outros grupos espaçadores aceitáveis dentro do campo da invenção. Como se usa em tal contexto, a aceitabilidade do grupo espaçador refere-se a características de aceitabilidade específicas da aplicação de uso final, estérico e composicional.

Em alguns aspectos adicionais da invenção, se proporciona um complexo de conjugação estabilizada, o qual compreende um complexo de polisorbato que compreende uma porção de polisorbato que inclui uma estrutura de triglicérido que tem covalentemente acoplado nos átomos de carbono alfa, alfa' e beta do mesmo, grupos funcionalizantes que incluem, (i) um grupo de ácido gordo; e (ii) um grupo de polietilenoglicol que tem um agente biologicamente ativo ou porção covalentemente unida a este, por exemplo, unida a uma funcionalidade adequada do grupo polietilenoglicol. Tal ligação covalente pode ser seja directa, por exemplo, a uma funcionalidade hidroxil terminal do grupo de polietilenoglicol, ou alternativamente, a ligação covalente pode ser directa, por exemplo, tapando reactivamente o término hidroxil do grupo polietilenoglicol com um grupo espaçador de funcionalidade carboxil terminal, de maneira que o grupo polietilenoglicol tapado resultante, tem uma funcionalidade carboxil terminal na qual o agente biologicamente ativo ou porção, pode ser covalentemente

unido.

Em aspectos ainda adicionais da invenção, se proporciona um complexo estável, aquosamente solúvel, de conjugação estabilizada, o qual compreende um ou mais GRP, análogos e miméticos, e/ou outros agentes biologicamente ativos descritos aqui, covalentemente acoplados a uma porção glicolípida modificada com polietilenoglicol (PEG) fisiologicamente compatível. Em tal complexo, os agentes biologicamente ativos podem ser covalentemente acoplados à porção glicolípida modificada com PEG fisiologicamente compatível por uma ligação covalente lábil num grupo de aminoácido livre do agente ativo, onde a ligação covalente lábil é separável *in vivo* por hidrólise bioquímica e/ou proteólise. A porção glicolípida modificada com PEG fisiologicamente compatível, pode compreender vantajosamente um polímero de polisorbato, por exemplo, um grupo de éster de ácidos gordos que compreendem polímero de polisorbato, seleccionado do grupo que consiste de monopalmitato, dipalmitato, monolaurato, dilaurato, trilaurato, monoleato, dioleato, trioleato, monoestearato, diestearato e triestearato. Em tal complexo, a porção glicolípida modificada com PEG fisiologicamente compatível, pode compreender adequadamente um polímero seleccionado do grupo que consiste de polietilenglicoléteres de ácidos gordos e polietilenglicolésteres de ácidos gordos, onde os ácidos gordos por exemplo, compreendem um ácido gordo seleccionado do grupo que consiste de ácidos láurico, palmítico, oleico e esteárico.

Armazenamento de Material

Em certos aspectos da invenção, as formulações combinatoriais e/ou métodos da administração coordenados aqui, incorporam uma quantidade efetiva de peptídeos e proteínas os quais podem aderir-se a vidro carregado, com

ele, reduzindo a concentração efetiva no contentor. Os contentores assinalados por exemplo, contentores de vidro assinalados, são usados para armazenar o produto acabado para reduzir a absorção do polipéptido ou proteína num
5 contentor de vidro.

Em aspectos ainda adicionais da invenção, um kit para o tratamento de um sujeito mamífero compreende uma composição farmacêutica estável de um ou mais compostos GRP formulados para administração mucosal ao sujeito mamífero,
10 onde a composição é eficaz para aliviar um ou mais sintomas de diabetes, obesidade, cancro, hiperglicemia, dislipidemia, síndrome metabólico, síndrome coronário, enfarte do miocárdio, ou transtorno neurológico no dito sujeito sem efeitos secundários adversos inaceitáveis. O kit além disso
15 compreende um frasco reagente farmacêutico para conter um ou mais compostos GRP. O frasco reagente farmacêutico está composto de polímero de grau farmacêutico, vidro ou outro material adequado. O frasco de reagente farmacêutico é, por exemplo, um frasco de vidro assinalado. O kit além disso
20 compreende uma abertura para administração da composição numa superfície mucosal nasal do sujeito. A abertura de administração está composta por um polímero de grau farmacêutico, vidro ou outro material adequado. A abertura de administração é, por exemplo, um vidro assinalado.

25 Uma técnica de sinalização combina uma técnica de limpeza especial para as superfícies a ser sinalizadas com um processo de silanização a baixa pressão. O silano está na fase gasosa e a uma temperatura intensificada das superfícies a ser silanizadas. O método proporciona
30 superfícies reprodutíveis com capas de silano estáveis, homogêneas e funcionais que têm características de uma monocapa. As superfícies silanizadas previnem a ligação ao vidro de polipeptídeos ou agentes que intensificam a

administração mucosal da presente invenção.

O procedimento é útil para preparar frascos reagentes farmacêuticos sinalizados para reter composições GRP da presente invenção. As bandejas de vidro são limpas enxaguando com água bi-destilada (ddH₂O) antes de usar. A bandeja de silano é então enxaguada com EtOH a 95%, e a bandeja de acetona é enxaguada com acetona. Os frascos de reagente farmacêutico são sonicados em acetona por 10 minutos. Depois da sonicação em acetona, os frascos de reagentes são enxaguados em bandeja de ddH₂O ao menos, duas vezes. Os frascos reagentes são sonicados em 0.1M de NaOH por 10 minutos. Assim como os frascos reagentes são sonicados em NaOH, a solução de silanação efectua-se de baixo de um capucho. (Solução de silano: 800 ml de 95% de etanol; 96 L de ácido glacial acético; 25 ml de glicidoxipropiltrimetoxi silano). Depois da sonicação de NaOH, os frascos de reagente são enxaguados em bandeja de ddH₂O ao menos dos vezes. Os frascos de reagente são sonicados em solução de silano por 3 a 5 minutos. Os frascos de reagente são enxaguados em bandeja de EtOH a 100%. Os frascos de reagente são secos com gás N₂ prepurificado e armazenados num forno a 100°C pelo menos 2 horas antes de usar.

Veículos de Administração Bioadesivo e Métodos

Em certos aspectos da invenção, as formulações combinatoriais e/ou métodos da administração coordenada aqui incorporam uma quantidade efetiva de um adesivo não tóxico como um composto ou portador adjunto, para melhorar a administração epitelial de um ou mais agentes biologicamente ativos. Os agentes bioadesivos neste contexto, exibem adesão geral ou específica a um ou mais componentes ou superfícies da membrana biológica alvo.

O bioadesivo mantém um gradiente de concentração

desejado do agente biologicamente ativo em ou através da mucosa para assegurar a penetração de moléculas grandes (por exemplo, peptídeo e proteínas) em ou através do epitélio. Tipicamente, o emprego de um bioadesivo dentro dos métodos e composições da invenção, proporciona um aumento de duas a cinco vezes, muitas vezes de cinco a dez vezes em permeabilidade para peptídeos e proteínas em ou através do epitélio. Este melhoramento da permeação epitelial muitas vezes, permite a administração transmucosal efetiva de macromoléculas grandes, por exemplo, à porção basal do epitélio nasal ou nos compartimentos extracelulares adjacentes ou um plasma do sangue ou tecido de CNS ou fluido.

Esta administração melhorada proporciona efetividade mormente melhorada para a administração de peptídeos, proteínas bioativas e outras espécies terapêuticas macromoleculares. Estes resultados dependerão em parte, da hidrofiliabilidade do composto, com ele, se conseguirá maior penetração com espécies hidrofílicas comparadas com compostos insolúveis em água. Além destes efeitos, o emprego de bioadesivos para melhorar a persistencia do fármaco à superfície da membrana biológica, pode provocar um mecanismo reservatório para a administração de fármaco prolongado, e com ele, os compostos não penetram apenas através da membrana biológica, como também se difundem novamente até à superfície uma vez que o material na superfície se esgote.

Descreve-se uma variedade de bioadesivos adequados na técnica para administração oral, nas Patentes E.U.A N°s 3,972,995; 4,259,314; 4,680,323; 4,740,365; 4,573,996; 4,292,299; 4,715,369; 4,876,092; 4,855,142; 4,250,163; 4,226,848; 4,948,580; Republicação de Patente Estadounidense N° 33,093, a qual encontra uso dentro dos novos métodos e

composição da invenção. O potencial de vários polímeros bioadesivos como uma plataforma de administração nasal, por exemplo mucosal, com os métodos e composições da invenção, pode ser facilmente avaliado determinando a sua capacidade para reter e libertar GRP, assim como também por sua capacidade para interagir com as superfícies mucosais depois da incorporação do agente ativo aí. Além disso, métodos bem conhecidos serão aplicados para determinar a biocompatibilidade de polímeros seleccionados com o tecido no sítio da administração mucosal. Quando a mucosa alvo estiver coberta pelo muco (isto é, na ausência de tratamento mucolítico ou separação do muco), pode servir como uma ligação de conexão ao epitelio mucosal subjacente. Portanto, o termo "bioadesivo" como se usa aqui, também cobre os compostos mucoadesivos úteis para melhorar a administração mucosal de agentes biologicamente ativos dentro da invenção. Não obstante, o contacto adesivo ao tecido mucosal mediado através da adesão a uma capa de gel mucosa, pode ser limitado por união incompleta ou temporal entre a capa do muco e o tecido subyacente, particularmente em superfícies nasais em donde ocorre a separação rápida do muco. Neste sentido, as glicoproteínas de mucina são continuamente secretadas e, imediatamente depois, são liberadas de células ou glândulas, formando um gel viscoelástico. A superfície luminal da capa de gel aderente, não obstante, é continuamente erosionada por ação mecânica, enzimática e/ou ciliar. Em donde tais actividades são mais prominentes ou em donde são desejados tempos de adesão prolongados, os métodos da administração coordenados e métodos de formulação combinatorias da invenção, podem além disso, incorporar métodos mucolíticos e/ou ciliostáticos ou agentes como se descreve aqui anteriormente.

Tipicamente, os polímeros mucoadesivos para uso

dentro da invenção são macromoléculas naturais ou sintéticas as quais se aderem às superfícies de tecido mucosal húmedo por mecanismos complexos, mas não específicos. Além disso destes polímeros mucoadesivos, a invenção também proporciona
5 métodos e composições que incorporam bioadesivos que se aderem directamente a uma superfície celular, em lugar do muco, por meio de interações específicas que incluem, mediadas pelo receptor. Um exemplo de bioadesivos que funcionam em esta maneira específica, é o grupo de compostos
10 conhecidos como lectinas. Estas são glicoproteínas com uma capacidade para reconhecer especificamente e ligar-se a moléculas de açúcar, por exemplo, glicoproteínas ou glicolípidos, os quais formam parte das membranas de células epiteliais intranasais e podem ser considerados como
15 "receptores de lectina".

Em certos aspectos da invenção, materiais bioadesivos para intensificar a administração intranasal de agentes biologicamente ativos compreendem, uma matriz de um polímero hidrofílico, por exemplo, solúvel em água ou
20 expansível, ou uma mistura de polímeros que podem aderir-se a uma superfície mucosa húmida. Estes adesivos podem ser formulados como ungüentos, hidrogéis (ver anteriormente), películas gástricas, e outras formas de aplicação. Muitas vezes, estes adesivos têm o agente biologicamente ativo
25 misturado junto com este para efectuar libertação lenta ou administração local do agente ativo. Alguns são formulados com ingredientes adicionais para facilitar a penetração do agente ativo através da mucosa nasal, por exemplo, no sistema circulatório do indivíduo.

30 Vários polímeros, tanto naturais como sintéticos, mostram ligação significativa ao muco e/ou superfícies epiteliais mucosais baixo condições fisiológicas. A fuerza desta interacción pode ser facilmente medida por

desprendimiento mecânico ou testes de corte. Quando se aplica a uma superfície mucosal húmida, muitos materiais secos espontaneamente se adherirán, ao menos ligeiramente. Depois de tal contacto inicial, alguns materiais

5 hidrofílicos começam a atrair água por absorção, expansão ou forças capilares e se esta água é absorvida do substrato subjacente ou da interface de polímero-tecido, a adesão pode ser suficiente para conseguir a meta de melhorar a absorção da mucosa por agentes biologicamente ativos. Tal "adesão por

10 hidratação", pode ser quase forte, mas as formulações adaptadas para empregar este mecanismo, devem considerar expansão, a qual continua conforme a dosagem se transforma num muscílago hidratado. Isto é projectado para muitos hidrocoloides úteis com a invenção, especialmente alguns

15 derivados de celulose, os quais são em geral, no adesivos quando se aplican no estado pré-hidratado. Não obstante, os sistemas de administração de fármaco bioadesivos para administração epitelial são efetivos dentro da invenção, quando tais materiais são aplicados na forma de um pó seco

20 polimérico, microesfera, ou forma de administração tipo película.

Outros polímeros se aderem às superfícies epiteliais no solamente quando são aplicados em seco, sino também em estado completamente hidratado, e na presença de

25 quantidades em exceso d'água. A seleção de um mucoadesivo deste modo, requer consideração devido às condições fisiológicas assim como também fisicoquímicas, sob as quais o contacto com o tecido será formado e mantido. Em particular, a quantidade de água ou humidade, usualmente

30 presente no sítio propuesto de adesão, e o pH prevalente, são conhecidas por afectar amplamente a intensidade de ligação mucoadesiva de diferentes polímeros.

Vários sistemas de administração de fármaco

bioadesivo polimérico foram fabricados e estudados nos últimos 20 anos, nem sempre com êxito. Uma variedade de tais portadores são, não obstante, actualmente usados em aplicações clínicas que encapsulam usos dentais, ortopédicos, oftalmológicos e cirúrgicos. Por exemplo, hidrogéis de base acrílica, foram usados extensivamente por dispositivos bioadesivos. Os hidrogéis de base acrílica, são bem estudados para bioadesão devido a sua flexibilidade e características no abrasivas no estado particularmente expandido, o qual reduz abrasão que causa danos nos tecidos em contacto. Além disso, sua alta permeabilidade no estado hinchado permite ao monómero sem reagir, cadeias poliméricas no reticuladas e ao iniciador, ser enxaguados da matriz depois da polimerização, o qual é uma característica importante para selección de materiais bioadesivos para uso com a invenção. Dispositivos poliméricos de base acrílica exibem intensidad de ligação adesivo muy fuerte. Para administração epitelial controlado de fármacos de peptídeo e proteína, os métodos e composições da invenção, opcionalmente incluem uso de portadores, por exemplo, veículos de administração polimérico, que funcionam em parte, para proteger o agente biologicamente ativo do rompimento proteolítico, assim como ao mesmo tempo, proporcionam penetração intensificada do peptídeo ou proteína em ou através da mucosa nasal. Neste contexto, os polímeros bioadesivos têm demonstrado potencial considerable para intensificar a administração de fármaco oral. Como um exemplo, a biodisponibilidade de 9-desglicinamida, 8-arginina vasopresina (DGA VP), intraduodenalmente administrada à ratas, junto com 1% (p/p) de dispersão salina do derivado de poli(ácido acrílico) mucoadesivo policarbofilo, é 3-5 vezes aumentada comparada com uma solução aquosa do fármaco de peptídeo neste polímero.

Os polímeros mucoadesivos do tipo poli(ácido acrílico), são potentes inibidores de algumas proteases intestinais. O mecanismo de inibição da enzima é explicado pela forte afinidade desta classe de polímeros por catiões divalentes, tais como cálcio ou zinco, os quais são cofactores essenciais de metaloproteínases, tais como tripsina e quimiotripsina. A privação das proteases dos seus cofactores por poli(ácido acrílico), é reportada por induzir mudanças estruturais irreversíveis das proteínas enzimáticas, as quais são acompanhadas por uma perda da actividade enzimática. Ao mesmo tempo, outros polímeros mucoadesivos (por exemplo, alguns derivados de celulose e quitosan), podem não inibir as enzimas proteolíticas sob certas condições. Contrariamente a outros inibidores enzimáticos contemplados para uso dentro da invenção (por exemplo, aprotinina; bestatina), os quais são moléculas relativamente pequenas, a absorção transnasal de polímeros inibidores é provavelmente mínima em vista do tamanho destas moléculas, e com ele, eliminam os efeitos secundários adversos possíveis. Deste modo, os polímeros mucoadesivos, particularmente do tipo poli(ácido acrílico), podem servir tanto como um adesivo que promove a adesão como um agente protector de enzima para intensificar a administração controlada de peptídeo e fármacos de proteína, especialmente quando são considerados interesses de segurança.

Além da protecção contra a degradação enzimática, bioadesivos e outros agentes que promovam a absorção, não poliméricos e poliméricos para uso com a invenção, podem incrementar directamente a permeabilidade epitelial agentes biologicamente ativos. Para facilitar o transporte de moléculas hidrofílicas e grandes, tais como peptídeos e proteínas, através da barreira epitelial nasal, polímeros mucoadesivos e outros agentes, foram postulados para

proporcionar efeitos de permeação intensificados mais além do que se considera pelo tempo de residência pré-mucosal prolongado do sistema de administração. O curso de tempo das concentrações de plasma de fármaco segundo se informa, 5 sugere que as microesferas bioadesivas causam um aumento agudo, mas temporal, de permeabilidade da insulina através da mucosa nasal. Outros polímeros mucoadesivos para uso com a invenção, por exemplo, quitosan, segundo se informa, intensificam a permeabilidade de certos epitélios mucosais 10 quando são aplicados como uma solução aquosa ou gel. Outro polímero mucoadesivo reportado por afectar directamente a permeabilidade epitelial é o ácido hialurônico e derivados de éster do mesmo. Um agente bioadesivo particularmente útil com a administração coordenada e/ou métodos de formulação 15 combinatorial e composições da invenção é quitosan, assim como também os seus análogos e derivados. O quitosan é um polímero não tóxico, biocompatível e biodegradável que é amplamente usado para aplicações médicas e farmacêuticas devido às suas propriedades favoráveis de baixa toxicidade e 20 boa compatibilidade. É um poliaminosacárido natural preparado de quitina por N-desacilação com álcali. Como se usa dentro dos métodos e composições da invenção, o quitosan incrementa a retenção de GRP, análogos e miméticos e outros agentes biologicamente ativos descritos aqui, num sítio 25 mucosal de aplicação. Este modo da administração também pode melhorar o acatamento e aceitação do paciente. Como se proporciona além disso aqui, os métodos e composições da invenção opcionalmente incluirão um novo derivado de quitosan ou forma quimicamente modificada de quitosan. Um 30 dos tais novos derivados para uso com a invenção, se denota como um polímero β -[1 $\rightarrow$ 4]-2-guanidino-2-desoxi-D-glucose (poli-GuD). O quitosan é o produto N-desacilado de quitina, um polímero que se origina naturalmente que foi usado

extensivamente para preparar microesferas para formulações orais e intranasais. O polímero de quitosan também foi proposto como um portador solúvel para administração de fármaco parenteral. Dentro de um aspecto da invenção, a ou-
5 metilisourea é usada para converter uma amina quitosan na sua porção de guanidino. O composto guanidino é preparado, por exemplo, pela reação entre soluções quase normais de quitosan e ou-metilisourea de pH acima de 8.0.

Compostos adicionais classificados como agentes
10 bioadesivos para uso com a presente invenção, atuam mediando interações específicas, tipicamente clasificadas como "interações de ligando-receptor", entre as estruturas complementares do composto bioadesivo e um componente da superfície epitelial mucosal. Muitos exemplos naturais
15 ilustram esta forma de bioadesão de ligação específica, como se exemplifica por interações de lectina-açúcar. As lectinas são (glico)proteínas de origem não imune, as quais se ligam a polissacáridos ou glicoconjugados.

Varias lectinas de plantas foram investigadas como
20 agentes farmacêuticos que promovem a absorção possíveis. Uma lectina de planta, hemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA), exibe alta biodisponibilidade oral de mais de 10% depois da alimentação em ratas. A lectina de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (TL), parece segura por vários
25 modos da administração.

Em resumo, os agentes bioadesivos mencionados anteriormente, são empregues nas formulações combinatoriais e métodos da administração coordenada da presente invenção, os quais opcionalmente incorporam uma quantidade efetiva e
30 formam um agente bioadesivo para prolongar a persistência ou de outro modo aumentam a absorção epitelial de um ou mais GRP, análogos e miméticos, e outros agentes biologicamente ativos. Os agentes bioadesivos podem ser coordenadamente

administrados como compostos adjuntos ou como aditivos dentro das formulações combinatoriais da invenção. Em certas modalidades, o agente bioativo atua como um "pegamento farmacêutico", assim como em outras modalidades, a administração adjunta ou formulação combinatorial do agente bioadesivo serve para intensificar o contacto do agente biologicamente ativo com a mucosa nasal, em alguns casos promovendo as interações específicas ligando-receptor com "receptores" de células epiteliais e em outros aumentando a permeabilidade epitelial para incrementar significativamente o gradiente de concentração do fármaco medido num sítio alvo de administração (por exemplo, fígado, plasma do sangue, ou tecido do CNS ou fluido). Alguns agentes bioadesivos adicionais para uso com a invenção, atuam como inibidores de enzima (por exemplo protease), para melhorar a estabilidade de agentes bioterapêuticos mucosalmente administrados, administrados coordenadamente ou em formulação combinatorial com o agente bioadesivo.

Lipossomas e Veículos de Administração Micelar

Os métodos da administração coordenada e formulações combinatoriais da presente invenção, opcionalmente incorporam portadores com base de ácidos gordos ou lípidos efetivos, agentes de processamento, ou veículos de administração, para proporcionar formulações melhoradas para a administração epitelial de GRP, análogos e miméticos e outros agentes biologicamente ativos. Por exemplo, uma variedade de formulações e métodos são proporcionados para a administração mucosal, o qual compreende um ou mais destes agentes ativos, tais como peptídeo ou proteína, misturados ou encapsulados por, ou coordenadamente administrados com um lipossoma, portador micelar misturado ou emulsão, para melhorar a estabilidade química e física e incrementar a vida média dos agentes

biologicamente ativos (por exemplo, reduzindo a susceptibilidade a proteólise, modificação química e/ou desnaturalização) depois da administração mucosal.

Dentro de certos aspectos da invenção, os sistemas de administração especializados para agentes biologicamente ativos, compreendem vesículas lípidas pequenas conhecidas como lipossomas. Estas são tipicamente elaboradas de moléculas lípidas neutras, biodegradáveis, não tóxicas e não imunogênicas, e podem eficientemente, prender ou ligar moléculas de fármacos, que incluem peptídeos e proteínas, em ou sobre as suas membranas. A capacidade atractiva de lipossomas como um sistema de administração de peptídeo e proteína dentro da invenção, é aumentada pelo feito de que as proteínas encapsuladas podem permanecer no seu ambiente aquoso preferido dentro das vesículas, assim como a membrana liposomal as protege contra a proteólise e outros fatores desestabilizantes. No entanto ainda nem todos os métodos de preparação de lipossomas conhecidos são efetuáveis na encapsulação de peptídeos e proteínas devido às suas propriedades físicas e químicas únicas, vários métodos permitem a encapsulação destas macromoléculas sem desativação substancial.

Uma variedade de métodos estão disponíveis para preparar lipossomas para uso com a invenção, Patentes E.U.A N°s 4,235,871, 4,501,728, e 4,837,028. Para uso com a administração de lipossoma, o agente biologicamente ativo é tipicamente preso dentro do liposoma, vesícula lípida ou está unido ao exterior da vesícula.

Como os lipossomas, ácidos gordos de cadeia longa insaturados, os quais também têm actividade intensificada para absorção mucosal, podem formar vesículas com estruturas similares a bicapas (assim chamadas "ufassomas"). Estas podem ser formadas por exemplo, usando ácido oleico para

prender peptídeos e proteínas biologicamente ativos para administração intranasal por exemplo, mucosal com a invenção.

Outros sistemas de administração para uso com a invenção, combinam o uso de polímeros e liposomas para aliar as propriedades vantajosas de ambos veículos tais como encapsulação, dentro da fibrina de polímero natural. Além disso, a libertação de compostos bioterapêuticos deste sistema de administração é controlável do uso de reticulação covalente e adição de agentes antifibrinolíticos ao polímero de fibrina.

Os sistemas de administração mais simplificados para uso dentro da invenção, incluem o uso de lípidos catiónicos como veículos ou portadores de administração, os quais podem ser efetivamente empregues para proporcionar uma interação electrostática entre o portador lípido e tais agentes biologicamente ativos carregados como proteínas e ácidos nucleicos polianiónicos. Isto permite o empacotamento eficiente dos fármacos numa forma adequada para administração mucosal e/ou subsequente administração a compartimentos sistémicos.

Os veículos de administração adicional para uso com a invenção incluem, ácidos gordos de cadeia média e longa, assim como também micelos misturados de tensoativos com ácidos gordos. A maioria dos lípidos que se originam naturalmente na forma de ésteres, têm implicações importantes com respeito ao seu próprio transporte através das superfícies mucosais. Os ácidos gordos livres e seus monoglicéridos os quais têm grupos polares unidos, foram demonstrados na forma de micelos misturados para actuar na barreira intestinal, como intensificadores da penetração. Esta descoberta de função modificante de barreira de ácidos gordos livres (ácidos carboxílicos com uma longitude de

cadeia que varia desde 12 até 20 átomos de carbono) e seus derivados polares, tem investigação extensiva estimulada sobre aplicação destes agentes como intensificadores da absorção mucosal.

5 Para uso com os métodos da invenção, os ácidos gordos de cadeia longa, especialmente lípidos fusogênicos (ácidos gordos insaturados e monoglicéridos tais como ácido oleico, ácido linoleico, ácido linoleico, monooleína, etc.), proporcionam portadores úteis para intensificar a
10 administração mucosal de GRP, análogos e miméticos e outros agentes biologicamente ativos descritos aqui. Os ácidos gordos de cadeia média (C6 a C12) e monoglicéridos, também foram mostrados por ter actividade intensificante na absorção de fármaco intestinal, e podem ser adaptados para
15 uso com as formulações de administração mucosal e métodos da invenção. Além disso, os sais sódicos de ácidos gordos de cadeia longa e média, são veículos de administração efetivos e agentes que intensificam a absorção para administração epitelial de agentes biologicamente ativos com a invenção.
20 Deste modo, podem ser empregues ácidos gordos em formas solúveis de sais sódicas ou pela adição de tensoativos não tóxicos, por exemplo, óleo de ricino hidrogenado polioxietilado, taurocolato sódico, etc. Outras preparações micelares misturadas e ácido gordo que são empregues com a
25 invenção incluem, mas não se limitam a, caprilato de Na (C8), caprato de Na (C10), laurato de Na (C12), u oleato de Na (C18), opcionalmente combinada com sais biliares, tais como glicocolato e taurocolato.

Peguilação

30 Métodos adicionais e composições proporcionadas com a invenção envolvem modificação química de peptídeos e proteínas biologicamente activas por união covalente de materiais poliméricos, por exemplo, dextranos,

polivinilpirrolidonas, glicopeptídeos, polietilenoglicol e poliaminoácidos. Os peptídeos e proteínas conjugados resultantes, retêm as suas actividades biológicas e solubilidade para administração epitelial. Em modalidades
5 alternas, GRP, análogos e miméticos e outros peptídeos e proteínas biologicamente ativos, são conjugados a polímeros de polialquilenóxido, particularmente polietilenglicóis (PEG). Patente E.U.A N°. 4,179,337.

Os polímeros PEG amino-reagentes para uso com a
10 invenção incluem, SC-PEG com massas moleculares de 2 000, 5000, 10000, 12000, e 20 000; U-PEG-10000; NHS-PEG-3400-biotin; T-PEG-5000; T-PEG-12000; e TPC-PEG-5000. A PEGilação de peptídeos e proteínas biologicamente ativos se pode conseguir por modificação de sítios carboxilo (por exemplo,
15 grupos de ácido aspártico ou ácido glutâmico além do terminalo carboxilo). Foi descrita a utilidade da PEG-hidrazida em modificação selectiva de grupos carboxilo de proteína activada por carbodiimida sob condições acídicas. Alternativamente, a modificação PEG bifuncional de peptídeos
20 e proteínas biologicamente activas, pode ser empregue. Em alguns procedimentos, os resíduos de aminoácido carregados, que incluem lisina, ácido aspártico e ácido glutâmico, têm uma tendência marcada para ser acessíveis ao solvente em superfícies de proteínas.

25 Outras Modificações Estabilizantes de Agentes Ativos

Além da PEGilação, agentes biologicamente ativos tais como peptídeos e proteínas para uso com a invenção, podem ser modificados para melhorar a vida média de
30 circulação protegendo o agente ativo via conjugação a outros compostos estabilizantes ou protectores conhecidos, por exemplo, pela criação de proteínas de fusão com um peptídeo, ativo, proteína, análogo ou mimético, ligado a uma ou mais proteínas portadoras, tais como uma ou mais cadeias de

imunoglobulina.

Formulação, Preparação, Fabricação e Administração

As formulações de administração epitelial da presente invenção compreendem GRP, análogos e miméticos, tipicamente combinados junto com um ou mais portadores farmacologicamente aceitáveis e, opcionalmente, outros ingredientes terapêuticos. Os portadores devem ser "farmacologicamente aceitáveis", no sentido de ser compatíveis com os outros ingredientes da formulação e não provocar um efeito eliminador inaceitável no sujeito. Tais portadores são descritos aqui anteriormente ou são de outro modo, bem conhecidos por aqueles peritos na técnica de farmacologia. De maneira desejável, a formulação não deve incluir substâncias tais como enzimas ou agentes oxidantes com os quais o agente biologicamente ativo a ser administrado se conhece por ser incompatível. As formulações podem ser preparadas por quaisquer dos métodos bem conhecidos na técnica de farmácia.

Com as composições e métodos da invenção, o GRP, análogos e miméticos e outros agentes biologicamente ativos descritos aqui, podem ser administrados a sujeitos por uma variedade de modos da administração mucosais, que incluem, administração oral, rectal, vaginal, intranasal, intrapulmonar, ou transdérmica, ou por administração tópica nos olhos, ouvidos, pele ou outras superfícies mucosais. As composições e métodos da invenção também incluem modos da administração dérmicos. Opcionalmente, GRP, análogos e miméticos e outros agentes biologicamente ativos descritos aqui, podem ser coordenadamente e adjuntivamente administrados por vias no mucosais, que incluem emplastos dérmicos, preparações tópicas aplicadas à pele, vias intramuscular, subcutânea, intravenosa, intra-atrial, intra-articular, intraperitoneal ou parenteral. Em outras

modalidades alternativas, os agentes biologicamente ativos podem ser administrados *ex vivo* por exposição directa a células, tecidos ou órgãos que se originam de um sujeito mamífero, por exemplo, como um componente de uma formulação de tratamento de órgão ou tecido *ex vivo*, que contém o agente biologicamente ativo num portador líquido ou sólido adequado.

As composições em conformidade com a presente invenção, são muitas vezes administradas numa solução aquosa como um atomizador pulmonar ou nasal e podem ser dispensadas em forma de aspersão por uma variedade de métodos conhecidos por aqueles peritos na técnica. Sistemas preferidos para dispensar líquidos como um atomizador nasal descrevem-se na Patente E.U.A N° 4,511,069. As formulações podem ser apresentadas em contentores de dose múltiplos, por exemplo, no sistema de dispensa selada descrito na Patente E.U.A N° 4,511,069. As formas de administração em aerossol adicionais podem incluir, por exemplo, nebulizadores de ar comprimido, de jacto e eléctricos, nos quais a administração do agente biologicamente ativo dissolvido ou suspenso num solvente farmacêutico, por exemplo, água, etanol ou uma mistura dos mesmos.

As soluções atomizadoras pulmonares e nasais da presente invenção, tipicamente compreendem o fármaco ou fármaco a ser administrado, opcionalmente formulado com um agente ativo da superfície, tal como um tensoativo no iónico (por exemplo, polisorbato 80), e um ou mais amortecedores. Em algumas modalidades da presente invenção, a solução atomizadora nasal além disso compreende um propulsor. O pH da solução atomizadora nasal é opcionalmente entre aproximadamente pH 2.0 e 8, preferivelmente 4.5 ± 0.5 . Os amortecedores adequados para uso com estas composições são como se descrevem anteriormente ou de outro modo, conhecidos

na técnica. Outros componentes podem ser agregados para melhorar ou manter a estabilidade química, que incluem conservantes, tensoativos, dispersantes ou gases. Os conservantes adequados incluem, mas não se limitam a, fenol, 5 metilparabeno, parabeno, m-cresol, tiomersal, clorobutanol, cloreto de benzalcônio, benzoato de sódio, etanol, feniletil éter, álcool benzílico e similares. Tensoativos adequados incluem, mas não se limitam a, ácido oleico, trioletato de sorbitan, polisorbatos, lecitina, fosfatidil colinas e 10 vários diglicéridos e fosfolípidos de cadeia longa. Dispersantes adequados incluem mas não se limitam a, ácido etilendiaminatetraacético e similares. Os gases adequados incluem mas não se limitam a, nitrógeno, hélio, clorofluorocarbonos (CFC), hidrofluorocarbonos (HFC), 15 dióxido de carbono, ar e similares.

Com modalidades alternas, as formulações mucosais são administradas como formulações em pó seco que compreendem o agente biologicamente ativo numa forma seca, usualmente liofilizada de um tamanho de partícula adequado, 20 ou com um intervalo de tamanho de partícula adequado. Os tamanhos de partícula mínimos adequados para deposição com as passagens pulmonares ou nasais, são muitas vezes, de aproximadamente 0.5 μ de massa mediana equivalente ao diâmetro aerodinâmico (MMEAD), comumente aproximadamente 1 μ 25 MMEAD, e mais tipicamente aproximadamente 2 μ MMEAD. O tamanho de partícula máximo adequado para deposição com os passagens nasais é muitas vezes aproximadamente 10 μ MMEAD, comumente aproximadamente 8 μ MMEAD, e mais tipicamente aproximadamente 4 μ MMEAD. Os pós intranasalmente 30 respiráveis com estes tamanhos de partícula, podem ser produzidos por uma variedade de técnicas convencionais, tais como movido por pulverização, secagem por aspersão, precipitação de solvente, condensação de fluido supercrítico

e similares. Estes pós secos de MMEAD adequado podem ser administrados a um paciente via um inalador em pó seco convencional (DPI); o qual depende da respiração do paciente, da inalação pulmonar ou nasal, para dispersar o pó numa quantidade aerossolizada. Alternativamente, o pó seco pode ser administrado via dispositivos assistidos por ar que usam uma fonte de energia externa para dispersar o pó numa quantidade aerossolizada, por exemplo, uma bomba de pistão.

Os dispositivos em pó seco, tipicamente requerem uma massa em pó no intervalo desde aproximadamente 1 mg até 20 mg, para produzir uma dose aerossolizada única ("nube"). Se a dose desejada ou requerida do agente biologicamente ativo é inferior que esta quantidade, o agente ativo em pó tipicamente se combinará com um pó em volume seco farmacêutico para proporcionar a massa em pó total requerida. Os pós secos volumosos preferidos incluem, sacarose, lactose, dextrose, manitol, glicina, trehalose, albumina do soro humano (HSA) e amido. Outros pós secos volumosos adequados incluem, celobiose, dextrans, maltotriose, pectina, citrato de sódio, ascorbato de sódio e similares.

Para formular composições para administração epitelial com a presente invenção, o agente biologicamente ativo pode ser combinado com vários aditivos farmacêuticamente aceitáveis, assim como também como uma base ou portador para dispersão dos agentes ativos. Aditivos desejados incluem, mas não se limitam a, agentes de controle de pH, tais como arginina, hidróxido de sódio, glicina, ácido clorídrico, ácido cítrico, ácido acético, etc. Além disso, anestésicos locais (por exemplo, álcool benzílico), agentes isotonzantes (por exemplo, cloreto de sódio, manitol, sorbitol), inibidores da absorção (por exemplo, Tween 80), agentes intensificadores da solubilidade (por

exemplo, ciclodextrinas e derivados dos mesmos), estabilizadores (por exemplo, albumina do soro) e agentes de redução (por exemplo, glutathione), podem ser incluídos. Quando a composição para administração epitelial é um líquido, a tonicidade da formulação, medida com referência à tonicidade de 0.9% (p/v) da solução salina fisiológica tomada como unidade, é tipicamente ajustada um valor no qual não se induzirá dano de tecido irreversível substancial na mucosa nasal, ao sítio da administração. Em geral, a tonicidade da solução é ajustada a um valor de aproximadamente 1/3 a 3, mais tipicamente 1/2 a 2, e muito mais vezes 3/4 a 1.7.

O agente biologicamente ativo pode ser dispersado numa base ou veículo, o qual pode compreender um composto hidrofílico que tem uma capacidade para dispersar o agente ativo e qualquer dos aditivos desejados. Esta base pode ser seleccionada de um amplo intervalo de portadores adequados, que incluem mas não se limitam a, copolímeros de ácidos policarboxílicos ou sais dos mesmos, anídridos carboxílicos (por exemplo, anidrido maleico) com outros monómeros (por exemplo, metil(met)acrilato, ácido acrílico, etc.), polímeros vinílico hidrofóbico tais como polivinilacetato, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona, derivados de celulose tais como hidroximetilcelulose, hidroxipropilcelulose, etc., e polímeros naturais tais como quitosana, colágeno, alginato de sódio, gelatina, ácido hialurônico e sais metálicos não tóxicos dos mesmos. Muitas vezes, um polímero biodegradável se selecciona como uma base ou portador, por exemplo, ácido poliláctico, copolímero poli(ácido láctico-ácido glicólico), ácido polihidroxibutírico, copolímeros de poli(ácido hidroxibutírico-ácido glicólico) e misturas dos mesmos. Alternativamente ou adicionalmente, ésteres de ácidos gordos

sintéticos tais como ésteres de ácidos gordos de poliglicerina, éteres de ácido gordo de sacarose, etc., podem ser empregues como portadores. Os polímeros hidrofílicos e outros portadores podem ser usados sozinhos ou em combinação, e a integridade estrutural melhorada, podem ser imputados ao portador por cristalização parcial, ligação iónica, reticulação e similares. O portador pode ser proporcionado numa variedade de formas, que incluem, soluções viscosas ou fluidos, geles, pastas, pós, microesferas e películas para aplicação directa na mucosa nasal. O uso de um portador seleccionado neste contexto, pode resultar em promoção da absorção do agente biologicamente ativo.

O agente biologicamente ativo pode ser combinado com base ou portador em conformidade com uma variedade de métodos, e a libertação do agente ativo pode ser por difusão, desintegração do portador ou formulação associada de canais de água. Em algumas circunstâncias, o agente ativo é dispersado em microcápsulas (microesferas) ou nanocápsulas (nanoesferas) preparadas de um polímero adequado, por exemplo, 2-cianoacrilato de isobutilo e dispersado num meio de dispersão biocompatível aplicado à mucosa nasal, o qual proporciona administração prolongada e actividade biológica sobre um tempo prolongado.

Para melhorar além disso a administração epitelial de agentes farmacêuticos com a invenção, formulações que compreendem o agente ativo também podem conter um composto de baixo peso molecular hidrofílico como uma base ou excipiente. Tais compostos de baixo peso molecular hidrofílicos proporcionam um meio de passagem através do qual um agente ativo solúvel em água, tal como um peptídeo ou proteína fisiologicamente ativo, pode difundir-se através da base à superfície corporal onde o agente ativo é

absorvido. O composto hidrofílico de baixo peso molecular, opcionalmente absorve humidade da mucosa ou atmosfera da administração e dissolve o peptídeo ativo solúvel em água. O peso molecular do composto hidrofílico de baixo peso molecular é em geral, não mais de 10000 e preferivelmente não mais de 3000. O composto hidrofílico de baixo peso molecular exemplar inclui, os compostos de poliol, tais como oligo, di e monosacáridos tais como sacarose, manitol, sorbitol, lactose, L-arabinose, D-eritrosa, D-ribose, D-xilosa, D-manosa, trehalosa, D-galactose, lactulosa, celobiosa, gentibiosa, glicerina e polietilenoglicol. Outros exemplos de compostos hidrofílicos de baixo peso molecular empregues como portadores dentro da invenção incluem, N-metilpirrolidona, e alcoholes (por exemplo, oligonivilalcohol, etanol, etilenglicol, propilenglicol, etc.). Estes compostos hidrofílicos de baixo peso molecular podem ser usados solos ou em combinação entre si ou com outros componentes ativos ou inativos da formulação intranasal.

As composições da invenção podem alternativamente conter como portadores farmacêuticamente aceitáveis, substâncias requeridas a condições fisiológicas aproximadas, tais como agentes amortecedores e que ajustam o pH, agentes que ajustam a tonicidade, agentes humidificadores e similares, por exemplo, acetato de sódio, lactato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc. Para composições sólidas, os portadores não tóxicos convencionais farmacêuticamente aceitáveis podem ser usados, os quais incluem por exemplo, grados farmacêuticos de manitol, lactose, almidón, estearato de magnésio, sacarina de sódio, talco, celulose, glucose, sacarose, carbonato de magnésio e similares.

As composições terapêuticas para administrar o agente biologicamente ativo podem também ser formuladas como uma solução, microemulsão ou outra estrutura ordem adequada para alta concentração de ingredientes ativos. O portador
5 pode ser um solvente ou meio de dispersão que contém por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenglicol, e polietilenoglicol líquido e similares), e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez adequada para soluções se pode manter por exemplo, pelo uso de um
10 revestimento tal como lecitina, pelo mantenimiento de um tamanho de partícula desejado no caso de formulações dispersíveis, e pelo uso de tensoativos. Em muitos casos, será desejável incluir agentes isotônicos por exemplo, açúcares, polialcoholes tais como manitol, sorbitol ou
15 cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada do agente biologicamente ativo pode ser levada aproximadamente incluindo na composição um agente, o qual retarda a absorção, por exemplo, sais de monoesterato e gelatina.

Em certas modalidades da invenção, o agente
20 biologicamente ativo administrado é uma formulação de libertação com o tempo, por exemplo, numa composição a qual inclui um polímero de libertação lenta. O agente ativo pode ser preparado com portadores que protegerão contra a libertação rápida, por exemplo, um veículo de libertação
25 controlada tal como polímero, sistema de administração microencapsulado ou gel bioadesivo. A administração prolongada do agente ativo, em varias composições da invenção, pode ser levada aproximadamente incluindo na composição, agentes que retardam a absorção, por exemplo,
30 hidrogeles de monoesterato de alumínio e gelatina.

Quando as formulações de libertação controlada do agente biologicamente ativo são desejadas, os aglutinantes de libertação controlada adequados para uso de conformidade

com a invenção incluem, qualquer material de libertação controlada biocompatível o qual é inserido no agente ativo e o qual é capaz de incorporar o agente biologicamente ativo. Numerosos tais materiais conhecem-se na técnica. Os
5 aglutinantes de libertação controlada úteis são materiais que são metabolizados lentamente sob condições fisiológicas depois da sua administração intranasal (por exemplo, na superfície mucosal nasal, ou na presença de fluidos corporais depois da administração transmucosal). Os
10 aglutinantes adequados incluem mas não se limitam a polímeros biocompatíveis e copolímeros previamente usados na técnica em formulações de libertação prolongada. Tais compostos biocompatíveis são não tóxicos e inertes a tecidos circundantes, e não activam efeitos secundários adversos
15 significantes tais como irritação nasal, resposta imune, inflamação ou similares. São metabolizados em produtos metabólicos que são também biocompatíveis e facilmente eliminados do corpo.

Materiais poliméricos exemplares para uso neste
20 contexto incluem, mas não se limitam a, matrizes poliméricas derivadas de poliésteres copoliméricos e homopoliméricos que têm ligações éster hidrolizáveis. Um número destes conhecem-se na técnica por ser biodegradáveis e conduzir a produtos de degradação que não têm toxicidade ou
25 têm baixa. Polímeros exemplares incluem ácidos poliglicólicos (PGA) e ácidos polilácticos (PLA), poli(DL-ácido láctico-co-ácido glicólico) (DLPLA), poli(D-ácido láctico-ácido coglicólico) (D PLGA) e poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (L PLGA). Outros polímeros biodegradáveis
30 ou bioerosíveis úteis incluem mas não se limitam a, tais polímeros como poli(épsilon-caprolactona), poli(épsilon-aprolactona-CO-ácido láctico), poli(α -aprolactona-CO-ácido glicólico), poli(beta-ácido hidroxibutírico), poli(alquil-

2-cianoacrilato), hidrogeles tais como poli(hidroxietil metacrilato), poliamidas, poli(amino ácidos) (isto é, L-leucina, ácido glutâmico, ácido L-aspartico e similares), poli(éster urea), poli(2-hidroxietil DL-aspartamida),
5 polímeros de poliacetal, poliortoésteres, policarbonato, polimaleamidas, polisacáridos e copolímeros dos mesmos. Muitos métodos para preparar tais formulações são em geral, conhecidos por aqueles peritos na técnica. Outras formulações úteis incluem composições de libertação
10 controlada, por exemplo, microcápsulas, Patentes E.U.A. Nos. 4,652,441 e 4,917,893, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico empregues na elaboração de microcápsulas e outras formulações, Patentes E.U.A. Nos. 4,677,191 e 4,728,721, e composições de libertação prolongada para peptídeos solúveis
15 em água, Patente Estadounidense No. 4,675,189.

O processo de fabricação de produto atomizador nasal em geral, inclui a preparação de um diluente para atomizador nasal GRP, o qual inclui 85% de água mais os componentes da formulação atomizadora nasal sem GRP. O pH do
20 diluente é então medido e ajustado ao pH da formulação desejada com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico se é necessário. A água é usada para conseguir o volume alvo final do diluente. O atomizador nasal GRP é preparado pela transferência não aséptica de ~85% do volume alvo final do
25 diluente a uma garrafa tapada com rosca. Uma quantidade adequada de GRP agrega-se e mistura-se que se dissolve completamente. O pH é medido e ajustado ao pH de formulação desejada com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico, se é necessário. Uma quantidade suficiente de diluente se agrega
30 para alcançar o volume alvo final. As garrafas tapadas com rosca são cheias e fixas com tampas. A descrição anterior do processo de fabricação representa um método usado para preparar os lotes clínicos iniciais do produto de fármaco.

Este método pode ser modificado durante o processo de desenvolvimento para otimizar o processo de fabricação.

O GRP actualmente comercializado requer condições de fabricação estéreis para cumprimento com as regulações da FDA. A administração parenteral que inclui GRP para injeção ou infusão, requer um processo de fabricação estéril (aséptico). As Boas Práticas de Fabricação Actual (GMP) para fabricação de fármaco estéril incluem padrões para características de construção e esboço (21 C.F.R. § 211.42 (Abril 1, 2005)); padrões para avaliar e aprovar ou rejeitar componentes, recipientes de produto de fármaco e tampas (§ 211.84)); padrões para o controlo de contaminação microbiológica (§ 211.113); e outros requisitos de teste especiais (§ 211.167). Produtos no parenterales (no asépticos), tais como o produto intranasal da invenção, não requerem estas condições de fabricação estéril especializadas. Como se pode apreciar facilmente, os requisitos para um processo de fabricação estéril são substancialmente superiores e correspondentemente mais dispendiosos que aqueles requeridos para um processo de fabricação de produto não estéril. Estes custos incluem custos de capitalização muito maiores para instalações, assim como também custos de fabricação elevados: instalações adicionais para fabricação estéril incluem, divisões adicionais e ventilação; custos adicionais associados com a fabricação estéril incluem recursos humanos maiores, controlo de qualidade extensivo e garantia de qualidade, e apoio administrativo. Como um resultado, os custos de fabricação de um produto GRP, tal como aquele da invenção, são suficientemente menores que aqueles de um produto GRP parenteralmente administrado. A presente invenção satisfaz a necessidade de um processo de fabricação não estéril para GRP.

A invenção inclui um produto de fármaco GRP livre de conservante. Tal formulação não contém um conservante. Na ausência de um excipiente antimicrobiano, a formulação poderia ser cheia sob condições estéreis num dispositivo
5 atomizador nasal livre de conservante, ou incorporado numa preparação de penso dérmico. O dispositivo poderia ser capaz de administrar uma dose efetiva sem permitir contaminação da formulação dentro do sistema de administração. Tal produto de fármaco de GRP poderia permitir a dosagem múltipla do
10 mesmo contenedor, com ello, reduzindo grandemente o custo de artigos relativos a um produto de fármaco de uso único. Vantagens de uma formulação de GRP livre de conservante de uso múltipla, são estabilidade melhorada, meios alternativos para prevenção da microbiana, e redução no custo de artigos
15 que permitem ao produto ser mais viável para comercialização.

As soluções estéreis podem ser preparadas incorporando o composto ativo na quantidade requerida num solvente adequado com uma ou outra combinação de
20 ingredientes enumerados anteriormente, conforme se requer, seguido por esterilização filtrada. Em geral, as dispersões são preparadas incorporando o composto ativo num veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos destes enumerados anteriormente. No
25 caso de pós estéreis, os métodos de preparação incluem secagem a vácuo e secagem por congelamento, o qual proporciona um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado de uma solução previamente filtrada estéril do mesmo. A prevenção da ação de
30 microorganismos pode ser realizada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal e similares.

A administração na pele e mucosal, em conformidade

com a invenção, permite auto-administração seletiva para o tratamento por pacientes, sempre que suficiente segurança se coloque para controlar e monitorizar as dosagens e efeitos secundários. A administração na pele e mucosal também supera
5 certas desvantagens de outras formas da administração, tais como injeções, que são dolorosas e expõem o paciente a infeções possíveis e podem apresentar problemas de biodisponibilidade de fármaco. Para administração pulmonar e nasal, os sistemas para dispensa controlada de aerossol de
10 líquidos terapêuticos como um atomizador, são bem conhecidos. Numa modalidade, doze medidas de agente ativo são administradas por meio de uma válvula de bomba mecânica especialmente construída, Patente E.U.A No. 4,511,069. Em outra modalidade, o agente inativo é administrado por
15 tecnologia de emplastro dérmico.

Dosagem

Para fins de tratamento e profiláticos, os agentes biologicamente ativos descritos aqui, podem ser administrados nos sujeitos numa administração de bolo
20 único, via administração continua (por exemplo, administração transdérmica, mucosal ou intravenosa continua), sobre um periodo de tempo prolongado ou num protocolo da administração repetida (por exemplo, por um protocolo de administração repetido a cada hora,
25 diariamente ou semanalmente). Neste contexto, uma dosagem terapeuticamente efetiva de GRP pode incluir dose repetidas dentro de um regime de tratamento ou profilaxia prolongada que proporcionará resultados clinicamente significantes para aliviar um ou mais sintomas ou condições detectáveis
30 associadas com uma doença ou condição alvo, como se expõe anteriormente. A determinação das dosagens efetivas neste contexto, baseia-se tipicamente em estudos de modelos animais seguido por ensaios clínicos humanos e se guia

determinando as dosagens efetivas e protocolos da administração que reduzem significativamente a incidência ou severidade de sintomas ou condições de doença alvo no sujeito. Os modelos adequados neste sentido incluem, por exemplo, sujeitos de modelos animais murino, ratazana, porcino, felino, primata não humano e outros aceitos, conhecidos na técnica. Alternativamente, as dosagens efetivas podem ser determinadas usando modelos *in vitro* (por exemplo, ensaios histopatológicos e imunológicos). Usando tais modelos, apenas cálculos e ajustes ordinários são tipicamente requeridos para determinar uma concentração adequada e dose para administrar uma quantidade terapeuticamente efetiva dos agentes biologicamente ativos (por exemplo, quantidades que são intranasalmente efetivas, transdermicamente efetivas, intravenosamente efetivas ou intramuscularmente efetivas para provocar uma resposta desejada).

Numa modalidade alternativa, a invenção proporciona composições e métodos para administração intranasal de GRP, onde os compostos GRP é/são administrados repetidamente através de um regime de dosagem efetivo intranasal que involucra, administrações múltiplas do GRP ao sujeito durante um programa diário ou semanal para manter um nível terapeuticamente efetivo elevado e pulsátil reduzido de GRP durante um período de dosagem prolongado. As composições e métodos proporcionam compostos GRP que são auto-administrados pelo sujeito numa formulação nasal entre uma e seis vezes diariamente para manter um nível terapeuticamente efetivo elevado e pulsátil reduzido de GRP durante um período de dosagem estendido de 8 horas a 24 horas.

Kits

A presente invenção inclui kits, embalagens e

unidades de contentores múltiplos que contêm as composições farmacêuticas descritas anteriormente, ingredientes ativos, e/ou meios para administrar os mesmos, para uso na prevenção e tratamento de doenças e outras condições em
5 sujeitos mamíferos. Brevemente, estes kits incluem um contentor ou formulação que contém um ou mais GRP, análogos ou miméticos, e/ou outros agentes biologicamente ativos em combinação com agentes que intensificam a administração epitelial descritos aqui, formulados numa preparação
10 farmacêutica para administração epitelial.

As formulações intranasais da presente invenção, podem ser administradas usando qualquer garrafa ou seringa atomizadora ou por instilação. Um exemplo de garrafa atomizadora nasal é a "Nasal Spray Pump w/ Safety Clip,
15 Pfeiffer SAP # 60548, a qual administra uma dose de 0.1 ml por pulverização e tem uma longitude de tubo profundo de 36.05 cm. Pode ser adquirida à Pfeiffer of America of Princeton, NJ.

Administração Nasal em Aerossol de um GRP

20 Descobriuse que os GRP podem ser administrados intranasalmente usando um atomizador nasal ou aerossol. Isto é surpreendente visto que muitas proteínas e peptídeos foram mostrados por serem portados ou desnaturalizados devido às forças mecânicas geradas pelo acionador na
25 produção do atomizador ou aerossol. Nesta área, são empregues as seguintes definições:

1. Aerossol- Um produto que é engarrafado sob pressão e contém ingredientes terapeuticamente ativos que são liberados depois da ativação de um sistema de válvula
30 apropriado.

2. Aerossol medido- Uma forma de dosagem pressurizada que contém de válvulas de dose medidas, as quais permitem a administração de uma quantidade uniforme

de atomizador depois de cada activação.

3. Aerossol em pó- Um produto que é engarrafado sob pressão e contém ingredientes terapeuticamente ativos na forma de um pó, no qual são liberados depois da
5 activação de um sistema de válvula adequado.

4. Aerossol atomizado- Um produto em aerossol que utiliza gás comprimido com o propulsor para proporcionar a força necessária para expulsar o produto como uma atomização húmida; é em geral, aplicável a
10 soluções de agentes químicos em solventes aquosos.

5. Atomizador - Um líquido minuciosamente dividido como por um vapor de pulverização ou ar. Os produtos de fármaco atomizadores nasais contêm ingredientes terapeuticamente ativos dissolvidos ou suspensos em
15 soluções ou misturas de excipientes em dispensadores não pressurizados.

6. Atomizador medido - Uma forma de dosagem não presurizada que consiste de válvulas que permitem a dispensa de uma quantidade especificada de atomizador
20 depois de cada activação.

7. Atomizador de suspensão- Uma preparação líquida que contém partículas sólidas dispersas num veículo líquido e na forma de gotitas em curso ou como sólidos finamente divididos.

25 A caracterização dinâmica do fluido do atomizador em aerossol se emite por bomba atomizadora nasal medida como um dispositivo de administração de fármaco ("DDD"). A caracterização de aspersão é uma parte integral das admisiones regulatorias necesarias pela administração de
30 alimentos e Fármacos ("FDA"), para aprovação de investigação desenvolvimento, garantia de qualidade e procedimietos de teste destabilidade para nuevas e existentes bombas de aspersão nasais.

Através da caracterização da geometria atomizadora, encontrou-se o melhor indicador do desempenho total das bombas atomizadoras nasais. Em particular, medições do ângulo de divergência atomizador (geometria de 5 coluna de água), conforme saem do dispositivo; elipticidade em seção transversal do atomizador, uniformidade distribuição de partícula/gotita (padrão atomizador); e o tempo de evolução do desenvolvimento do atomizador, encontrou-se por ser as quantidades de desempenho mais 10 representativas na caracterização de bombas atomizadoras nasais. Durante a garantia de qualidade e testes de estabilidade, a geometria da pulverização e medições do padrão atomizador são identificadores chave para verificar a consistência e conformidade com o critério de dados 15 aprovado para as bombas atomizadoras nasais.

Definições

Altura de pulverização- a medição da ponta do acionador ao ponto no qual o ângulo da pulverização chega a ser não linear devido ao rompimento do fluxo linear. 20 Baseados numa examinação visual de imagens digitais, e estabelecer um ponto de medição de amplitude que é consistente com um ponto de medição mais longe do padrão atomizador, uma altura de 30 mm é definida para este estudo.

25 Eixo Principal - a corda mais longa que pode ser extraída do padrão atomizador ajustado que cruza o COMw em unidades base (mm).

Eixo menor - a corda mais curta que pode ser extraída com o padrão atomizador que cruza o COMw em 30 unidades base (mm).

Relação de Elipticidade - a relação do eixo principal ao eixo menor, preferivelmente entre 0.1 e 1.5, e mais preferivelmente entre 1.0 e 1.3

D_{10} - o diâmetro da gotita pela qual, 10% do volume total de líquidos da amostra consiste de gotitas de um diâmetro menor (μm).

5 D_{50} - o diâmetro da gotita pela qual, 50% do volume total de líquidos da amostra consiste de gotitas de um diâmetro mais pequeno (μm), também conhecida como o diâmetro mediano de massa.

10 D_{90} - o diâmetro da gotita pela qual, 90% do volume total de líquidos da amostra consiste de gotitas de um diâmetro mais pequeno (μm).

Trajeto - medição da amplitude da distribuição. O menor valor, distribuição mais estreita. O trajeto é calculado como

$$\frac{(D_{90} - D_{10})}{D_{50}}$$

15 % RSD - percentagem de desvio padrão relativa, a desvio padrão dividido pela média das séries e multiplicada por 100, também conhecida como % de CV.

20 Volume - o volume do líquido ou pó descarregado do veículo de administração com cada equação, preferivelmente entre 0.01 ml e aproximadamente 2.5 ml e mais preferivelmente, entre 0.02 ml e 0.25 ml.

EXEMPLOS

25 A descrição anterior geralmente descreve a presente invenção, a qual é além disso exemplificada pelos seguintes exemplos. Estes exemplos descrevem unicamente para fins de ilustração, e não se planeiam para limitar o alcance da invenção. A pesar de se terem empregue termos e valores específicos neste documento, tais termos e valores também se entenderam como exemplos e não limitante do alcance da invenção.

30 EXEMPLO 1

Materiais e Equipamento Usados

O presente exemplo ilustra os reagentes, equipamento e a fonte de cada um usado nos subsequentes Exemplos da presente solicitude. A Tabela 1 ilustra os reagentes da amostra usados nos Exemplos subsequentes.

Tabela 1

Reagentes da amostra GLP-1

Reagente	Grau	Distriuidor	Cat #	Lote #	F.W.
GLP-1 (7-36 amida)	GMP	Bachem	H-6795.1000	FCLP0401A	3298
Citrato de sódio	USP	Spectrum	S0165	TE0713	294.10
Ácido Cítrico	USP	Sigma	C-1857	073K0061	192.13
Metil- β -ciclodextrina		CarboMer	03-DS 1550	W0043-23	~1317-1359
L- α -fosfatidilcolin didecanoil		Sigma	P-7081	055H8377	565.7
Edetato de Di-sódio	USP	Spectrum	ED150	TF0419	372.2
Sal de magnésio de EDTA di-sódio		Aldrich	317810	05618TB	358.51
Sal de zinc de EDTA de di-sódio		Riedel-de Haen	34553	22820	471.63
Cloreto de Benzalcônio	NF	Spectrum	B1068	SH0391	~350
Sorbitol	NF	Spectrum	SO219	1122N-01039-1	182.2
α -Lactose monohidrato	NF	Spectrum	LA106	1335N-00985-1	360
Cloreto de Sódio	USP	Sigma		1008Q-01056-1	58.44
9% Triton X-100		Promega	G182A	17491001	
Água estéril para irrigação	USP	Spectrum	S1944	J4H196	

A tabela 2 ilustra fonte dos componentes do Sistema MatTek EpiAirway™ que se descrevem em maior detalhe no Exemplo 2 da presente aplicação.

Tabela 2

Componentes do Sistema do Modelo de Célula Epitelial *in vivo*

Reagente	Distribuidor	Cat #	Lote #
Insertos do Cultivo de tecido	MatTek Corp.	AIR-100	
Meio Livre do soro	MatTek Corp.	AIR-100-MM	112604RJJ PRF

A Tabela 3 ilustra a fonte e componentes do sistema de ensaio LDH descrito em maior detalhe no Exemplo 2 da presente aplicação.

Tabela 3

Componentes do Ensaio LDH (Citotoxicidade) e MTT (Viabilidade celular).

agente	Distribuidor	Parte #	Lote #
Mistura do substrato (ensaio LDH)	Promega	G179A	18523201
Amortecedor de ensaio (ensaio LHD)	Promega	G180A	18366001
Solução de detenção (ensaio LDH)	Promega	G183A	18585401
Concentrado de MTT (ensaio MTT)	MatTek Corp.	MTT-100-COM	111604tta
Diluyente de MTT (ensaio MTT)	MatTek Corp.	MTT-100-COM	112904HC
Solução de Extração (ensaio MTT)	MatTek Corp.	MTT-100-COM	438B15

A tabela 4 ilustra os instrumentos e outras administrações de laboratório relacionadas e fontes de cada um usado neste documento.

Tabela 4

5 Instrumentos e Outros administrações Relacionadas

Instrumento	Distribuidor	Modelo #	s/n
Câmara de Medição de Resistencia do Tecido	World Precision Instruments	ENDOHM-12	67107 H11D
Voltímetro Epitelial	World Precision Instruments	EVOM	60916 G08C
Leitor de placa de densidade óptica μ Quant	Biotek Instruments		160155
Osmómetro Micro Avanzado	Advanced Instruments Inc.	2020	P04030199A
Inserto de blanco de Millicel-CM	Millipore	PICM01250	F2NN64661
Placa multicavidade de 24 cavidades	Becton Dickinson	35-3047	
Placa multicavidade de 6 cavidades	Becton Dickinson	35-3046	

EXEMPLO 2

Cinética de Permeação *in vitro* de Formulações Farmacêuticas do Peptídeo-1 (GLP-1) similar a Glucagon

O presente exemplo mostra as formulações farmacêuticas exemplares da presente invenção, as quais contêm os excipientes DDPC, EDTA e M- β -DC sozinhos ou em combinação, permeação GLP-1 intensificada através de uma monocapa de célula epitelial. A tabela 5 ilustra as formulações selecionadas no Sistema de Modelo EpiAirway por ensaio de resistência transepitelial (TEER), ensaio de viabilidade celular (MTT), ensaio de morte celular de lactato deshidrogenase (LHD) e ensaio de permeação de tecido para determinar que formulação logra o maior grau de

permeação de tecido GLP-1 e redução TEER assim como não resulta em toxicidade celular significativa.

As amostras por triplicado de cada formulação e controlos avaliaram-se usando as inserções da membrana da
5 célula epitelial traqueal/bronquial do modelo *in vitro* do Sistema EpiAirway por MatTek Corp. (Ashland, MA), catalogo # Air-100. O sistema EpiAirwayTM desenvolveu-se por MatTek Corp. (Ashland, MA) como um modelo do recubrimiento do epitelio pseudoestratificado do tracto respiratorio. As
10 células fazem-se crescer em cultivos de célula de fundo redondo da membrana porosa inseridos numa interface ar-líquido, a qual resulta em diferenciação das células a uma morfologia altamente polarizada. A superfície apical é ciliada com uma ultraestrutura microvelosa e a mucosidade
15 procedente do epitelio (a presença de mucina confirmou-se por imunomanchado). As inserções têm um diâmetro de 0.875 cm, proporcionam um área da superfície de 0.6 cm². As células se colocaram em placas nas inserções na fábrica aproximadamente três semanas antes do embarque.

20 Receberam-se membranas de cultivo EpiAirwayTM um dia antes que os experimentos tenha início. Enviaram-se por Meio de Eagle Modificado por Dulbecco livre de hidrocortisona e livre de fenol vermelho (DMEM). Cada inserção de tecido se colocou numa cavidade de uma placa de
25 6 cavidades que contêm 0.9 ml de DMEM livre do soro. As membranas depois cultivam-se por 24 horas a 37°C/CO₂ a 5% para permitir aos tecidos equilibrarem-se. Este meio com base de DMEM é livre do soro mas suplementado com factor de crescimento epidérmico e outros factores. O meio é sempre
30 testado para níveis endógenos de qualquer citocina ou factor de crescimento o qual é considerado para administração intranasal, mas está livre de todos os factores e citocinas estudadas na data excepto insulina. O volume é suficiente

para proporcionar contacto com os fundos das unidades e suas posturas, mas a superfície apical do epitelio se deseja manter em contacto directo com o ar. Se usam pinças estéreis nesta etapa e em todas as etapas subsequentes que envolvam a 5 transferencia de unidades a cavidades que contêm líquido para assegurar que não ficam presos entre os fundos das unidades e o meio.

O sistema de modelo EpiAirway™ se usou para avaliar efeito de cada GLP-1 que contêm a formulação em 10 TEER, viabilidade celular (ensaio MTT), citotoxicidade (ensaio LDH) e permeação. Estes ensaios se descrevem abaixo em detalhe.

Resistência Eléctrica Transepitelial (TEER)

Leram-se as medições TEER usando uma Câmara de 15 Medição de Resistencia do Tecido conectada a um Voltímetro Epitelial com o eletrodo guia, ambos de World Precision Instrumentos. Primero o TEER antecedente se leyó para cada inserto no dia que inicia o experimento. Depois de se ter lido o TEER, colocou-se 1 ml de meio fresco no fundo de cada 20 cavidade numa placa de 6 cavidades. As inserções drenaram-se em papel absorvente e colocaram-se em novas cavidades com meio fresco, assim como se mantêm os insertos numerados para correlacionarse com as medições de TEER antecedente. Se agregaron 100 ul de formulação experimental a cada inserto. 25 Os insertos se colocaron num incubador da agitação a 100 rmp e 37°C por 1 hora.

Os electrodos e um cetro branco do cultivo de tecido se equilibrarão por ao menos 20 minutos em meio fresco com a energia antes de verificar a calibração A 30 resistencia à antecedente se midió com 1.5 ml de meio na câmara de tecido Endohm e 300 µl de meio num inserto Millicell-CM blanco. O electrodo superior se ajustó de forma que se sumerge no meio mas no hace contacto com a superfície

superior da membrana do inserto. A resistencia antecedente do inserto blanco é 5-20 ohms. Para cada determinação TEER, se agregarão 300 µl do meio ao inserto seguido por uma incubação por 20 minutos a temperatura ambiente antes de
5 coloca-lo na câmara Endohm para leer o TEER. A resistencia se expresó como (resistencia medida-blanco) x 0.6 cm². Todos os valores TEER se reportarão como uma função da área da superficie do tecido.

TEER calculado como:

10
$$TEER = (R_I - R_b) \times A$$

em donde R_I é a resistencia do inserto com uma membrana, R_b é a resistencia do inserto blanco, e A é o área da membrana (0.6 cm²). Uma diminuição no valor TEER em relação ao valor controlo (controlo = aproximadamente 100
15 ohms-cm²; normalizado a 100) indica uma diminuição em resistencia da membrana celular e um aumento em permeabilidade da célula epitelial mucosal. Depois de 1 hora incubação se completó, os insertos do tecido se removieron do incubador. Se colocaron 200 µl de meio fresco em cada
20 cavidad de uma placa de 24 cavidades e os insertos do tecido se transfirieron à placa de 24 cavidades. Se agregaron suavemente 200 µl de meio fresco a cada inserto de tecido. Nuevamente se midió TEER para cada inserto.

Depois que os insertos do cultivo de tecido se
25 transfirieron da placa de 6 cavidades à placa de 2 cavidades, o meio basal se subdividió em três partes e se almacenaron em tubos eppendorf. Todas as três subdivisiones se colocaron a -80°C até o uso.

Ensaio de Lactato Deshidrogenasa (LDH)

30 A quantidade de muerte celular se sometió a ensaio midiendo a libertação de LDH das células usando um Kit de Ensaio de Citotoxicidad CytoTox 96, de Promega Corp. Realizaram-se as amostras por triplicado para cada inserto

de cultivo de tecido no estudo. Se cargaron 50 µl do meio colectado (almacenado a 4°C) em triplicado numa placa de 96 cavidades. Recientemente, se usó o meio livre de célula como um blanco. Se agregaron 50 µl de solução do seustrato (12 ml
5 de amortecedor de Ensaio agregado a uma garrafa reciente da Mistura do Sustrato, hecha de conformidade com o kit) a cada cavidad e as placas se incubaron por 30 minutos a temperaturàmbiente na oscuridad. Depois da incubação, se agregaron 50 µl de solução de detención a cada cavidad e as
10 placas se leyeron num lector de placa de densidad óptica µQuant a 490 nm usando o software KCJr.

Ensaio MTT

A viabilidade celular de cada inserto de cultivo de tecido se probó por ensaio MTT. A viabilidade celular se
15 valoró usando o ensaio MTT (Kit MatTek, MTT-100). Este kit mida recuperación e transformación de sal de tetrazolio ou tinte de formazan. O concentrado de MTT se descongeló e diluyó com o meio a uma proporción de 2 ml de MTT: 8 ml do meio. O concentrado de MTT diluido se pipeteo (300 µl) numa
20 placa de 24 cavidades. Os insertos do tecido se secaron suavemente, se colocaron nas cavidades da placa, e se incubaron por três horas na oscuridad a 37°C. Depois da incubação, cada inserto se removió da placa, suavemente manchados e se colocaron numa placa de 24 cavidades por
25 extracción. Os insertos do cultivo celular depois se sumergieron e 2.0 ml da solução extractante por cavidad (para completamente cubrir àmostra). A placa de extracción se cubrió e se selló para reducir a evaporación do extractante. Depois de uma incubação durante a noche a
30 temperaturàmbiente na oscuridad, o líquido dentro de cada inserto se decantó nuevamente na cavidad da qual se tomó, e os insertos se desecharon. A solução extractante (50 µl) de cada cavidad se pipeteo por triplicado em placas de

microtitulador de 96 cavidades, junto com os blancos extraídos e se diluyó com adición de 150 µl de solução extractante fresca. A densidad óptica das amostras se midió a 550 nm num lector de placa de densidad óptica µQuant usando o software KCJr.

Ensaio de Permeação de Tecido

A quantidade de GLP-1 (7-36) que pasa da superfície apical à superfície basolateral da monocapa de célula epitelial EpiAirway™ representa o grau de permeação GLP-1. A quantidade de proteína GLP-1 encontrada na superfície basolateral das células cultivadas se miden peloISA. O kit ELISA amida (7-36) GLP-1 se adquirió de Linco Research, (St. Charles, MI). O ensaio ELISA realizou-se de conformidade com o protocolo do fabricante. As amostras colectadas se diluyeron com amortecedor de ensaio proporcionado com o kit. Realizaram-se varias rondas de selección in vitro. Se calculó o percentagem de permeação diluyendo a quantidade medida de GLP-1 encontrado no lado basolateral das células como se midió peloISA pela quantidade total de material de partida GLP-1 que se agregou ao lado apical das células multiplicadas por 100. Primero, realizou-se um esboço do estudo do experimento (DOE) usando diferentes quantidades de excipientes EDTA, M-β-CD e DDPC. O resumo dos resultados se proporciona na Tabela 5. Todas as formulações que contêm um ou mais excipientes mostram melhoramiento em permeação sobre o controlo sem excipientes (#3).

Tabela 5:

Estudo de Permeação *in vitro* de GLP-1

#	GLP-1 (mg/mL)	DDPC (mg/mL)	EDTA (mg/mL)	M-β-CD (mg/mL)	Amortecedor Citrato (mM)	Lactose (mM)	Sorbitol (mM)	NaCl (mM)	TEER (ohms*cm2)	MTT (%)	LDH (%)	Permeação (%)
---	------------------	-----------------	-----------------	-------------------	-----------------------------	-----------------	---------------	-----------	--------------------	---------	---------	------------------

1	5	0.1	1	0	10	25	100	0	16	111	6	2.8
2	5	0.5	1	0	10	25	100	0	7	116	5	2.7
3	5	1	1	0	10	25	100	0	7	108	5	1.3
4	5	0.1	2.5	0	10	25	100	0	6	122	7	2.0
5	5	0.5	2.5	0	10	25	100	0	5	119	7	1.4
6	5	1	2.5	0	10	25	100	0	3	108	6	1.6
7	5	0.1	5	0	10	25	100	0	3	128	6	2.5
8	5	0.5	5	0	10	25	100	0	3	126	7	2.6
9	5	1	5	0	10	25	100	0	2	111	6	1.4
10	5	0.1	1	22.5	10	25	100	0	14	119	15	3.2
11	5	0.5	1	22.5	10	25	100	0	7	97	25	10.3
12	5	1	1	22.5	10	25	100	0	31	94	11	2.5
13	5	0.1	2.5	22.5	10	25	100	0	6	117	15	8.7
14	5	0.5	2.5	22.5	10	25	100	0	4	95	23	6.9
15	5	1	2.5	22.5	10	25	100	0	3	96	30	8.3
16	5	0.1	5	22.5	10	25	100	0	4	111	8	5.6
17	5	0.5	5	22.5	10	25	100	0	3	99	11	8.3
18	5	1	5	22.5	10	25	100	0	7	79	20	7.9
19	5	0.1	1	45	10	25	100	0	17	96	19	4.3
20	5	0.5	1	45	10	25	100	0	15	88	13	6.8
21	5	1	1	45	10	25	100	0	7	77	36	8.9
22	5	0.1	2.5	45	10	25	100	0	3	99	29	10.9
23	5	0.5	2.5	45	10	25	100	0	4	108	24	8.9
24	5	1	2.5	45	10	25	100	0	3	92	29	9.4
25	5	0.1	5	45	10	25	100	0	3	104	27	8.2
26	5	0.5	5	45	10	25	100	0	2	85	37	8.1
27	5	1	5	45	10	25	100	0	3	74	54	8.4
28	5	0	5	0	10	0	0	0	2	126	10	5.0
29	5	0	10	0	10	0	0	0	33	114	10	6.5
30	5	0	0	0	10	25	100	0	106	116	4	0.6
31	5	0	0	0	10	0	0	140	143	105	2	0.07

As formulações farmacêuticas intranasais testadas em estudos TEER *in vitro* adicional, MTT, LDH e % de permeação se mostram na Tabela 6. Os resultados de TEER, MTT, LDH e permeação para estas formulações se resumo na Tabela 7.

5 Tabela 6:

Formulações GLP-1 Testadas *in vitro*

Amostra #	GLP-1 (mg/mL)	DDPC (mg/mL)	EDTA (mg/mL)	Mg EDTA (mg/mL)	MβCD (mg/mL)	Amortecedor Citrato (mM)	Lactose (mM)	Sorbitol (mM)	NaCl (mg/mL)	pH
1	2	1	1	0	45	10	25	100	0	3.5
2	2	1	1	0	45	10	0	0	0	3.5
3	2	0	0	0	45	10	0	0	0	3.5

4	2	1	0	0	45	10	0	0	0	3.5
5	2	0	1	0	0	10	0	0	0	3.5
6	2	0	10	0	0	10	0	0	0	3.5
7	2	0	0	10	0	10	0	0	0	3.5
8	2	0	0	10	0	10	0	0	0	5
9	2	0	0	1	0	10	0	0	0	3.5
10	2	1	0	1	45	10	0	0	0	3.5
11	2	1	0	10	45	10	0	0	0	3.5
12	2	1	10	0	45	10	0	0	0	3.5
13	2	0	0	0	0	10	0	0	140	3.5
Média	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n/a
LDH Contr olo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n/a

Tabela 7

Resumo de Resultados GLP-1 *in vitro*

Amos tra #	pH actual	Apariencia (T = 0)	% de redução TEER	% MTT	% LDH	Permeation		
						Ve zes de aument o em controlo	% Pro m	% Desv esta d.
1	3.45	Clear and Colorless	98	86	20	202	4.9	0.6
2	3.49	Clear and Colorless	98	85	19	310	7.4	0.3
3	3.42	Clear and Colorless	95	100	8	86	2.1	0.4
4	3.45	Clear and Colorless	95	90	9	74	1.8	0.3
5	3.41	Clear and Colorless	98	120	8	112	2.7	0.2
6	3.75	Clear and Colorless	100	96	9	256	6.1	0.3
9	3.75	Clear and Colorless	96	115	10	88	2.1	0.6
10	3.79	Clear and Colorless	97	82	13	161	3.9	1.3
11	3.42	Clear and Colorless	99	88	11	89	2.1	0.7
12	3.78	Clear and Colorless	99	53	27	341	8.2	1.0
13	3.60	Clear and Colorless	37	109	6	1	0.0	0.0
Médi a	n/a	n/a	-35	100	6	n/a	n/a	n/a
LDH Cont rolo	n/a	n/a	100	1	100	n/a	n/a	n/a

Uma diminuição medida em valor relativo TEER para o controlo indica uma diminuição em resistencia da membrana

celular ou noutras palavras o pasaje de especies iónicas do lado apical ao basolateral da monocapa epitelial. Os dados presentados na Tabela 7 indicam que todas as formulações intensificadoras significativamente reducen TEER comparadas às formulações controlo.

O ensaio MTT mida viabilidade celular assim como o ensaio LDH mida citotoxicidad. Os ensaios se usam em combinação para determinar o efeito de formulações farmacêuticas em célula "saludable". Os resultados MTT e LDH ambos são expresados como porcentajes. Se calculó o percentagem MTT dividiendo o valor de MTT medido para cada formulação pelo valor MTT da formulação controlo multiplicado por 100. Assim, o controlo positivo MTT é 100% e serve como a comparação de línecom base para todas as outras formulações. Um valor MTT abaixo do 80% representa um efeito negativo em viabilidade celular. Similarmente, se calculó o percentagem LDH dividiendo o valor LDH para cada formulação pelo valor LDH da formulação controlo multiplicado por 100. Assim, o controlo positivo LDH é 100% e serve como a comparação de línecom base para todas as outras formulações. Os resultados do ensaio MTT indica que todas mas uma formulação (#12 na Tabela 7) no reduz a viabilidade celular abaixo do 80%. Estes dados são além disso reportados pelo ensaio de citotoxicidad LDH amostra que uma maioria das formulações no amostras níveis significantes de citotoxicidad.

A permeação do tecido GLP-1 é expresada como % de permeação uma vez incrementa sobre a formulação controlo (amostra #13). As vezes incrementadas sobre o controlo para o excipiente que contém formulações intensificadores de permeação GLP-1 de aproximadamente 74 vezes até 341 vezes sobre o controlo. Estes dados indicam que a inclusión dos excipientes DDPC, EDTA e M- β -CD significativamente melhorà

permeação de GLP-1 através da monocapa de célula epitelial. Da tabela 7, as formulações #1, #2, #6 e #12 resultam em >200 vezes melhoramento do % de permeação sobre o controle sem excipiente (#13 na Tabela 17).

5 Em resumo, os dados *in vitro* indicam que a formulação farmacêutica ejemplar da presente invenção compreende 2 mg/ml de GLP, 10 mg/ml de EDTA e 10 mM de amortecedor Citrato (amostra #6 na Tabela 6), exibindo permeação GLP-1 maior intensificada e cualidades reducidas
10 de TEER assim como têm um efeito negativo mínimo em viabilidade celular. Assim, esta formulação representa um candidato ideal para a administração de GLP-1 através de uma superfície mucosal, por exempla administração de fármaco intranasal (IN), no tratamento de doenças humanas que
15 incluem obesidade e diabetes.

EXEMPLO 3

Comparação de Cinética de Permeação *in vitro* de Peptídeo-1 similar a Glucagon (GLP-1) Farmacêutico

O presente exemplo deamostra que a cinética de
20 permeação *in vitro* de formulações farmacêuticas GLP-1 são sensíveis à forma EDTA usada nas formulação. A tabela 8 abaixo ilustrá formação seleccionada no Sistema do Modelo EpiAirway *in vitro* por resistencia transepitelial (ensaio TEER), biodisponibilidade celular (ensaio MTT), lactato
25 deshidrogenasa (ensaio LDH; muerte celular) e permeação de tecido. Todas as amostras contêm 2 mg/ml de GLP-1 excepto as amostras #9 e #19 as cales sirven como controles. Cada formulação se realizan a um volume total de 0.5 ml e se avalia por triplicado (n = 3). Cadâmostra se evalúo de
30 conformidade com os protocolos descritos em detalhe abaixo no Exemplo 2.

TABELA 8 : FORMAS DIFERENTE S QUE CONTÊM FORMULAÇÕ ES DE EDTA SELECCION ADO PARA INTENSIFI CADORES DE PERMEAÇÃO GLP- 1AMOSTRA	COMPOSIÇÃO	COMENTARIOS
1 (N =3)	2 MG/ML GLP-1 (0.6 MM), 45 MG/ML M-B-CD, 1 MG/ML EDTA, 1 MG/ML DDPC, 10 MM CITRATO (PH 3.5), 25 MM LACTOSE, 100 MM SORBITOL	
2 (N =3)	2 MG/ML GLP-1, 10 MG/ML EDTA, 10 MM AMORTECEDOR CITRATO (PH 3.5)	10 MG/ML EDTA COMO INTENSIFICADOR E HIPOTÔNICO (~50 MOSM/KG)
3 (N =3)	2 MG/ML GLP-1, 10 MG/ML EDTA, 0.1 MG/ML DDPC, 10 MM AMORTECEDOR CITRATO (PH 3.5)	O MESMO COMO #2 COM 0.1 MG/ML DDPC COMO INTENSIFICADOR ADICIONAL
4 (N =3)	2 MG/ML GLP-1, 10 MG/ML ZN EDTA, 10 MM AMORTECEDOR CITRATO (PH 3.5)	O MESMO COMO #2 MAS COM ZN EDTA
5 (N =3)	2 MG/ML GLP-1, 10 MG/ML MG EDTA, 10 MM AMORTECEDOR CITRATO (PH 3.5)	O MESMO COMO #2 MAS COM MG EDTA
6 (N =3)	2 MG/ML GLP-1 (0.6 MM), 45 MG/ML M-B -CD, 1 MG/ML ZN EDTA, 1 MG/ML DDPC, 10 MM CITRATO (PH 3.5), 25 MM LACTOSE, 100 MM SORBITOL	O MESMO COMO #1 MAS COM ZN EDTA
7 (N =3)	2 MG/ML GLP-1 (0.6 MM), 45 MG/ML M- B -CD, 1 MG/ML MG EDTA, 1 MG/ML DDPC, 10 MM CITRATO (PH 3.5), 25 MM LACTOSE, 100 MM SORBITOL	O MESMO COMO #1 MAS COM MG EDTA
8 (N =3)	2 MG/ML GLP-1, 10 MM CITRATO (PH 3.5), 150 MM NACL	CONTROLO NEGATIVO GLP-1 (SEM INTENSIFICADORES)
9 (N =3)	MEIO MATTEK	CONTROLO POSITIVO MTT; CONTROLO

		NEGATIVO LDH; CONTROLO NEGATIVO TEER
10 (N =3)	9% OCTILFENOLPOLI(ETILENGLICOLÉTER)X (TRITONX-100™) (CONTROLO POSITIVO LDH; CONTROLO POSITIVO TEER; CONTROLO NEGATIVO MTT)	

Abreviaturas:

M- β -CD = metil-beta-ciclodextrina, EDTA = edetato de di-sódio, DDPC = L- α -fosfatidilcolina didecanoil, CB = clorobutanol, Mg EDTA = sal de magnésio de di-sódio EDTA; Zn
 5 EDTA = sal de zinc de di-sódio EDTA; MTT = ensaio MTT; LDH = ensaio LDH; TEER = resistencia transepitelial.

Resultados

Se amostra o efeito de formulações farmacêuticas que compreendem agentes para melhorar a administração
 10 intranasal, por exemplo, os excipientes DDPC, EDTA e M- β -CD em Membrana Celular EpiAirway™ (capa celular epitelial da mucosa). Os resultados de cinética de permeação se resume abaixo na Tabela 9 e representam medições tomadas numa hora depois que as células se incubaron com as formulações
 15 mostradas na Tabela 8.

Tabela 9

Resultados de cinética de permeação para Formulações GLP-1 que contêm Sais EDTA diferentes

Amostra #	Redução TEER %	MTT (%)	LDH (%)	Permeação (%)	Controlo Sobre o Aumento de Vezes de Permeação
1	3	89	3	5.3	83
2	1	123	1	3.2	50
3	1	107	3	2.6	41
4	11	109	3	1.0	16
5	1	123	4	5.5	88
6	7	85	8	2.0	31
7	5	100	9	4	63
8	28	109	3	0.1	1
9	109	88	1	N/A	N/A
10	0	1	100	N/A	N/A

Os dados precedentes indicaron que varias formas de

sais EDTA podem ser usadas em formulações farmacêuticas para manipular as cinéticas de permeação do fármaco.

EXEMPLO 4

Estabilidade do GLP-1

5 OU presente exemplo demonstra que os pequenos excipientes da molécula, por exemplo M- β -CD, EDTA e DDPC, não promovem a estabilidade física do GLP-1 na formulação farmacêutica. No exemplo imediato, a estabilidade do GLP-1 foi avaliada com as duas formulações descritas em baixo na
10 Tabela. OU propósito do exemplo imediato foi determinar se ou aquecimento do GLP-1 provocã degradação proteica.

Tabela 10

Formulações destabilidade do GLP-1

Amostra	Composição	Teste
1 (50 mL)	45 mg/mL M- β -CD, 1 mg/mL EDTA, 1 mg/mL DDPC, 10 mM citrato (pH 3,5), 25 mM lactose, 100 mM sorbitol	pH, Aparência, DSC
2 (50 mL)	10 mM citrato (pH 3,5)	pH, Aparência, DSC

Foi efectuada uma experiência de calorimetria de rastreamento diferencial (DSC) com um novo rastreamento nãmostra #1 da
15 Tabela 10; amostra foi rastreada de 5 $^{\circ}\text{C}$ a 100 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de rastreamento de 60 $^{\circ}\text{C}$ /hora. Os dados foram colocados em gráfico como Cp (cal/ $^{\circ}\text{C}$) v. temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Um pico de transição águado é observado perto dos 35 $^{\circ}\text{C}$ no primeiro rastreio de calor. OU ruído depois da transição e grande
20 diminuição na capacidadee daquecimento entre 80 e 90 $^{\circ}\text{C}$ sugerem a formação dagregados. Observou-se que a solução estava ligeiramente nebulosãpós os rastreios, suportando a formação de um precipitado. OU pico de transição é muito mais estreito do que ou esperado para ou desdobramento de um
25 peptídeo, ou que poderá ser resultado dagregação imediatamente após ou desdobramento do peptídeo. Estes dados indicam que ou GLP-1 começã desnaturar e/ou formãgregados na

formulação a, ou perto dos 35°C.

Foi efectuada uma experiência DSC com novo rastreamento nãmostra #2; àmostra foi rastreada de 5 a 100°C a uma taxa de rastreamento de 60°C/hora. Os dados foram colocados em gráfico como Cp (cal/°C) vs. temperatura (°C). Foi observado um pico muito amplo perto dos 46°C no primeiro rastreio. A grande diminuição na capacidadee daquecimento entre os 80 e 90°C poderá dever-se à formação dagregados. No entanto, a solução não pareceu nebulosà seguir aos rastreios sugerindo agregados muito pequenos. Estes dados indicam que ou GLP-1 começà desnaturar e/ou formàgregados na formulação a, ou perto dos 46°C. Estes dados indicam que àdição de excipientes como descrito na Tabela 10 em cima à formulação do GLP-1 não aumentà sua estabilidade física.

EXEMPLO 5

Avaliação Farmacocinética (PK) da administração Intranasal e Intravenosa de um Peptídeo-1 Semelhante ao Glucagon (GLP-1) em Formulações Farmacêuticas Seleccionadas em Coelhos

OU presente exemplo demonstra que a biodisponibilidade do GLP-1 através de administração intranasal é significativamente aumentada pela inclusão de um inibidor da dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV), por exemplo Lis(4-nitro-Z)-pirrolidida, na formulação farmacêutica.

Foi efectuado um estudo farmacocinético (PK) em coelhos paràvaliar as propriedades farmacocinéticas do plasma do GLP-1 com várias formulações administradas através de entrega intranasal (IN) versus infusão intravenosa (IV). A concepção global do estudo é apresentada em baixo na Tabela 11. As formulações de 1 a 4 representam as formulações IN enquanto a formulação 5 representà formulação infusionada por IV.

Tabela 11

Concepção Global do Estudo parà Avaliação Farmacocinética

Grupos de Estudo	Animais	Via de administração (Formulação)	Conc. GLP-1 (mg/mL)	Dose Volume (mL/kg)	GLP-1 Nível de Dose (µg/kg)
#1	5M	Intranasal (Formulação 1)	5	0.015	75
#2	5M	Intranasal (Formulação 2)	5	0.015	75
#3	5M	Intranasal (Formulação 3)	5	0.015	75
#4	5M	Intranasal (Formulação 4)	5	0.015	75
#5	5M	Intravenosa (Formulação 5)	0.075	0.1	7.5

Neste estudo, foram usados coelhos Brancos da Nova Zelândia (Hra: (NZW) SPF) como cobaias paràvaliar a farmacocinética do plasma do GLP-1 por administração intranasal e infusão intravenosa. Os coelhos foram escolhidos como cobaias animais para este estudo devido ao perfil farmacocinético derivado de um fármaco administrado aos coelhos que tem grandes semelhanças com ou perfil PK para ou mesmo fármaco nos humanos.

Foram avaliadas quatro formulações intranasais e uma formulação intravenosa de GLP-1 no estudo. A composição do veículo para cada formulação é fornecida na Tabela 12. As formulações intranasais e intravenosas de GLP-1 foram fabricadas para preparação final e teste.

Para cada uma das soluções de dosagem, os componentes foram fornecidos em duas partes, Parte A e Parte B (ver Tabela 12). A formulação final para cada um dos grupos intranasais (Grupos 1 a 4) foi criada misturando volumes iguais da Parte A (1 mL) e da Parte B (1 mL). Para ou grupo intravenoso (Grupo 5), foram misturados 1,5 mL da Parte A e 3,5 mL da Parte B. As soluções de dosagem finais para todos os grupos foram usadas até 6 horas após a preparação.

Tabela 12

Composição do Veículo para Formulações de GLP-1 1 a 5

Componente	Concentração		
	Parte A	Part	Final

			e B	
Formulação 1	GLP-1	10 mg/mL	N/A	5 mg/mL
	Citrato	20 mM	N/A	10 mM
	EDTA	20 mg/mL	N/A	10 mg/mL
	Lis(4-nitro-Z)-pirrolidida	N/A	50 mM	25 mM
	pH = 3,5			
Formulação 2	GLP-1	10 mg/mL	N/A	5 mg/mL
	Citrato	20 mM	N/A	10 mM
	PN159	100 µM	N/A	50 µM
	Lis(4-nitro-Z)-pirrolidida	N/A	50 mM	25 mM
	pH = 3,5			
Formulação 3	GLP-1	10 mg/mL	N/A	5 mg/mL
	Citrato	20 mM	N/A	10 mM
	EDTA	20 mg/mL	N/A	10 mg/mL
	Lis(4-nitro-Z)-pirrolidida	N/A	30 mM	15 mM
	pH = 3,5			
Formulação 4	GLP-1	10 mg/mL	N/A	5 mg/mL
	Citrato	20 mM	N/A	10 mM
	EDTA	20 mg/mL	N/A	10 mg/mL
	pH = 3,5			
Formulação 5	GLP-1	0.25 mg/mL	N/A	0.075 mg/mL
	Citrato	2 mM	N/A	0.6 mM
	EDTA	2 mg/mL	N/A	0.6 mg/mL
	Cloreto de Sódio	300 mM	N/A	90 mM
	Lis(4-nitro-Z)-pirrolidida	N/A	5 mM	3.5 mM
	pH = 3,5			

A concentração de GLP-1 foi constante entre as quatro formulações intranasais. A concentração de citrato e ou pH foram também consistentes entre as quatro formulações. A concentração de EDTA foi consistente paràs formulações 1,3 e 4. A formulação 2 continha PON159, um modulador de junção estreita que foi mostrado previamente que aumenta entrega de peptídeos através de uma camada de células epiteliais, mas não continha EDTA. A formulação 5 continha citrato, EDTA, e cloreto de sódio, cada qual na concentração apropriada para administração intravenosa; além disso a concentração de GLP-1

foi diminuída para fornecer uma dose total de GLP-1 que fosse 10% da dose intranasal.

OU lis(4-nitro-Z)-pirrolidida é um inibidor específico da dipeptil aminopeptidase (DPP) IV, a enzima principal responsável pelo metabolismo do GLP-1 (fragmento aminoácido 7-36) num metabolito inativo (fragmento aminoácido 9-36). Parâvaliação neste estudo, as concentrações de Lis(4-nitro-Z)-pirrolidida variaram para cada um dos grupos de dose intranasal com a excepção da concentração igual entre a Formulação 1 e Formulação 2. A dose total de Lis(4-nitro-Z)-pirrolidida foi aproximadamente 0,04 mmoles/kg para os grupos 1 e 2 (grupos intranasais) e para o grupo 5 (grupo intravenoso). *Método de Ensaio do GLP-1*

Foram testadas amostras do estudo, padrões, e amostras do controlo de qualidade com um Kit ELISA (Linco Research Inc. Catalog # EGLP-35K) Glucagon Like Peptide-1 (Active). Cada amostra foi analisada em duplicado.

Este ensaio é baseado na captura do GLP-1 ativo (fragmentos 7-36 e 7-36amida) por um anticorpo monoclonal (específico da região terminal N) imobilizado nas cavidades de uma placa de microtitulação 96 cavidades, e detecção através de um segundo anticorpo anti GLP 1 etiquetado alcalino fosfatase. Após lavagem, é adicionado metil umbeliferil fosfato a cada cavidade, ou qual na presença da fosfatase alcalina forma ou produto fluorescente umbeliferona. A quantidade de fluorescência gerada é directamente proporcional à concentração do GLP-1 ativo numa amostra desconhecida, e isto foi derivado por interpolação a partir de uma curva de referência usando padrões de referência de concentrações conhecidas de GLP-1 ativo.

Devido à semelhança das espécies entre o GLP-1 humano e do coelho, antecipou-se que o ensaio iria detectar GLP-1 endógeno ativo (isto é, coelho). Os níveis endógenos do GLP-1

do coelho são medidos no tempo 0. OU fragmenton GLP-1 9-36 não foi detectado pelo ensaio, independentemente da fonte.

Avaliação Farmacocinética

Os cálculos farmacocinéticos foram efectuados usando software WinNonlin (Pharsight Corporation, Versão 4.0, Mountain View, CA) e um modelo não compartimental de administração extravascular. Os parâmetros parâvaliação estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13

10 Parâmetros Farmacocinéticos

Kel	A constante de taxa de fase terminal aparente, onde Kel é a magnitudee da inclinação da regressão linear da concentração do registo versus perfil de tempo durante a fase terminal.
$t_{1/2}$	Semi-vidãparente da fase terminal (sempre que possível), onde $t_{1/2}=(\ln 2)/Kel$
T_{max}	Tempo até à concentração máxima do fármaco observada no sangue do indivíduo
C_{max}	Concentração máxima do fármaco observada no sangue do indivíduo
T_{max}	Tempo até à concentração máxima do fármaco observada no sangue do indivíduo
AUC_{last}	Área sob a curva concentração-tempo a partir de $t=0$ (antes da dosagem) a tempo t , calculadatravés da regra trapezoidal linear, onde t é ou ponto temporal da última concentração mensurável.
CL/CL_F	Clearance. $CL= Dose/AUC$. Para modelos extravasculares a fração da dose absorvida pode não ser estimada, por isso a Clearance para estes modelos é actualmente CL_F onde F é a fração da dose (biodisponibilidade) absorvida.

Análise dos Parâmetros Farmacocinéticos

Os dados farmacocinéticos médios do GLP parnos grupos intranasal e intravenoso são fornecidos na Tabela 14.

As concentrações pré-dosagem (linha de base) do GLP-1 endógeno no soro ou plasma estava geralmente abaixo dos 10 pg/mL. Parãlguas amostras, as limitações no volume damostra precluíram análises repetidas para obter resultados definitivos. Foi reportado um valor de <4 pg/mL para estas amostras. Para calcular os valores médios do grupo e parã avaliação farmacocinética, os dados foram corrigidos na linha

de base quando adequado. Os resultados denotados por <NUMBER foram definidos a "<NUMBER/2"; com estãbordagnum valor de <4 pg/mL foi definido a 2 pg/mL.

Os valores pós-dosagem individuais do plasmãanimal para ou
5 GLP-1 excederam ou valor de base de 10 pg/mL. No ponto de tempo final após infusão intravenosa (90 minutos) as concentrações plasmáticas de GLP-1 estava no ou perto dos valores de linha de base indicamdo que as fases de infusão e
10 eliminação foram captadas pela enquandramento temporal dãmostragem para ou estudo. Após a instilação intranasal, vários animais tinham concentrações plasmáticas de GLP-1 que excediam os níveis da linha de referência. ÀUC_{inf} foi determinada para estimar ou perfil de exposição total para ou GLP-1.

15 Tabela 14

Parâmetros Farmacocinéticos Médios para GLP-1 no Plasma de Coelhos Macho Após Instilação Intranasal (Grupos 1-4) e Intravenosa (Grupo 5)

Grupo	Dose (µg/kg)	K _{el} (1/min)	t _{1/2} (min)	T _{max} (min)	C _{max} (pg/mL)	AUC _{último} (min*pg/mL)	AUC _{inf} (min*pg/mL)	CL _F (ml/min/kg)
1	75	0.0136	55.5	11.0	844.9	20792.7	32415.9	3032.8
2	75	0.0110	66.8	43.0	424.0	17069.8	33324.4	2716.0
3	75	0.0259	39.3	25.0	283.9	9331.5	13232.7	6977.0
4	75	0.0328	22.4	47.0	154.5	7054.7	5743.4	15316.0
5	7.5	0.0243	30.9	6.3	3183.6	28883.2	29149.5	259.8

Formulação 1/Grupo 1

20 As concentrações pico de GLP-1 (T_{max}) ocorreram entre os 5 e 20 minutos (média do grupo de 11 minutos) após administração da dose. A média C_{max} do grupo foi de 844,9 pg/mL. As concentrações plasmáticas permaneceram acima da linha de referência 90 minutos após a dose, indicamdo que a eliminação
25 não estava completa nestãltura. Isto é reflectido nãUC_{last}

média de 20792,7 min*pg/mL e AUC_{inf} de 32415,9 min*pg/mL. A semi-vida terminal média ($t_{1/2}$) estimou-se ser de 55,5 minutos.

Formulação 2/Grupo 2

5 A C_{max} média do grupo 2 se estimó ser 424.0 pg/ml. A T_{max} mediu se estimó ser 43 minutos; não obstante, existe considerable variabilidade inter-animal para este parâmetro. O examen das concentrações contra perfil de tempo para estes animais indica uma fase da absorção (aumentada) e eliminação
10 (diminuição). AUC_{ultima} do grupo 2 é 17,069.8 min*pg/ml. Uma $t_{1/2}$ no deve ser estimada devido a ausência de uma fase de eliminação clara em dos animais dentro do grupo. Não obstante, em base nos dados colectados nos animais restantes no grupo, a $t_{1/2}$ média é 66.8 minutos. AUC_{inf} média (três
15 animais nos quais K_{el} deve ser determinado) é 33,324.4 min*pg/ml.

Formulação 3/Grupo 3

A C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$ e AUC_{ultima} média do grupo 3 são 283.9 pg/ml, 25 minutos, 39.3 minutos, e 9331.5 min*pg/ml,
20 respectivamente. Um K_{el} exacto, e assim $t_{1/2}$ no pode ser terminada porque um animal no grupo têm uma maior que o valor esperado em 60 minutos. Assim, este valor não se inclui na $t_{1/2}$ média do grupo de 39.3 minutos e AUC_{inf} meio do grupo de 13,232.7 min*pg/ml.

25 Formulação 4/Grupo 4

A C_{max} média para o grupo 4 se estimó ser 154.5 pg/ml. A T_{max} média do grupo é 47 minutos, não obstante, dos animais, têm suas maiores concentrações de plasma medidas de GLP-1 a 90 minutos. Nenhum K_{el} de fase de eliminação aparente
30 (e $t_{1/2}$) e AUC_{inf} no deve ser determinado para estes animais. A $t_{1/2}$ média e AUC_{inf} nos outros três animais se estimam ser 22.4 minutos e 5734.4 min*pg/ml, respectivamente.

Formulação 5/Grupo 5

Durante o procedimento de infusão, um animal do grupo 5 experimenta uma falla mecânica com o aparato de bombeo, o qual resultó em ~100 μ l adicionais ser ministrados entre os 5 e 10 minutos pontos de tempo. Isto se reflete no valor de concentração de 10 minutos de >5000 pg/ml. Como as condições exactas para infusão ou deben ser determinadas, os dados para este animal não se incluem na avaliação de farmacocinética para o grupo 5.

A C_{max} média para infusão intravenosa de 10 minutos é 3183.6 pg/ml. Três animais têm uma T_{max} a 5 minutos e um animal tem uma T_{max} a 10 minutos; ainda as concentrações de GLP-1 são geralmente similares nos pontos de tempo de 5 e 10 minutos para todos os quatro animais. Uma $t_{1/2}$ terminal para o grupo se estimó ser 30.9 minutos. AUC_{ultima} média de 28,883.2 min*pg/ml capturá maioria do perfil de exposição, como AUC_{inf} é únicamente ligeiramente maior, 29,149.5 min*pg/ml.

O examen da concentração log contra perfil de tempo entre 10 minutos (fin da infusão) e 20 minutos, sugiere uma eliminação bifásica de GLP-1. A fase α mais rápida de um perfil bifásico é geralmente associada com distribuição e eliminação extravascular, assim como a fase β é mais lenta, se considera representar a eliminação terminal. O cálculo da relação de eliminação durante esta estrutura de tempo indica um $t_{1/2}$ inicial de 2 minutos ou menos. Esta $t_{1/2}$ inicial deve ser consistente com conseguir um estado estable aparente na última mitad do periodo de infusão de 10 minutos.

Biodisponibilidade

Se calculó a biodisponibilidade de GLP-1 depois da administração intranasal usando AUC_{ultima} ou AUC_{inf} ; estes estimados se proporcionam na Tabela 15. Nos grupos 1, 3 e 4 a concentração do inibidor Lys(4-nitro-Z)-pirrolidino na

formulação é 0 mM, 15 mM ou 25 mM respectivamente. Na ausência do inibidor, a biodisponibilidade de GLP-1 é aproximadamente 2% assim como a adição de 15 mM de Lys(4-nitro-Z)-pirrolidido na formulação (Grupo 3) incrementa a biodisponibilidade de GLP-1 até aproximadamente 3% até 5%. A biodisponibilidade de GLP-1 é além disso aumentada de aproximadamente 7% até 11% em adição de 25 mM de Lys(4-nitro-Z)-pirrolidido na formulação (Grupo 1).

O polipeptídeo PN159 se ha mostrado por incrementar a biodisponibilidade de peptídeos comparado a excipientes de molécula pequena. Quando se teste, a formulação 2 (Grupo 2) que contém PN159 e 25 mM de Lys(4-nitro-Z)-pirrolidido tem uma biodisponibilidade de GLP-1 aproximada de 6 até 11%, o qual é equivalente à biodisponibilidade observada para GLP-1 na presença de 25 mM de Lys(4-nitro-Z)-pirrolidido sem PN159. O PN159 tem o mesmo efeito como 10 mM de EDTA em 1N de biodisponibilidade de GLP-1

Tabela 15

Biodisponibilidade de GLP-1 em Coelhos Administrados com 75 µg/kg via Instilação Intranasal (7.5 µg/kg de Dose Intravenosa para Cálculo; Grupo 5)

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
AUC _{last} (min*pg/mL)	20792.7	17069.8	9331.5	7054.7	28883.2
Biodisponibilidade	7.2%	5.9%	3.2%	2.4%	N/A
AUC _{inf} (min*pg/mL)	32415.9	33324.4	13232.7	5743.4	29149.5
Biodisponibilidade	11.1%	11.4%	5.4%	2.0%	N/A

^a Biodisponibilidade = $\frac{[\text{Dose (Grupo 5)} \times \text{AUC}_{\text{xxx}} (\text{Grupo X})]}{[\text{Dose (Grupo X)} \times \text{AUC}_{\text{xxx}} (\text{Grupo 5})]} \times 100$.

A vida média terminal para GLP-1 é aproximadamente 30 minutos em coelho e mais longa que o anticipado em base nos reportes publicados que mostram uma vida média terminal de 10 minutos ou menos para ratazana ou humano (Parkes, D. et al., "Pharmacokinetic Actions of Exendin-4 in the rat:

Comparasion with Glucagon-like Peptide-1", Drug Development Research 53:260-267, 2001; Deacon C., Therapeutics Strategies Based on Glucagon-like Peptide-1, Perspectives in Diabetes 53:2181-2189, 2004. A $t_{1/2}$ para coelho é consistente
 5 entre cada um dos grupos e animais, e assim se reportó dentro do estudo.

O cálculo de $t_{1/2}$ terminal é dependente na porção da concentração log contrà curva de tempo usado para determinación do traslape (ver definición de Kel na Tabela
 10 13). Para o estimado descrito anteriormente, o programa de modelaje se deja para escoger o melhor ajuste parà estimación de Kel. A selección manual parà curva dajustamiento de 10 minutos (fin da infusão) até 90 minutos que indica uma vida média terminal no intervalo de 10 até 12
 15 minutos (dados no mostrados).

A separação proporciona um segundo meio paràvaliar a disposición de um fármaco depois da administração. A separação pode ser considerada como a capacidade intrínseca do corpo ou sus órgãos para remover um fármaco da sangue
 20 (Basic Ckinical Pharmacokinetics, 2da ed., Applied Therapeutics, Inc. Vancouver, Washington). Não obstante, neste caso, GLP-1 pode permanecer na sangue, mas se considera removido para fins de avaliação de separação. A razón para isto é que GLP-1 existe em dos diferentes
 25 estados: um estado ativo que consiste de um fragmento de peptídeo representado por aminoácidos 7-36 e um estado inativo, um resultado de metabolismo, que consiste de um fragmento de peptídeo representado por aminoácidos 9-36. Na conversión para o estado inativo, o GLP-1 se considera
 30 efetivamente eliminado do corpo. Como o ensaio usado neste documento para detectar GLP-1 é específico parà formàctiva de GLP-1 (7-36), a presença da formàctiva de GLP-1 na sangue no interfere com a avaliação da separação de GLP-1.

Parnosgrupos intranasais, o valor de separação superior (CL-F) se nota para o Grupo 4 com uma média do grupo de 15,160.0 ml/min/kg. O valor meio para o grupo 3 é 6977.0 ml/min/kg. A separação é similar parnosGrupos 2 e 1, 2716.0 ml/min/kg e 3032.8 ml/min/kg, respectivamente. Como se espera, a separação estimada para cada grupo é inversamente proporcional à exposição sistêmica.

Os valores de separação para grupos intranasais também se ajustam para biodisponibilidade de GLP-1. A separação ajustada para Grupos 4 e 3 são 7580 ml/min/kg e 1395 ml/min/kg, respectivamente. Os valores de separação parnosgrupos 1 e 2, (~11% de biodisponibilidade para cada um) se determinaron ser 275 ml/min/kg e 247 ml/min/kg, respectivamente. A separação ajustada parnosGrupos 1 e 3 são similares à separação estimada de 259.8 ml/min/kg para o grupo de dose intravenosa (Grupo 5).

A dose total de Lys-(4-nitro-Z)-pirrolidido é aproximadamente 0.004 mMoles/kg por Grupos 1, 2 e 5. Os níveis do sangue de Lys(4-nitro-Z)-pirrolidido não se determinaron neste estudo, como tal a biodisponibilidade depois da administração intranasal no é conhecida. A presença de Lys(4-nitro-Z)-pirrolidido na formulação nasal têm o potencial para proteger o GLP-1 ativo, a partir do metabolismo dentro da mucosa nasal, e se assume que a biodisponibilidade razonable, dentro da circulação sistêmica. A protección do metabolismo pela mucosa nasal é consistente com uma $C_{\max}$ maior para GLP-1 quando Lys(4-nitro-Z)-pirrolidido está presente na formulação. Não obstante, como ambos fragmentos de GLP-1 são susceptíveis a cruza ou a circulação, um ensaio para GLP-1 total (fragmento de aminoácido 7-36 e 9-36) será requerido para confirmar se uma percentagem maior é GLP-1 ativo.

A proteção do metabolismo dentro do sangue é

indicada pela semelhança de valores de separação para GLP-1 entre o grupo intravenoso (Grupo 5) e os grupos intranasais com a concentração maior do inibidor (Grupos 1 e 2).

Resumo

5 Estes dados mostram o a descoberta surpreendente e inesperada que a administração de formulações farmacêuticas intranasais de GLP-1 com o inibidor DPP IV Lys(4-nitro-Z)-pirrolidido resulta em biodisponibilidade GLP-1 aumentada. Além disso, a biodisponibilidade GLP-1 é dependente da
10 concentração do inibidor na formulação. Na ausência do inibidor, a biodisponibilidade de GLP-1 é aproximadamente 2%. A inclusão de Lys(4-nitro-Z)-pirrolidido a 15 mM aumenta, a biodisponibilidade GLP-1 aproximadamente 5%, e com 25 mM Lys(4-nitro-Z)-pirrolidido, a biodisponibilidade
15 para GLP-1 é aproximadamente 11%. O potencial para inibição local (tecido nasal) e sistêmica do metabolismo de GLP-1 é indicado pelos dados obtidos.

A formulação com PN159, além disso a 25 mM de Lys(4-nitro-Z)-pirrolidido, também é investigada para
20 avaliar o potencial para maior biodisponibilidade com este modulador de ligação forte. Sob as condições deste estudo, o efeito de PN159 na biodisponibilidade de GLP-1 não é maior que o efeito de EDTA na formulação.

EXEMPLO 6

25 Formulações de GLP-1 em Estabilidade de Uso e Venda

Estabilidade "em uso" define-se como aqueles estudos que guardam uma formulação armazenada dentro de um frasco fixado com um acionador e atomizado em conformidade com o regime terapêutico apropriado (neste caso, três vezes
30 ao dia (TID)), e se colocam em temperaturas de armazenamento específicas. Frascos com acionadores são inicialmente cheios, mas não são cheios entre atomizações posteriores. A cebação define-se como atomização até que uma atomização

completa seja visualmente aparente, depois actuando uma ou mais vezes antes da dosagem. Os frascos são armazenados a 30°C/65% de humidade relativa (HR) todas as vezes e são atomizados dentro de 10 minutos depois de removê-los da câmara para cada dosagem. Os frascos são accionados três vezes ou uma vez ao dia, dependendo do regime seleccionado para cada estudo. O tempo entre cada atomização é ao menos 1 hora e anotaram-se as observações visuais/físicas.

Realizaram-se estudos em uso TID/30°C. As formulações usadas neste estudo contêm 5 mg/ml de GLP-1, 10 mg/ml de EDTA, 10 mM de amortecedor de Citrato (pH 3.5), e sem conservante. Os frascos foram cheios, fechados e accionados por TID, e foram armazenados a 30°C/65% de HR por 10 dias. A recuperação e pureza em uso de GLP-1 depois de 7 dias de TID de atomização se mostram na Tabela 16 e 17. A recuperação do peptídeo em uso é maior de $95 \pm 2.2\%$ por até 7 dias. A pureza do peptídeo total em uso é $98 \pm 2.1\%$ depois de 10 dias TID/30°C/65% HR.

Tabela 16

Recuperação em uso de GLP-1 depois de TID/30°C/65% de HR

Dias de Incubação	Concentração Peptídeo (ug/mL)				Recuperação de Peptídeo (%)			
	Frasco 1	Frasco 2	Promedio	STDEV	Frasco 1	Frasco 2	Promedio	STDEV
1	4663.3	4655.6	4659.4	5.4	93.3*	93.1*	93.2*	0.1*
2	4624.9	4616.1	4620.5	6.2	98.3 [†]	98.1 [†]	98.2 [†]	0.1 [†]
3	4523.1	4485.0	4504.0	26.9	96.1 [†]	95.3 [†]	95.7 [†]	0.6 [†]
4	4482.5	4361.9	4422.2	85.2	95.3 [†]	92.7 [†]	94.0 [†]	1.8 [†]
5	4517.0	4302.1	4409.6	152.0	96.0 [†]	91.4 [†]	93.7 [†]	3.2 [†]
6	4812.4	4542.3	4677.3	191.0	102.3 [†]	96.5 [†]	99.4 [†]	4.1 [†]
7	4557.9	4410.1	4484.0	104.5	96.9 [†]	93.7 [†]	95.3 [†]	2.2 [†]
8	2743.3	2471.8	2607.6	192.0	58.3 [†]	52.5 [†]	55.4 [†]	4.1 [†]
9	176.1 [†]	230.3 [†]	203.2	38.4	3.7 [†]	4.9 [†]	4.3 [†]	0.8 [†]
10	1944.6	512.7 [†]	1228.7	1012.4	41.3 [†]	10.9 [†]	26.1 [†]	21.5 [†]

* % da exigência da etiqueta

[†] % of T=0

[†] Valores estimados

Tabela 17

Pureza do GLP-1 Em Utilização Após TID/30°C/65% RH

Dias de Incubação	Pureza Total do Peptídeo (%)				Impurezas Maiores do Peptídeo por Área do Pico (%)			
	Frasco 1	Frasco 2	Promedio	STDEV	Frasco 1	Frasco 2	Promedio	STDEV
1	99.8	99.7	99.8	0.0	0.22	0.26	0.24	0.03
2	99.4	99.6	99.5	0.2	0.33	0.28	0.31	0.04
3	99.9	99.5	99.7	0.2	0.14	0.28	0.21	0.10
4	99.7	99.7	99.7	0.0	0.30	0.26	0.28	0.03
5	99.8	99.8	99.8	0.0	0.23	0.25	0.24	0.01
6	99.3	99.4	99.4	0.1	0.23	0.38	0.31	0.11
7	99.4	99.5	99.5	0.1	0.40	0.31	0.36	0.06
8	99.3	99.4	99.4	0.1	0.68	0.57	0.63	0.08
9	100.0	100.0	100.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00
10	99.6	96.6	98.1	2.1	0.40	3.43	1.92	2.14

Estudos de estabilidade "em venda" definem-se como aqueles estudos que guardam a formulação armazenada dentro de um frasco fechado (isto é, tapado), colocado em armazenamento específico e condições de temperatura acelerada (isto é, 5°C, 25°C, 40°C e/ou 50°C) por períodos especificados de tempo. Realizaram-se estudos de estabilidade em venda em formulações que têm resultados positivos das rondas de seleção *in vitro*. Elaboraram-se formulações e armazenaram-se a 5°C, 25°C e 35°C. A tabela 18 mostra as formulações que se testaram. Os resultados das formulações #5 e #6 (que contêm GLP-1 e EDTA) mostram que depois de 56 dias de armazenamento a recuperação de GLP-1 é 100% a 5°C, e >97% a 25°C e >90% a 35°C.

Tabela 18

Resumo das Formulações Testadas para Estabilidade

"em venda"

#	GLP-1 mg/mL	DDPC mg/mL	EDTA mg/mL	Mg EDTA mg/mL	MβCD mg/mL	Amortecedor de Citrato (mM)	Lactose (mM)	Sorbitol (mM)	BAK (%)	pH
1	5	1	1	0	45	10	25	100	1	3.5
2	5	1	1	0	45	10	0	0	1	3.5
3	5	0	0	0	45	10	0	0	1	3.5
4	5	1	0	0	45	10	0	0	1	3.5
5	5	0	1	0	0	10	0	0	1	3.5

6	5	0	10	0	0	10	0	0	1	3.5
7	5	0	0	10	0	10	0	0	1	3.5
8	5	0	0	0	0	10	0	0	1	3.5
9	5	0	0	10	0	10	0	0	1	5.2

Realizou-se um ensaio de estabilidade em venda no mesmo lote de formulação feito para o estudo em uso (5 mg/ml de GLP-1, 10 mg/ml de EDTA, 10 mM de amortecedor de Citrato (pH 3.5) e sem conservante). A formulação armazenou-se a 5°C.

5 Os resultados de estabilidade em venda se mostram abaixo nas Tabelas 19 até 20.

Tabela 19

Estabilidade em venda, Recuperação do GLP-1 em Armazenamento a 5°C

Dias de incubação	Concentração do Peptídeo (ug/mL)				Recuperação do Peptídeo (%)			
	Frasco 1	Frasco 2	Promedio	STDEV	Frasco 1	Frasco 2	Promedio	STDEV
9	4704.3	4706.0	4705.2	1.2	94.1*	94.1*	94.1*	0.0*
16	4625.3	4588.0	4606.6	26.4	98.3 [†]	97.5 [†]	97.9 [†]	0.6 [†]
30	4813.6	4650.4	4732.0	115.5	102.3 [†]	98.8 [†]	100.6 [†]	2.5 [†]
44	4676.0	4635.2	4655.6	28.8	99.4 [†]	98.5 [†]	98.9 [†]	0.6 [†]

10 Tabela 20

Estabilidade em venda, Pureza de GLP-1 em Armazenamento a 5°C

Dias de incubação	Pureza Total de Peptídeo (%)				Impureza Maior do Peptídeo por Área do Pico (%)			
	Frasco 1	Frasco 2	Promedio	STDEV	Frasco 1	Frasco 2	Promedio	STDEV
9	99.8	99.8	99.8	0.0	0.13	0.19	0.16	0.04
16	98.3	100.0	99.2	1.2	0.54	0.00	0.27	0.38
30	99.8	99.9	99.9	0.1	0.19	0.11	0.15	0.06
44	99.6	99.9	99.7	0.2	0.30	0.14	0.22	0.11

EXEMPLO 7

Farmacodinâmica *in vivo* de Formulações GLP-1 Intranasais

15 Três estudos compararam as ações de farmacodinâmica (PD) de GLP-1 (7-36) amida e exendin-4 sintético (exenatida) em glucose sanguínea depois da administração intranasal (IN) de GLP-1 na presença ou ausência do inibidor DPP-V ou injeção subcutânea (SQ) de exenatida. Os estudos realizaram-

se no modelo de ratazana ZDF da teste de tolerância à glucose oral (OGTT) usada em estudos em humano.

Avaliaram-se as ações de farmacodinâmica monitorizando os níveis de glucose sanguínea e insulina no sangue. Determinou-se a concentração de glucose na sangue usando um analisador Synchron CX4 e Kit de Reagente de Glucose apropriado (Beckman Coulter, Brea, CA USA). Determinaram-se os parâmetros de farmacocinética usando o software WinNonlin (Pharsight Corporation, Versión 5.01, Mountain View, CA). Determinou-se a concentração de insulina na sangue pelo ISA.

Determinou-se uma concentração de acetaminofeno em sangue usando um analisador Synchron CX4 e Kit de Reagente de acetaminofeno (Beckman Coulter, Brea, CA USA). Usou-se acetaminofeno como um marcador de esvaziamento gástrico porque o acetaminofeno geralmente tem absorção insignificante no estômago. O tempo de concentração do pico (T_{max}) e concentrações do pico (C_{max}) depois da administração da dose reflecte o tempo no qual ocorre o esvaziamento gástrico, e o perfil de esvaziamento gástrico (por exemplo, absorção na circulação sistémica depois da libertação do estômago) reflecte a duração do esvaziamento. O AUC reflecte a exposição total. O acetaminofeno administra-se no Estudo 2 e Estudo 3 para monitorizar o esvaziamento gástrico.

Estudo 1

O esboço do estudo completo para avaliação de valores de glucose em sangue e insulina no Estudo se resume na Tabela 21.

Tabela 21

Estudo 1: Esboço do Estudo de Farmacodinâmica (PD) e Designações de Grupo para Determinação de Glucose Sanguínea e Insulina

Grupo	Nº animais*	Tratamento	Via	Nível da dose (µg/kg)	Conc. da Dose de GLP-1 (µg/ml)	Dose relativo OGTT
1	5	Salina	IN	250	0	-10 minutos
2	5	GLP1:F1	IN	250	5000	-10 minutos
3	5	GLP1:F1	IN	250	5000	+20 minutos
4	5	GLP1:F2	IN	250	5000	-10 minutos
5	5	GLP1:F2	IN	250	5000	+20 minutos
6	5	GLP1:F3	IN	250	5000	-10 minutos
7	5	GLP1:F3	IN	250	5000	+20 minutos
8	5	Exenatida	SQ	3.0	5	-10 minutos

*Ratos ZDF Macho

Formulações para ratasanas tratadas com GLP-1 no Estudo 1 são F1 = 10 mg/ml de EDTA, 10 mM de amortecedor de Citrato (pH 3.5) SEM INIBIDOR; F2 = 10 mg/ml de EDTA, 10 mM de amortecedor de Citrato (pH 3.5) e 25 mM de H-Lys(4nitro-Z)pirrolidido (o inibidor está disponível comercialmente de Bachem)); e F3 = 10 mg/ml de EDTA, 10 mM de amortecedor de Citrato (pH 3.5) e 25 mM de L-prolina-boroprolina (Pro-boropro sintetizou-se com base na informação de Solicitação de Patente 2004/0229829 A1, Bachovchin, Willia, W. et ao.).

Os resultados PD para o estudo 1 se mostram na Tabela 22. O AUC(0-150) de glucose para ratasanas tratadas com formulações GLP-1 (p/ e p/ou inibidor DPP-IV) é ~15% inferior que exenatida em ratasanas tratadas com placebo. No estudo 1, a glucose se proporciona a 2 g/kg, assim como em estudos subsequentes a glucose se proporciona a 1 g/kg. Como um resultado, no Estudo 1, a redução de glucose observada é relativamente inferior que os outros estudos (por exemplo, AUC(0-150) de 0-16%) porque a provocação de glucose é maior. Para o estudo 1, o acetaminofeno não se dosifica para monitorizar o esvaziamento gástrico.

Tabela 22

Estudo 1: % de Redução Calculada em AUC de Glucose para GLP-1 comparada à Placebo e Exenatida

Grupo	Glucose AUC(0-60)	% de redução de Glucose AUC(0-60)	Glucose AUC(0-120)	% de redução de Glucose AUC(0-120)	Glucose AUC(0-150)	% de redução de Glucose AUC(0-150)
Placebo	22155	0	42915	0	49775	0
Forma 1; +20 min	19120	14	36250	16	43975	12
Forma 1; -10 min	17525	21	35015	18	41930	16
Forma 2; +20 min	19003	14	34723	19	41892	16
Forma 2; -10 min	14193	36	32673	24	42167	15
Forma 3; +20 min	18703	16	34603	19	42252	15
Forma 3; -10 min	14615	34	32945	23	42095	15
Exenatida	18815	15	39245	9	50190	-1

Não existe diferença na glucose sanguínea entre as formulações GLP-1 quando se administra +20 minutos depois da dose de glucose oral. Existe diferença no perfil de glucose sanguínea entre as formulações de GLP-1 com inibidor (F2 e F3) contra sem inibidor (F1) quando se administra antes da dose, -10 minutos. Ambas formulações que contêm um inibidor DPP-IV (F2 e F3) resultam num atraso em Cmax (de 45 até aproximadamente 120 minutos). Níveis significantes de GLP-1 atrasam o esvaziamento gástrico; o estudo de coelho PK mostrou um % de BA 5 vezes maior para a formulação de GLP-1 que contêm inibidor DPP-IV que sneste. No estudo 2, se agregou acetaminofeno a uma formulação que contêm um inibidor DPP-IV para comparar esvaziamento gástrico numa formulação GLP-1 sem inibidor.

Os dados de medições de insulina e glucose para o Placebo a -10 minutos, F1 de GLP-1 (sem inibidores) a -10 minutos e F1 de GLP-1 (sem inibidores a +20 minutos mostram um aumento de insulina maior com F1 de GLP-1 quando se administra seja entre -10 e +20 minutos em relação ao placebo.

Estudo 2

Submeteram-se a ensaio as ações PD de GLP-1 (amida

7-36) na presença ou ausência do inibidor DPP-IV em glucose sanguínea depois da instilação intranasal (GLP-1) num modelo de ratazana do OGTT no Estudo 2. O esboço do estudo completo para avaliação de glucose sanguínea e valores de insulina se
 5 resumo na Tabela 23. O estudo 2 de OGTT se condess como uma dose de 1g/kg do bolo de uma solução de glucose administrada por sonda oral. Se co-administrou acetaminofeno, a uma dose de 100 mg/kg dentro da solução de glucose. Para fins de registro do tempo o OGTT designou-se como 0 minutos em
 10 tempo.

Tabela 23

Estudo 2: Esboço OGTT de Farmacodinâmica e Designações de Grupo para Determinação de Glucose Sanguínea e Insulina

Grupo	Nº animais*	Tratamento	Via	Nível da dose (µg/kg)	Conc. Dose GLP-1 (µg/ml)	Dose relativo OGTT
1	5	Salino	IN	0	0	-10 minutos
2	5	GLP1:F1	IN	100	2000	-10 minutos
3	5	GLP1:F1	IN	250	5000	-10 minutos
4	5	GLP1:F1	IN	1000	20000	-10 minutos
5	5	GLP1:F3	IN	25	500	-10 minutos
6	5	GLP1:F3	IN	100	2000	-10 minutos
7	5	GLP1:F3	IN	250	5000	-10 minutos

* Ratazana ZDF

As formulações usadas no Estudo 2 incluem: F1 = 10 mg/ml de
 15 EDTA, 10 mM de amortecedor de citrato (pH 3.5) SEM INIBIDOR; F3 = 10 mg/ml de EDTA, 10 mM de amortecedor de citrato (pH 3.5) e 25 mM de L-prolina-boroprolina. A glucose sanguínea avaliou-se nos seguintes pontos de tempo: pré-OGTT e 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180 e 240 minutos pós-OGTT.
 20 Calculou-se a insulina sanguínea nos seguintes pontos de tempo: pré-OGTT e 15, 30, 60, 120 e 240 minutos pós-OGTT. Avaliaram-se os níveis do sangue APAP nos seguintes pontos de tempo: pré-OGTT e 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 e 180 minutos pós-OGTT. Os resultados do Estudo 2 mostram que
 25 existe uma redução em AUC de glucose (com base correcta)

comparada ao controlo, especialmente para formulações sem inibidor (F1). Ambas as formulações (F1 e F3) com e sem inibidor aumentam a insulina depois da dosagem. A dose a 1N de 100 ug/ml de GLP-1 mostrou que na presença do inibidor, 5 atrasou-se o esvaziamento gástrico. Aumentando a dose de GLP-1 a 1N também o esvaziamento gástrico é afectado sem a presença do inibidor. Quando o esvaziamento gástrico é atrasado devido a altas doses ou à presença do inibidor, a absorção de glucose atrasa-se. A tabela 24 mostra a 10 diferença AUC de glucose para grupos de tratamento comparados ao Placebo.

Tabela 24

Resumo de Diferenças em AUC de Glucose

Grupo	Diferença em AUC _{Clast} de Glucose do Placebo	Diferença em AUC _{Clast} de Glucose (líne com base correcta) do Placebo
100 µg/mL GLP1:F1	0.83	0.64
250 µg/mL GLP1:F1	0.89	0.79
1000 µg/mL GLP1:F1	0.89	0.71
25 µg/mL GLP1:F3	0.99	0.91
100 µg/mL GLP1:F3	0.92	0.82
250 µg/mL GLP1:F3	1.03	0.99

Estudo 3

15 No estudo 3, submeteram-se a ensaio as ações de farmacodinâmica (PD) de GLP-1 (amida 7-36) sem inibidor e exenatida em glucose sanguínea depois de instilação intranasal (GLP-1 ou salina) ou injeção subcutânea de exenatida num modelo de ratazana do OGTT. No estudo 3, se 20 usou uma formulação de GLP-1 que não tem inibidores DPP-IV (F1 = 10 mg/ml de EDTA, 10 mM de amortecedor de citrato (pH 3.5) SEM INIBIDOR). A meta principal do Estudo 3 é comparar F1 GLP-1 (IN) a exenatida (SQ). Avaliou-se PD monitorizando o nível de glucose sanguínea e insulina no sangue. 25 Administrou-se acetaminofeno para monitorizar o esvaziamento gástrico (do Estudo 2).

No Estudo 3 o OGTT conduziu-se usando uma dose de 1 g/kg do bolo de uma solução de glucose administrada por sonda oral. Quando é relevante, o acetaminofeno a uma dose de 100 mg/kg, coadministrou-se dentro da solução de glucose.

- 5 Para fins de registo do tempo, o OGTT designou-se como 0 minutos de tempo. O registo do tempo para a administração da dose de tratamento é relativo ao OGTT. A dose do tratamento única se administra a -10 minutos. Se conduz a dosagem das vezes, com a primeira dose a -10 minutos e a segunda dose a
- 10 +35 minutos. Portanto, a administração para dose por salina, GLP-1 ou exenatida ocorre a -10 minutos, +35 minutos ou -10 e +35 minutos, em relação ao OGTT.

- Recolheu-se sangue para análises de farmacodinâmica, que incluem cálculos AUC₀₋₂₄₀ e C_{max}.
- 15 Avaliou-se a glucose sanguínea nos seguintes pontos de tempo: pré-OGTT e pós-OGTT (5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180 e 240 minutos). Avaliou-se a insulina sanguínea pré-OGTT e pós-OGTT (5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 e 180 minutos). Avaliaram-se os níveis sanguíneos de acetaminofeno pré-OGTT
- 20 e pós-OGTT (15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 e 180 minutos). O esboço total para a avaliação do Estudo 3 de valores de glucose sanguínea e insulina resumiu-se na Tabela 25. O esboço total para avaliação do esvaziamento gástrico resume-se na Tabela 26.

25 Tabela 25

Estudo 3: Esboço de Estudo de Farmacodinâmica e Designação de Grupo para Determinações de Glucose Sanguínea e Insulina

Grupo	No. animais*	Tratamento	Via	Nível de Dose (µg/kg)	Administração de Dose em relação a OGTT
1	5	Salina (Placebo)	IN	0 x 2	-10 minutos/+35 minutos
2	5	GLP-1:F1	IN	100 x 1	-10 minutos, sem dosificación adicional

3	5	GLP-1:F1	IN	100 x 2	-10 minutos/+35 minutos
4	5	Exenatida	SQ	0.6 x 1	-10 minutos, sem dosificação adicional

* Ratazanas ZDF Macho

Tabela 26

Estudo 3: Esboço do Estudo de Farmacodinâmica e Designação de Grupo para Avaliações de Esvaziamento Gástrico

Grupo	No. animais*	Tratamento	Via	Nível de Dose (mg/kg)	Administração de Dose em Relação a OGTT
1	5	Salina (Placebo)	IN	0	-10 minutos
2	5	GLP-1:F1	IN	100	-10 minutos
3	5	GLP-1:F1	IN	1000	-10 minutos

5 * Ratazanas ZDF Macho

Os resultados do Estudo 3 mostram redução dramática (~60%) da AUC_{0-240} de glucose sanguínea correcta depois da dosagem GLP-1 intranasal comparado a administração Salina ou SQ de Exenatida. Se mostram valores AUC_{0-240} e C_{max} na Tabela 27. A mudança na concentração de glucose corrigida para glucose endógena se mostra na Figura 1.

Estes resultados de farmacodinâmica mostram a descoberta surpreendente e inesperada de que a administração intranasal de formulações farmacêuticas de GLP-1 resulta numa concentração de glucose diminuída na sangue.

Tabela 27

Dados de Farmacodinâmica para Parâmetros da Farmacocinética de Glucose Sanguínea Depois da Administração de GLP-1, Exenatida e Salina em Ratazanas Determinados em Teste de Tolerância de Glucose Oral

	AUC_{0-240} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$)	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	AUC_{0-240} (corregido para glucosa endógena) ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$)
Salina (IN)	59,352	-356	28,318
Exenatida (SQ)	67,832	-277	30,592
GLP-1 (IN)	45,550	-209	11,470

Os dados de insulina média do grupo para grupos do

tratamento GLP-1 e placebo do Estudo 3 se mostram na Figura 2. Os níveis de insulina em ratas tratadas com salina (placebo) mostram uma diminuição ligeira depois do OGTT. Com uma dose única de 100 µg/kg de GLP-1 a -10 minutos, existe
 5 um aumento marcado em níveis de insulina no sangue em resposta a um OGTT. A administração de GLP-1 a -10 minutos e +35 minutos resulta num aumento repentino de insulina imediatamente depois de cada dose. Este padrão indica que o GLP-1 é responsável pela libertação de insulina em resposta
 10 a glucose sanguínea elevada.

Os dados de acetaminofeno médios do grupo para os grupos de tratamento GLP-1 e placebo (com desvio padrão para o grupo placebo) mostram-se na figura 3. No estudo 3, a determinação de exposição total (AUC) indicada é menos de 3%
 15 de diferença na quantidade total de acetaminofeno absorvido na circulação sistémica entre os três grupos de tratamento. Os valores AUC são 6804 µg*min/kg, 6672 µg*min/kg e 6951 µg*min/kg para o controlo de salina (placebo), grupos 100 µg/kg de GLP-1 e 1000 µg/kg GLP-1, respectivamente. Não
 20 obstante, o perfil de absorção é diferente. Em ratas tratadas com placebo, a T_{max} para o acetaminofeno é 30 minutos pós-dose; com uma C_{max} média do grupo de 78 µg/ml com um desvio padrão de ± 21 µg/ml. Uma C_{max} ligeiramente inferior, 66 ± 21 µg/ml se notou a 30 minutos depois da dose
 25 para o grupo 100 µg/kg GLP-1; não obstante, as concentrações de acetaminofeno entre este grupo e o grupo controlo são similares para mais pontos de tempo avaliados. A C_{max} para o acetaminofeno é menor, 45 ± 30 µg/ml, no grupo 1000 µg/ml GLP-1. Além disso, a T_{max} parece originar-se entre 30 e 90
 30 minutos depois da dose, e os níveis sanguíneos de acetaminofeno são marcadamente maiores nos últimos pontos de tempo. Os resultados para o grupo 1000 µg/kg GLP-1 são consistentes com um atraso no esvaziamento gástrico e um

perfil mais prolongado para esvaziamento gástrico depois de uma dose alta de GLP-1.

Os resultados do Estudo 3 mostram que o GLP-1 sem inibidor diminui significativamente a glucose e que a dose pode ser administrada antes ou depois da comida. A formulação de GLP-1 a 1N diminui AUC de glucose assim como a dosagem de Exenatida SQ em ratas ZDF enquanto se esta fôr 0.6 ou 3 ug/kg não o faz.

Resumo de Resultados PD

Estes resultados de farmacodinâmica mostram a descoberta surpreendente e inesperada de que a administração intranasal de formulações farmacêuticas de GLP-1 resulta numa concentração de glucose diminuída na sangue. Além disso, o padrão de concentração de insulina no sangue indica que GLP-1 é o factor responsável para a libertação de insulina em resposta à glucose sanguínea elevada. Os resultados para o estudo de acetaminofeno são consistentes com um atraso no esvaziamento gástrico e um perfil mais prolongado para esvaziamento gástrico a dose altas de GLP-1 numa ausência do inibidor DOO-IV. Uma dose inferior de GLP-1, a qual também é efetiva em glucose sanguínea inferior, não tem impacto no esvaziamento gástrico. A diminuição da concentração de glucose na sangue, especialmente através de níveis de insulina elevados é um tratamento efetivo para Diabetes tipo II. Além disso, o atraso no esvaziamento gástrico pode aumentar a saciedade e promover a perda de peso. Estes dados apoiam a eficácia da formulação intranasal GLP-1 descrita nestes ensaios para uso no tratamento de transtornos metabólicos tais como obesidade e diabetes.

EXEMPLO 8

Formulações Transmucosales Sintéticas de Exendin-4 com Intensificadores

Testou-se uma variedade de excipientes para

otimização *in vitro* de formulações de exenatida. Geraram-se formulações de exenatida transmucosal combinando exenatida e excipientes (que incluem intensificadores, solubilizadores, tensoativos, queladores, estabilizadores, amortecedores, tonificadores e conservantes).

Realizaram-se rondas múltiplas de selecção de formulação e dividiram-se me duas séries, A e B. As séries A focam-se na troca das concentrações do excipiente de solubilizadores (Me- β -CD), tensoativos (DDPC), queladores (EDTA) e estabilizadores (gelatina). Também se testaram amortecedores tais como amortecedor de citrato, amortecedor de tartrato e glutamato (MSG). Series B selecciona excipientes alternativos pelo seu potencial para intensificar a permeação de exenatida. Testaram-se várias concentrações de intensificadores de permeação potencial que incluem ciclodextrinas, glicósidos, ácidos gordos, fosfatidilcolinas, compostos GRAS, PN159, gelatina e outras. Além da selecção de intensificadores de permeação potencial, também se seleccionaram variadas concentrações de amortecedor (amortecedor de citrato, amortecedor de tartrato) e excipientes tonificadores/estabilizadores (manitol, NaCl). Testaram-se conservantes tais como benzoato de sódio (NaBz) e cloreto de benzalcónio (BAK). A tabela 28 lista os excipientes testados na selecção *in vitro*. Fora das formulações únicas 372 que se testaram, onze formulações se recomendam para uso em estudos PK de coelho *in vivo* pré-clínicos, ver Tabela 29.

Tabela 28

Excipientes Testados em Optimizaçõem de Formulação de Exenatida *in vitro*

Excipiente	Função	Intervalo de Concentração Testados
------------	--------	------------------------------------

Excipiente	Função	Intervalo de Concentração Testados
Amortecedor Citrato	Amortecedor/quelador/Co-conservante	20 mM, pH 4.5
Amortecedor Tartrato	Amortecedor	30 mM, pH 4.5
Manitol	Tonificador/Estabilizador	50 – 200 mM
Cloreto de Sódio	Tonificador/Estabilizador	0 - 50 mM
Benzoato de Sódio	Conservante	0 – 5 mg/mL
Cloreto de Benzalcônio	Conservante	0 - 9 mg/mL
Excipientes Series A		
Me- α -CD	Solubilizador/Estabilizador/Intensificador	0 – 90 mg/mL
EDTA	Quelador/Estabilizador/Intensificador/Co-conservante	0 – 10 mg/mL
DDPC	Solubilizador/ Intensificador	0 – 2 mg/mL
Gelatina	Estabilizador/Intensificador de Viscosidade	0 – 10 mg/mL

Excipientes Series B	Classe	
DMe- β -CD	Ciclodextrinas	20 – 50 mg/mL
HP- β -CD	Ciclodextrinas	20 – 50 mg/mL
B-CD	Ciclodextrinas	10 – 20 mg/mL
n-Decil- β -D-maltopiranosida	Glicósidos	2.5 - 10 mg/mL
n-Dodecil- β -D-maltopiranosida	Glicósidos	2.5 - 10 mg/mL
n-Tetradecil- β -D-maltopiranosida	Glicósidos	2.5 - 10 mg/mL
n-Octil- β -D-maltopiranosida	Glicósidos	10 - 20 mg/mL
n-Hexadecil- β -D-maltopiranosida	Glicósidos	2.5 - 10 mg/mL
n-Octil- β -D-galactopiranosida	Glicósidos	5 - 10 mg/mL
Octil- β -glucopiranosida	Glicósidos	5 - 10 mg/mL
Octil- β -glucopiranosida	Glicósidos	5 - 7.5 mg/mL
n-Heptil- β -D-glucopiranosida	Glicósidos	2.5 – 10 mg/mL
Dodecanoilsucose	Glicósidos	1 - 5 mg/mL
Decanoilsucose	Glicósidos	1 - 5 mg/mL
Caprato de Sódio (10)	Ácidos gordos insaturados	5 - 50 mg/mL
Caprilato de Sódio (8)	Ácidos graosos insaturados	20 - 100 mg/mL
Fosfatidil colina	Fosfatidilcolinas	0.177 – 1.77 mmol
Dimiristoil Glicero Fosfatidilcolina (14:0) DMPC	Fosfatidilcolinas	0.177 – 1.77 mmol

Dilauroil Glicerol Fosfatidilcolina (12:0) DLPC	Fosfatidilcolinas	0.177 – 1.77 mmol
Di Nonanoil Glicerol Fosfatidilcolina (9:0) Di Non-PC	Fosfatidilcolinas	0.177 – 1.77 mmol
Dipalmitoil Glicerol Fosfatidilglicerol (16:0) DPPG	Fosfatidilcolinas	0.177 – 1.77 mmol
Dimiristoil Glicerol Fosfatidilglicerol (14:0) DMPG	Fosfatidilcolinas	0.177 – 1.77 mmol
Palmitoil-DL-Carnitina	Outro	1 - 5 mg/mL
Glicolato de Sódio	Outro	1 - 10 mg/mL
nitroso-N-acetil-penicilamina S	Outro	0.2 - 1 mg/mL
Cremerfor O	Outro	1 - 5 mg/mL
PN159	Outro	20 - 100 mg/mL
Gelatina de peso molecular alto recombinante	Outro	2.5 mg/mL
Gelatina de peso molecular baixo recombinante	Outro	2.5 mg/mL
Ácido Oléico	GRAS	1 - 3 mg/mL
Lecitina	GRAS	0.7 mg/mL
Etanol	GRAS	1 - 20 mg/mL
Tween 80	GRAS	50 mg/mL
Propilenoglicol	GRAS	100 mg/mL
EDTA solo	GRAS	2.5 - 10 mg/mL

Tabela 29

Formulações de Exenatida Transmucosal Recomendada para Estudos Pré-clínicos

Amostra	Exenatida (mg/ml)	Me-β-CD (mg/ml)	DDPC (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	Gelatina (mg/ml)	Amortecedor pH 4.5 (mM)	Tonificador (mM)	NaBz (mg/ml)	Vol. de dose
						Citrato	Manitol		
AKL-225-126-2	3	40	1	2.5	0	20	80	1	Lleno
JW-239-9-21	3	80	2	5	0	20	40	0	Lleno
						Tartrato	NaCl		
JW-239-126-3	3	40	1	2.5	0	30	37	0	Lleno
JW-239-126-7	3	80	2	5	0	30	11	0	Lleno
JW-239-126-14	3	80	2	5	2.5	30	0	0	Lleno
JW-239-126-15	6	40	1	2.5	0	30	34	0	Lleno

JW-239-126-19	6	80	2	5	0	30	8	0	Lleno
JW-239-126-24	6	80	2	5	2.5	30	0	0	Lleno
JW-239-126-19	6	80	2	5	0	30	8	0	Lleno
JW-239-126-24	6	80	2	5	2.5	30	0	0	Lleno
AKL-310-27-12	6	0	0	10	0	30	20	0	Lleno

EXEMPLO 9

Formulação de Exenatida Transcucumosal que Induz Abertura de Uniões Fortes *in vitro*

5 Realizaram-se ensaios TER, LDH, MTT e permeação *in vitro* para formulações de exenatida como se descreve nos protocolos no Exemplo 2 anterior.

Para todas as formulações de exenatida que contêm intensificadores, se reduz TER de aproximadamente 350-700
10 ohms x cm² até aproximadamente 5-20 ohms x cm² depois de sessenta (60) minutos do período de incubação. Todas as formulações de exenatida, com a exceção de controles, contêm EDTA. Como um quelador de cálcio, conhece-se o EDTA para abrir uniões fortes por cálcio depurador. Num ambiente
15 estático similar ao sistema de cultivo de tecido *in vitro* que se usa neste documento, a remoção de cálcio da solução conduz para abrir uniões fortes significantes. Não se observou redução nem TER no controle de glutamato mais exenatida (MSG) que contém unicamente exenatida em
20 amortecedor de glutamato com cloreto de sódio como um tonificador. O controle de glutamato mais exenatida indica que a abertura de uniões fortes não é uma característica inerente da mesma exenatida. O TER de insertos depois de sessenta (60) minutos exposto ao controle de glutamato é
25 similar nos dos insertos expostos ao meio por sessenta (60) minutos. O controle X triton é o TER mais baixo possível, o qual resulta da eliminação da barreira celular como se

espera.

Para verificar que a redução de TER pelas formulações de exenatida resultou de modulação de uniões fortes pelos intensificadores e não por morte celular, realizaram-se ensaios LDH e MTT usando a mesma linha celular, MatTek Corp., como se usa nos ensaios TER. As formulações de exenatida não mostram um aumento significativo em citotoxicidade como se mede por % de LDH. As formulações de exenatido têm menos do 20% de perda de LDH. Similarmente, o meio de controlo não mostra citotoxicidade. Em contraste, o grupo tratado com controlo Triton X mostrou significativa toxicidade, como se esperava. Valorizou-se a viabilidade celular usando o ensaio MTT (MTT-100, kit MatTek). As formulações de exenatida não mostram um aumento significativo em toxicidade como se mediu para a % de MTT com a excepção de três formulações, JW-239-126-14, JW-239-126-19, e JW-239-126-24, as quais têm perto dos 50% de MTT. Por outra parte, as formulações de exenatida mostram maior viabilidade que 80% de MTT. Similarmente, o meio de controlo não mostra citotoxicidade. Em contraste, o grupo tratado com controlo Triton X mostrou significativa toxicidade como se esperava. Os resultados do estudo de permeação se mostram na Tabela 30.

Tabela 30

Formulações de Exenatida Transmucosal a partir de Estudos Prévios

Amostra	Vol. de carga	Veze Perm en rel ao ctrl MSG I	Permeação		MTT		LDH	
			%	% desv. pad	%	% desv. pad	%	Desv. Pad.
					103.			
AKL-225-126-2	Lleno	346	6.0	1.6	2	16.5	2.5	2.0
JW-239-9-21	Lleno	501	7.2	1.6	73.3	18.7	7.2	4.1
JW-239-126-3	Lleno	365	8.6	1.7	90.6	20.7	3.4	1.6

JW-239-126-7	Lleno	430	8.2	4.7	84.5	17.9	6.1	2.9
JW-239-126-14	Lleno	829	16.7	8.5	52.0	11.0	6.3	2.0
					112.			
JW-239-126-15	Lleno	361	13.4	14.4	2	20.9	3.4	4.1
JW-239-126-19	Meio	1426	20.6	7.1	90.1	17.9	3.5	2.8
JW-239-126-24	Meio	2264	32.7	8.2	98.5	15.9	7.3	1.4
JW-239-126-19	Lleno	492	7.1	1.1	41.8	6.1	15.4	0.8
JW-239-126-24	Lleno	469	6.8	1.1	45.6	6.4	13.9	1.5
					101.			
AKL-310-27-12	lleno	306	4.4	1.5	7	11.6	10.8	0.6

Os resultados de permeação para as formulações mostradas 300 até 830 vezes incrementados em permeação em relação a uma formulação controle que contém unicamente 3 mg/ml de exenatida e glutamato monossódico. As formulações dosificadas a metade do volume mostrado a 1400 e 2200 vezes de aumento em permeação comparado ao controle.

EXEMPLO 10

Resultados de PK em Coelho para Formulações de Exenatida

10 Transmucosal

Se mostram formulações de Exendin-4 para testes *in vivo* na Tabela 31.

Tabela 31

Formulações de Exenatida Transmucosal a partir de Estudos
15 Prévios

Formulação:	2x intensif + gel	2x intensif	1x intensif + gel	1x intensif
Exendin-4 (mg/ml)	2-6	2-6	2-6	2-6
Me- β -CD (mg/ml)	80	80	40	40
DDPC (mg/ml)	2	2	1	1
EDTA (mg/ml)	5	5	2.5	2.5
Gelatina (mg/ml)	2.5	-	2.5	-
NaCl (mM)	-	-	25	37
BAK (mg/ml)	0, 0.2	0, 0.2	0, 0.2	0, 0.2
Amortecedor	30 mM Tartrato de KNa	30 mM Tartrato de KNa	30 mM Tartrato de KNa	30 mM Tartrato de KNa
pH	4.7	4.7	4.7	4.7

Realizou-se um estudo PK de exendin-4 em coelhos que comparam resultados PK para exendin-4 administrado por

IV e IN. As formulações IN incluem controlo IN (sem intensificadores), intensificador IN IX + gelatina, intensificador IIN 2X e intensificador IN 2X + gelatina (formulações mostrada na Tabela 31). Os resultados do estudo PK se mostram na Tabela 32 e Figura 4.

Tabela 32

Resultados de Farmacocinética para Exendin-4 em Coelhos

Tempo	Média				
	IV	IN Ctrl	IN intensif ^{1x} +gel	IN 2x intensif	IN 2x intensif+gel
0	0	79±33	436±98	271±131	353
1.5	13513±1085	-	-	-	-
5	7534±1527	81±34	376±114	5022±1030	5505±552
10	6785±1664	72±16	590±216	9724±1608	6858±380
15	3807±896	350±222	1190±430	10814±2105	11807±911
30	3420±586	638±522	1557±608	16270±4489	12614±2396
45	1767±723	953±736	2070±1000	9280±3024	11515±3189
60	1262±461	171±56	971±290	9684±3498	7534±2699
120	0	85±27	715±278	2946±828	2052±603
180	2508	82±22	882±483	1561±236	1298±515

Os resultados PK mostram que IN 2X intensif e IN 2X intensif + gel são as melhores formulações de exendin-4 desenvolvidas, testadas no estudo de coelho. Tanto IN 2X intensif como IN 2X intensif+gel resultam em valores PK maiores que os controlos IV ou IN.

EXEMPLO 11Formulações de Exenatida Transmucosal Alternativas

Desenvolveram-se formulações de exendin-4 alternativas para administração transmucosal para testar o seguinte: 1) estabilidade de armazenamento aumentada, 2) biodisponibilidade aumentada de exendin-4 e 3) efeito de farmacodinâmica aumentada determinado medindo níveis de insulina e glucose.

Prepararam-se modificações de formulações exendin-4 previamente testadas para remover DDPC e gelatina completamente mas numa formulação. Usou-se "OEF" para referência a formulações que contêm 80 mg/ml de Me-b-CD e 5

mg/ml de EDTA (sem DDPC ou gelatina) em 10 mM de amortecedor de acetato. Uma segunda mudança nas formulações previamente testadas é a adição de arginina ou algumas das formulações. As formulações OEF descrevem-se na Tabela 33.

5 Tabela 33

Formulações de Exenatida Transmucosal para Estudos de Permeação *in vitro*

Formulação:	2x intensif + gel, arg	OEF + arg	OEF + arg, 30 Acetato	OEF	OEF, amortecedor 2.8 arg	OEF, amortecedor 10 arg
Exendin-4 (mg/ml)	2-6	2-6	2	2	2	2
Me- β -CD (mg/ml)	80	80	80	80	80	80
DDPC (mg/ml)	2	-	-	-	-	-
EDTA (mg/ml)	5	5	5	5	5	5
Gelatina (mg/ml)	2.5	-	-	-	-	-
NaCl (mM)	40	45	20 - 50	37	46	41
Arginina (mM)	10	2.8	2.8	-	2.8	10
Amortecedor	(Arginina)	10 mM Acetato	30 mM Acetato	10 mM Acetato	(Arginina)	(Arginina)
pH	4.7	5.25	5.25	5.5	5.25	5.25

Abreviaturas: DDPC = didecanoil L- α -fosfatidilcolina, EDTA = Edetato di-hidrato de sódio, Me- β -DC = metil- β -ciclodextrina aleatória.

Percentagem de Permeação

Estudos de permeação *in vitro* mostraram que as formulações OEF (sem DDPC e gelatina) intensificando a permeação de exendin-4 a uma extensão maior que as formulações de exendin-4 previamente testadas (ver formulações previamente testadas na Tabela 31) assim como se proporciona viabilidade celular comparável ou melhor. Os resultados de permeação que comparam as formulações se mostram na Tabela 34.

20 Tabela 34

Resultados de Permeação *in vitro* para Formulações de Exendin-4 depois de 90 Minutos

Formulação	Promedio do % de Permeação	Desv. Padrão
Controlo no intensif	0.21	0.03
1x intensif + gel	5.04	1.04
2x intensif	7.74	0.76
2x intensif+ gel	7.41	0.05
2x intensif+gel, arg	8.37	0.64
OEF + arg	10.14	0.40

Estudo de Farmacocinética

Um estudo de farmacocinética (PK) *in vivo* em coelhos demonstrou que as formulações "OEF + arg" e "2x intensif + gel, arg" quando se administra intranasalmente produz biodisponibilidade intensificada de exendin-4, comparável a ou superada pelas formulações previamente testadas. O pico médio da concentração de plasma exendin-4 é maior que a formulação OEF + arg. A tabela 35 mostra uma comparação dos parâmetros PK médios (T_{max} , AUC, $t_{1/2}$ e Kel) para as formulações testadas. O coeficiente de variação para cada parâmetro PK se mostram na Tabela 36, e a biodisponibilidade absoluta (%F) para cada formulação intranasal se mostra na Tabela 37.

Tabela 35

Parâmetros PK meios para Formulações de Exendin-4

Formulação	Grupo #	T_{max} (min)	C_{max} (pg/mL)	AUC_{last} (min*pg/mL)	AUC_{inf} (min*pg/mL)	$t_{1/2}$ (min)	Kel (1/min)
IV	1	1.5	10500	189610	207110	28.0	0.026
IN Controlo	2	67.0	3370	137520	221070	31.8	0.025
1x intensif + gel	3	35.0	1930	141210	199180	89.2	0.012
2x intensif	4	34.0	14140	1074220	1193120	50.6	0.015
2x intensif+ gel	5	33.0	15000	978940	1040300	35.1	0.022
2x intensif+gel, arg	6	47.0	11180	692050	774490	25.6	0.029
OEF + arg	7	27.0	23290	1417370	1551880	36.7	0.020

Tabela 36

% de Coeficiente Meio de Variação

Formulação	Grupo	T_{max}	C_{max}	AUC_{last}	AUC_{inf}
------------	-------	-----------	-----------	--------------	-------------

	#	(min)	(pg/mL)	(min*pg/mL)	(min*pg/mL)
IV	1	0.0	61.6	46.0	52.0
IN Controlo	2	99.1	164.1	156.5	119.0
1x intensif + gel	3	53.5	79.8	80.3	75.8
2x intensif	4	73.8	52.6	51.0	43.8
2x intensif+ gel	5	38.0	36.4	49.7	52.5
2x intensif+gel, arg	6	96.2	72.7	88.8	94.4
OEF + arg	7	46.5	42.7	40.2	48.4

Tabela 37

Biodisponibilidade Absoluta (%F) usando $AUC_{\text{último}}$

Formulação	Grupo #	AUC_{last} (min*pg/mL)	%F
IV	1	189610	
IN Controlo	2	137520	1.6
1x intensif + gel	3	141210	1.7
2x intensif	4	1074220	12.6
2x intensif+ gel	5	978940	11.5
2x intensif+gel, arg	6	692050	8.1
OEF + arg	7	1417370	16.6

Resultados para o estudo PK mostram que OEF + arg têm % de biodisponibilidade maior (16.6%). Outras das formulações intranasais, 2x intensif e 2x intensif + gel, também têm biodisponibilidade significativamente intensificada comparado ao controlo IN (12.6% e 11.5%, respectivamente).

Estudos de Farmacodinâmica

Um estudo *in vivo* em coelhos proporcionou parâmetros farmacodinâmicos (PD) que mostram que as formulações "OEF + arg" e "2x intensif + gel, arg" quando se administra intranasalmente produz respostas de insulina e glucose, comparáveis ou maiores que as formulações previamente descritas (ver Tabela 31). A tabela 38 inclui parâmetros PD para níveis de insulina médios (T_{max} , C_{max} e AUC) e a Tabela 39 mostra-nos níveis de glucose médios (T_{max} e C_{min}). Surpreendentemente, a formulação "2x intensif + gel, arg" provoca resposta PD maior aún ainda no resulta no aumento maior em biodisponibilidade de exendin-4 no estudo PK.

Tabela 38

Parâmetros PD para Níveis de Insulina Depois da Dosagem de Formulações em Coelhos

Formulação	Grupo #	N	T _{max} (min)	C _{max} (μIU/mL)	AUC _{last} (min*μIU/mL)
IV	1	3	15.0	40.2	490.3
IN Controlo	2	1	60.0	8.0	60.0
1x intensif + gel	3	1	5.0	8.5	112.5
2x intensif	4	4	21.3	34.4	518.9
2x intensif+ gel	5	2	17.5	38.5	247.5
2x intensif+gel, arg	6	2	30.0	58.5	1211.3
OEF + arg	7	3	16.7	38.3	513.5

Tabela 39

5 Parâmetros para Níveis de Glucose Depois da Dosagem de Formulações em Coelho

Formulação	Grupo #	T _{min}	% C _{min}
IV	1	1.5	96
IN Controlo	2	5	95
1x intensif + gel	3	N/A	N/A
2x intensif	4	5	96
2x intensif+ gel	5	N/A	N/A
2x intensif+gel, arg	6	10	80
OEF + arg	7	5	94

Estabilidade

Estudos de estabilidade acelerada mostram que as variantes de formulação "OEF" proporcionam estabilidade intensificada para exendin-4 em relação à formulação "2x intensif+gel". A estabilidade das formulações "OEF" é comparável à de BYETTA® comercialmente disponível. Depois de quatro (4) semanas a 40°C, a pureza das formulações "OEF" é 85.6 - 86.0%, assim como a pureza de "2x intensif + gel" é 83.7%. Depois de quatro (4) semanas a 50°C, a pureza das formulações "OEF" é similar a BYETTA® (72.2-72.9% contra 72.9) assim como a formulação "2x intensif + gel" precipitou. Não se observou precipitação nas formulações simples.

Em resumo, os estudos de estabilidade acelerada demonstraram que o amortecedor de acetato proporciona estabilidade física aumentada para formulações de exendin-4.

em relação ao amortecedor de tartrato. Observou-se menos precipitação em formulações amortecidas de acetato que em formulações amortiguadas de tartrato. Geralmente, os amortecedores de mono-ionogénico (acetato, arginina, lactato) proporcionam melhor estabilidade que os amortecedores poli-ionogénicos (tartrato, citrato). O intervalo de pH 4.7-5.5 proporciona melhor estabilidade química para exendin-4 comparadã $\text{pH} \leq 4.25$. A arginina proporciona estabilidade química ligeiramente melhorada. Além disso a metionina e o ácido aspártico diminuem a estabilidade química de exendin-4. A osmolalidade óptima para estabilidade química de exendin-4 é 200-250 mOsm/kg de H_2O .

Adicionalmente, os estudos de estabilidade acelerada indicam que as variantes da formulação "OEF" proporcionam estabilidade intensificada para exendin-4 em relação à formulação "2x intensif+gel". A estabilidade das formulações "OEF" é comparável à de BYETTA® comercialmente disponível. A 40°C, depois de quatro semanas, a pureza das formulações "OEF" é 85.8-86.0% assim como a pureza de "2x intensif +gel" é 83.7. Mais dramaticamente, a 50°C, depois de quatro semanas, a pureza das formulações "OEF" é comparável a BYETTA® (72.2-72.9% contra 72.9%) assim como a formulação "2x intensif + gel" precipitou.

Ainda não testados neste estudo, adverte-se que os intensificadores de viscosidade se podem agregar às formulações. Também se podem incluir conservantes nas formulações, os quais podem incluir, mas não se limitam a, cloreto de benzalcónio, metil e propil parabenos e/ou clorobutanol. Exemplos de outros conservantes previamente testados, os quais podem ser incluídos nas formulações para promover efetividade antimicrobiana incluindo as seguintes combinações: 0.033% de metilparabeno + 0.017% de

Propilparabeno; 0.18% de metilparabeno + 0.02% de
 Propilparabeno; 0.10% até 0.50% de clorobutanol; 0.10% até
 0.25% de clorobutanol + 0.033% de metilparabeno + 0.017% de
 Propilparabeno; 0.10% até 0.25% de clorobutanol + 0.18% de
 5 Metilparabeno + 0.02% de Propilparabeno; 0.5% de álcool
 benzílico; 0.5% de álcool benzílico + 0.033% de
 metilparabeno + 0.017% propilparabeno; 0.5% de álcool
 benzílico + 0.18% de metilparabeno + 0.02% de
 Propilparabeno; 0.5% de feniletanol + 0.1 até 0.25% de
 10 clorobutanol; 0.5% de feniletanol + 0.033% de Metilparabeno
 + 0.017% de Propilparabeno; 0.5% de feniletanol + 0.18% de
 Metilparabeno + 0.02% de Propilparabeno; 5 mg/ml de EDTA;
 0.01-0.1% de cloreto de benzalcônio; 7 mg/ml de etano; 5
 mg/ml de álcool benzílico + 2.5 mg/ml de álcool
 15 feniletílico.

Podem usar-se concentrações variáveis de exenatida
 para conseguir uma dose desejada, por exemplo as
 concentrações de 0.5 mg/ml até 6 mg/ml. As formulações "OEF"
 e "OEF + arg" podem proporcionar estabilidade e
 20 biodisponibilidade melhorada para outros GRP, que incluem,
 mas não se limitam a, outros análogos de GLP-1.

Numa formulação de exendin-4 para administração
 transmucosal com vida médiãumentada, identificam-se custos
 diminuídos de gastos e biodisponibilidade aumentada a partir
 25 dos melhoramentos OEF à formulação. A vida médiãumentada
 significa que o produto comercial durará mais tempo, o que
 permite que menos produtos expirem e reduzindo a sua
 fabricação. Biodisponibilidade aumentada significa eficácia
 e utilidade terapêutica potencialmente aumentada do produto
 30 do fármaco. Também pode significar uma poupança em custos
 reduzindo a quantidade de PI (exendin-4, GLP-1) requerida
 para a eficácia do produto do fármaco. A remoção de DDPC
 permite potencialmente maior facilidade na aprovação do

produto pela FDA visto que o DDPC é um excipiente novo. Também diminui o tempo requerido para fabricação do produto. Além disso, o DDPC é um excipiente caro e se a eliminação reduz significativamente o custo de gastos associados com a produção do fármaco. A eliminação de gelatina resulta numa diminuição no tempo requerido para fabricação do produto e também diminui o custo de fabricação com a eliminação de um excipiente.

A invenção também inclui formulações GRP livres de conservante. Tais formulações não contêm um conservante. Nausência de um excipiente antimicrobiano, a formulação foi cheia sob condições estéreis num dispositivo de administração livre de conservante. Uma formulação de exenatida livre de conservante pode incluir formulações tais como aquelas mostradas nas Tabelas 40 e 41. As concentrações de exenatida podem variar de 2-12 mg/ml.

Tabela 40

Formulação Livre de Conservante para "2x Intensificadores + gelatina"

Componente	Concentração	
	(mg/mL)	(mM)
Exenatida	Depende da potência de formulação requerida	
Metil- β ciclodextrina	80.0	~ 29.4 – 30.4
L-Alfa-fosfatidilcolina didecanoil	2.0	1.77
Edetato di-sódio	5.0	6.72
Tartrato de sódio e potássio	7.566	26.81
Ácido Tartárico	0.479	3.19
Gelatina	2.5	varias
Água purificada ou água estéril para irrigação	CS	

Tabela 41

Formulação livre de Conservante para "1x intensificadores + Gelatina"

Componente	Concentração	
	(mg/mL)	(mM)
Exenatida	Depende da potência de formulação requerida	

Metil- β ciclodextrina	40.0	~ 29.4 – 30.4**
L-Alfa-fosfatidilcolina didecanoil	1.0	1.77
Edetato de di-sódio	2.5	6.72
Tartrato de sódio e potássio	7.566	26.81
Ácido Tartárico	0.479	3.19
Cloreto de Sódio	1.46	25
Gelatina	2.5	variss
Água purificada ou água estéril para irrigação	CS	

Outras modalidades podem variar nos níveis de componentes intensificadores de permeação tais como os seguintes: Me- β -CD (20 - 80 mg/ml), DDPC (0 - 2 mg/ml), EDTA (2 - 10 mg/ml), amortecedor de tartrato (0 - 30 mM),
5 gelatina, e cloreto de sódio. Outras modalidades podem conter uma formulação diferente: Me- β -CD (80 mg/ml), EDTA (5 mg/ml), arginina (2.8 ou 10 mM) e/ou amortecedor de acetato (10 mM), e cloreto de sódio com um pH de 4.9 - 5.6. As concentrações destes excipientes podem variar. As
10 formulações podem além disso conter um intensificador de viscosidade tal como gelatina, hidroximetilcelulose, carboximetilcelulose ou carbopol. Podem usar-se concentrações variadas de exenatida para conseguir uma dose desejada. As concentrações podem variar de 0.5 mg/ml até 25
15 mg/ml, por exemplo.

EXEMPLO 12

Estudo de Farmacodinâmica (PD) em Dose Única de Administração Intranasal de Proteínas Que regulam a Glucose (GRPs) num Modelo de Ratazana do Teste de Tolerância à
20 Glucose (OGTT)

Testaram-se as ações de farmacodinâmica do GLP-1 (amida 7-36) e exendin-4 e glucose sanguínea depois da instilação intranasal num modelo de ratazana de teste de tolerância de glucose oral (OGTT). Avaliaram-se duas
25 formulações de exendin-4 e usou-se uma formulação única de

GLP-1. A formulação GLP-1 (em base à EDTA) (#2) contém GLP-1 (amida 7-36) e os seguintes ingredientes: 10 mg/mL de EDTA di-sódio; 10 mM citrate buffer, pH 3.5. As formulações de exendin-4 (com base de EDTA) (#2, #3, #4, and #5) continham
 5 exendin-4 e os seguintes ingredientes: 10 mg/mL de EDTA di-sódio e 10 mM de amortecedor de arginina, pH 4.0. As formulações de exendin-4 (em base a PDF) (#6 e #7) contém
 10 exendin-4 e os seguintes ingredientes: 45 mg/ml de Me- β -Cd, 1 mg/ml de DDPC, 1 mg/ml de EDTA de di-sódio, 100 mM de sorbitol, 25 mM de lactose, 5mg/ml de CB, e 10 mM de amortecedor de arginina, pH 4.0. Um resumo das formulações testadas se mostra na Tabela 42. O esboço de estudo e designações de grupo se mostram na Tabela 43.

Tabela 42

15 Formulações usadas paràvaliar Dosagem Intranasal de Exendin-4 e GLP-1

ID/Grupo #	Formulação
Salina Controlo/#1	Salina (0.9% NaCl)
GLP-1 (com base de EDTA)/#2	2.00 mg/mL GLP-1, 10 mg/mL EDTA, 10 mM amortecedor de Citrato (pH 3.5)
Exendin-4 (com base de EDTA)/ #3	0.04 mg/mL Exendin-4, 10 mg/mL EDTA, 10 mM amortecedor de arginina, pH 4.0
Exendin-4 (com base de EDTA)/ #4	0.20 mg/mL Exendin-4, 10 mg/mL EDTA, 10 mM amortecedor de arginina, pH 4.0
Exendin-4 (com base de EDTA)/ #5	0.40 mg/mL Exendin-4, 10 mg/mL EDTA, 10 mM amortecedor de arginina, pH 4.0
Exendin-4 (com base de PDF)/ #6	0.04 mg/mL Exendin-4, 45 mg/mL Me- β -CD, 1 mg/mL DDPC, 1 mg/mL EDTA, 100 mM sorbitol, 25 mM lactose, 5 mg/mL CB, 10 mM amortecedor de arginina, pH 4.0
Exendin-4 (com base de PDF)/ #7	0.20 mg/mL Exendin-4, 45 mg/mL Me- β -CD, 1 mg/mL DDPC, 1 mg/mL EDTA, 100 mM sorbitol, 25 mM lactose, 5 mg/mL CB, 10 mM amortecedor de arginina, pH 4.0

Abreviaturas: Me- β -CD=metil-beta-ciclodextrina, EDTA = edetato de di-sódio, DDPC=L- α -fosfatidilcolina didecanoil, e
 20 CB=Clorobutanol.

Tabela 43

Esboço do Estudo e Designações de Grupo

Grupo #	Tratamento (API)	Nível de Dose ($\mu\text{g/kg}$)	Conc. de dose (mg/ml)	Vol. de dose (ml/kg)	Formulação	Via admin.	Administração de dose em relação a OGTT
1	Salina	0	0	0.05	N/A (Salina)	Intranasal	-10 minutos
2	GLP-1	100	2.00	0.05	Com base de EDTA	Intranasal	-10 minutos
3	Exendin-4	2	0.04	0.05	Com base de EDTA	Intranasal	-10 minutos
4	Exendin-4	10	0.20	0.05	Com base de EDTA	Intranasal	-10 minutos
5	Exendin-4	20	0.40	0.05	Com base de EDTA	Intranasal	-10 minutos
6	Exendin-4	2	0.04	0.05	Com base de PDF	Intranasal	-10 minutos
7	Exendin-4	10	0.20	0.05	Com base de PDF	Intranasal	-10 minutos

Avaliaram-se farmacodinâmicas monitorizando níveis de glucose sanguínea e insulina no sangue; co-administrou-se acetaminofeno com glucose para monitorizar o esvaziamento gástrico. O estudo inclui um tratamento de dose única em ratas ZDF de aproximadamente 11 semanas de idade (5 ratas por grupo de tratamento). Conduziu-se o OGTT como uma dose de 1 g/kg de bolo de uma solução de glucose administrada por sonda oral. Administrou-se acetaminofeno, a uma dose de 100 mg/kg. Para fins de registro do tempo o OGTT designou-se como tempo = 0 minutos. A administração de dose para salina, GLP-1 ou exendin-4 é a -10 minutos em relação ao OGTT. Avaliou-se a glucose sanguínea nos seguintes pontos de tempo: pré-OGTT (duas vezes) e 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180 e 240 minutos pós-OGTT. Avaliou-se a insulina no sangue nos seguintes pontos de tempo: pré-OGTT e 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, e 180 minutos pós-OGTT. Avaliou-se o nível do sangue APAP nos seguintes pontos de tempo: pré-OGTT e 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, e 180 minutos pós-OGTT.

Resultados de Farmacodinâmica

A tabela 44 mostra resultados de farmacodinâmica

do nível de glucose. Níveis de pico ($C_{\max}$) para glucose são 70% de controle em animais administrados com GLP-1; similarmente o AUC para glucose parâ estrutura de tempo de 0 até 60 (AUC_{0-60}) minutos pós-OGTT é 70% do controle. A administração de Exendin-4 tem efeitos mínimos em $C_{\max}$ (que varia de 86% até 99% do controle) ou AUC_{0-60} (que varia de 91% até 103% do controle). Não existe uma clara resposta à dose para exendin-4.

Tabela 44

10 Resultados de Farmacodinâmica em Nível de Glucose para GRPs: GLP-1 e Exendin-4

Formulação (Grupo #)	$T_{\max}$ (min)	$C_{\max}$ (mg/dL)	% de Controle	AUC_{0-60} (min*mg/dL)	% de Controle	AUC_{0-240} (min*mg/dL)	% de Controle
Salina Controle (#1)	45	331	-	17050		54280	-
100 ug/kg GLP-1 (com base de EDTA) (#2)	180	231	70	11973	70	51520	95
2 ug/kg Ej-4 (com base de EDTA) (#3)	45	328	99	17533	103	58580	108
10 ug/kg Ej-4 (com base de EDTA) (#4)	75	328	99	17488	103	61408	113
20 ug/kg Ej-4 (com base de EDTA) (#5)	60	321	97	16063	94	66680	123
2 ug/kg Ej-4 (com base de PDF) (#6)	30	289	87	15580	91	51805	95
10 ug/kg Ej-4 (com base de PDF) (#7)	45	286	86	15818	93	57503	106

A tabela 45 mostrnos resultados de farmacodinâmica do nível de glucose depois da correcção para glucose endógena. Níveis de pico ($C_{\max}$) para glucose são 51% de controle em animais administrados com GLP-1; similarmente o AUC para glucose parâ estrutura de tempo de 0 até 60 (AUC_{0-60}) minutos pós-OGTT é 46% de controle, e AUC_{0-240} (0 até 240 minutos pós-OGTT) é 88% de controle. A administração de exendin-4 nas formulações com base de EDTA ou com base de

PDF tem efeitos moderados em $C_{\max}$ (que varia de 73% até 87% do controle) ou AUC_{0-60} (que varia de 91% até 103% de controle). Não se notou efeito mínimo para AUC_{0-240} , que varia de 77% até 125% de controle.

5 Tabela 45

Resultados de Farmacodinâmica do Nível de Glucose (Corrigidos para Glucose Endógena) para GRPs: GLP-1 e Exendin-4.

Formulação (Grupo #)	$T_{\max}$ (min)	$C_{\max}$ (mg/dL)	% de Controle	AUC_{0-60} (min*mg/dL)	% de Controle	AUC_{0-240} (min*mg/dL)	% de Controle
Salina Controle (#1)	45	206	-	9550	-	24280	-
100 ug/kg GLP-1 (com base de EDTA) (#2)	180	105	51	4413	46	21280	88
2 ug/kg Ej-4 (com base de EDTA) (#3)	45	174	84	8293	87	21620	89
10 ug/kg Ej-4 (com base de EDTA) (#4)	75	179	87	8548	90	25647.5	106
20 ug/kg Ej-4 (com base de EDTA) (#5)	60	170	83	7003	73	30440	125
2 ug/kg Ej-4 (com base de PDF) (#6)	30	151	73	7300	76	18685	77
10 ug/kg Ej-4 (com base de PDF) (#7)	45	155	75	7958	83	26063	107

Os resultados da resposta insulina (corrigidos para insulina endógena) mostram que os níveis de insulina pós-OGTT em animais de controle são similares ou ligeiramente inferiores, comparados a valores pós-dose. A administração nasal de GLP-1 a 100 $\mu\text{g/kg}$ está associada com até 2 vezes aumentada em insulina de 5 até 45 minutos pós-OGTT. Os níveis de insulina depois da dosagem de exendin-4 a 2, 10 e 20 $\mu\text{g/kg}$ (formulação com base de EDTA) demonstraram que um aumento dependente da dose em insulina com níveis de pico

são aproximadamente 0.7 vezes, 1.5 vezes e 4 vezes, respectivamente, abaixo dos valores de pré-dose para cada grupo. A resposta se limitã aproximadamente 45 minutos pós-OGTT. Depois da administração nasal de exendin-4 na
5 formulação com base de PDF a 2 ou 10 µg/kg dose, níveis de pico de insulina são 1.5 vezes ou 2.7 vezes, respectivamente, abaixo da pré-dose. A resposta se limitã aproximadamente 45 minutos pós-OGTT.

Resultados do Esvaziamento Gástrico

10 A tabela 46 mostranosresultados de acetaminofeno (esvaziamento gástrico). Em controlos, o pico de níveis de acetaminofeno (C_{max}) de 73 ng/ml ocoreu 30 minutos pós-dose (T_{max}).

Em animais administrados com GLP-1, notou-se uma
15 C_{max} ligeiramente inferior (66 ng/ml); no entanto, T_{max} é maior o que sugere um atraso no esvaziamento gástrico neste nível de dose. A administração de exendin-4 na formulação abase de EDTÀ 2 ou 10 µg/kg ou formulações com base de PDR a 2 ug/kg é similar ao controlo para T_{max} (30 até 45 minutos) e
20 C_{max} (aproximadamente 70 até 73 ng/ml). A administração de exedin-4 na formação com base de EDTÀ 20 µg/kg ou formulações com base de PDF a 10 µg/kg demonstrou uma diminuição em C_{max} (aproximadamente 51 até 54 ng/ml) e ao menos parà 20 µg/kg (formulação com base de EDTA) um perfil
25 de exposição ligeiramente prolongado. Os resultados sugerem que o esvaziamento gástrico é impactado a estes níveis de dose.

Tabela 46

Resumo de Resultados de acetaminofeno GRP (Esvaziamento
30 Gástrico)

Formulação (Grupo #)	T_{max} (min)	C_{max} (mg/dL)	% de Controlo
Salina Controlo (#1)	30	73.1	-
100 µg/kg GLP-1 (com base EDTA) (#2)	60	66.1	90

2 µg/kg Ej-4 (com base EDTA) (#3)	45	69.9	96
10 µg/kg Ej-4 (com base de EDTA) (#4)	30	71.9	98
20 µg/kg Ej-4 (com base de EDTA) (#5)	45	51.1	70
2 µg/kg Ej-4 (com base de PDF) (#6)	45	72.9	100
10 µg/kg Ej-4 (com base de PDF) (#7)	45	54.3	74

Resumo

Com base nos efeitos farmacológicos do GLP-1 e exendin-4 com respeito a estimulação dependente da glucose de insulina libertada, as formulações intranasais com base de EDTA e com base de PDF efetivamente administração o fármaco ativo nos objetivos sistêmicos. A estimulação para insulina libertada é dependente da dose.

Mostrou-se a modulação de níveis do pico (C_{max}) ou exposição (AUC) para glucose sanguínea em animais administrados com GLP-1 ou exendin-4, comparado com controlos. A estimulação de libertação de insulina e modulação do esvaziamento gástrico, por GLP-1 e exendin-4 são bases farmacológicas similares para modulação do perfil da glucose sanguínea depois de uma carga de glucose oral.

A inibição do esvaziamento gástrico é uma ação farmacológica conhecida de GLP-1 e exendin-4. A mudança em tempo para concentração do pico (T_{max}) ou concentração do pico (C_{max}) para paracetaminofeno é consistente com a farmacologia induzida por GLP-1 e exendin-4. Estes dados apoiam a eficácia das formulações de GLP-1 e exendin-4 descritas nestes ensaios para uso no tratamento de transtornos metabólicos tais como obesidade e diabetes.

Ainda que invenção precedente tenha sido descrita em detalhe por meio de exemplos para fins de clareza de entendimento, será aparente ao técnico que certas mudanças e modificações são compreendidas pela descrição e podem ser praticadas sem experimentação indevida do alcance das reivindicações anexas, as quais estão apresentadas por meio

de ilustração, sem limitação.

REIVINDICAÇÕES

1. FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA AQUOSA PARA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL, caracterizada por conter uma quantidade terapeuticamente efetiva de exendina-4 ou um
5 análogo agonista da exendina-4, um agente de solubilização que intensifica a permeação, um quelante catiônico que intensifica a permeação, um amortecedor e opcionalmente um agente intensificador da viscosidade que intensifica a permeação, onde

10 a. o agente de solubilização seleciona-se pelo menos a partir de um dos grupos que consistem de hidroxipropil- β -ciclodextrina, sulfobutiléter- β -ciclodextrina, dimetil- β -ciclodextrina, metil- β -ciclodextrina e Cremophor o, e

15 b. o intensificador de viscosidade seleciona-se pelo menos um a partir do grupo que consiste de gelatina, metilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose, e onde

20 c. a formulação proporciona pelo menos 5% de permeação de exendina-4 em um ensaio de permeação de tecido *in vitro*, tem uma viscosidade até 150 cps, tem um pH de 2 até 8 e é estável pelo menos duas semanas a 5°C.

2. FORMULAÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente de solubilização é metil- β -ciclodextrina.

25 3. FORMULAÇÃO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a metil- β -ciclodextrina está presente numa concentração até 90 mg/ml.

30 4. FORMULAÇÃO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a metil- β -ciclodextrina está presente a 80 mg/ml.

5. FORMULAÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 4, caracterizado pelo fato de que se seleciona pelo menos um quelante do grupo que consiste de ácido etileno diamina tetracético e ácido etilenoglicol

tetracético.

6. FORMULAÇÃO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o quelante está presente em uma concentração até 10 mg/ml.

5 7. FORMULAÇÃO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o quelante está presente a 5 mg/ml.

10 8. FORMULAÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 7, caracterizado pelo fato de que a concentração do agente de solubilização é 80 mg/ml e a concentração do quelante é 5 mg/ml.

9. FORMULAÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 8, caracterizado pelo fato de que o amortecedor é um amortecedor mono-ionogénico.

15 10. FORMULAÇÃO, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que se seleciona pelo menos um amortecedor mono-ionogénico do grupo que consiste de acetato, arginina e lactato.

20 11. FORMULAÇÃO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o amortecedor mono-ionogénico é arginina.

12. FORMULAÇÃO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a arginina está presente em uma concentração maior ou igual a 2,8 mM.

25 13. FORMULAÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 12, caracterizado pelo fato de que o pH vai de 4,7 até 5,5.

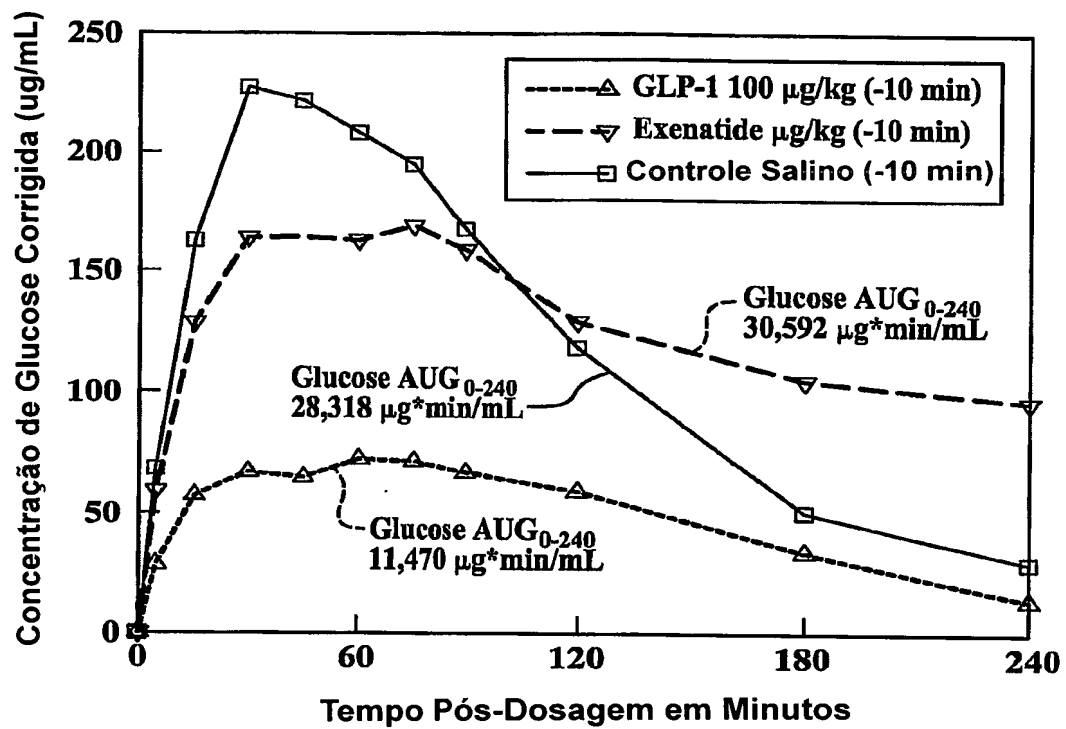
30 14. FORMULAÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 13, caracterizado pelo fato de que o conservante não estar presente.

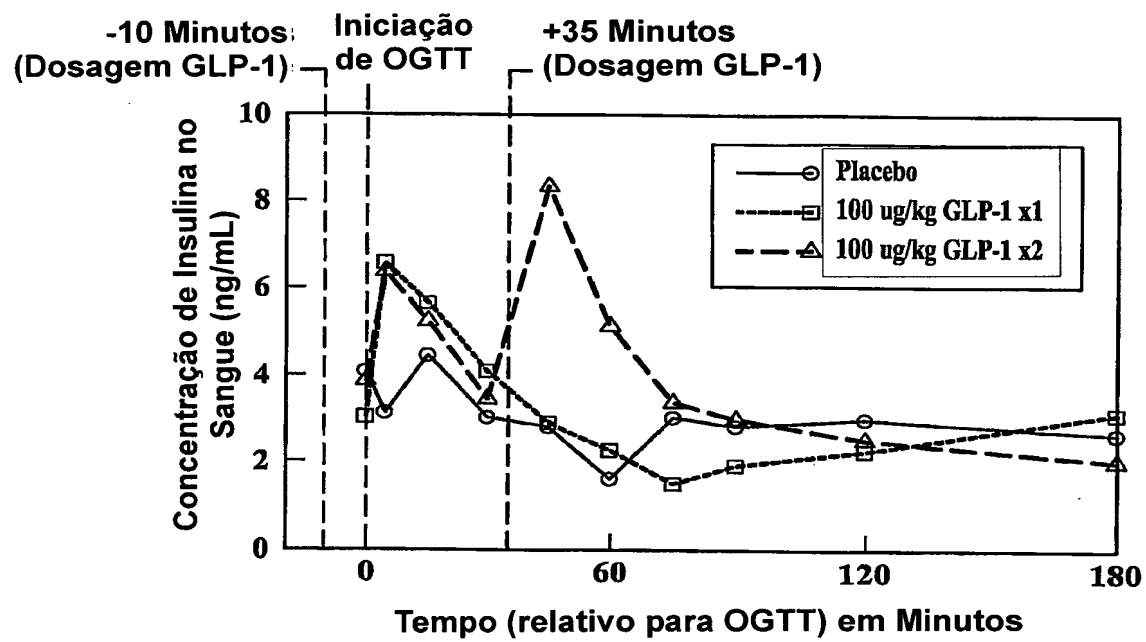
15. FORMULAÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 14, caracterizado pelo fato de que a viscosidade é de 1,5 até 10 cps.

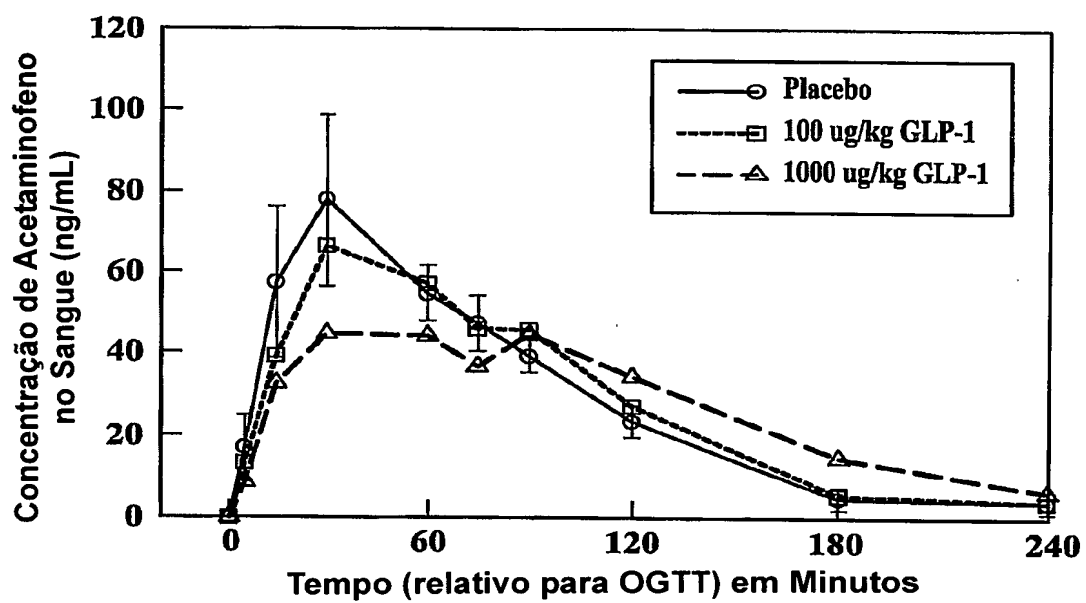
16. FORMULAÇÃO, de acordo com qualquer uma das

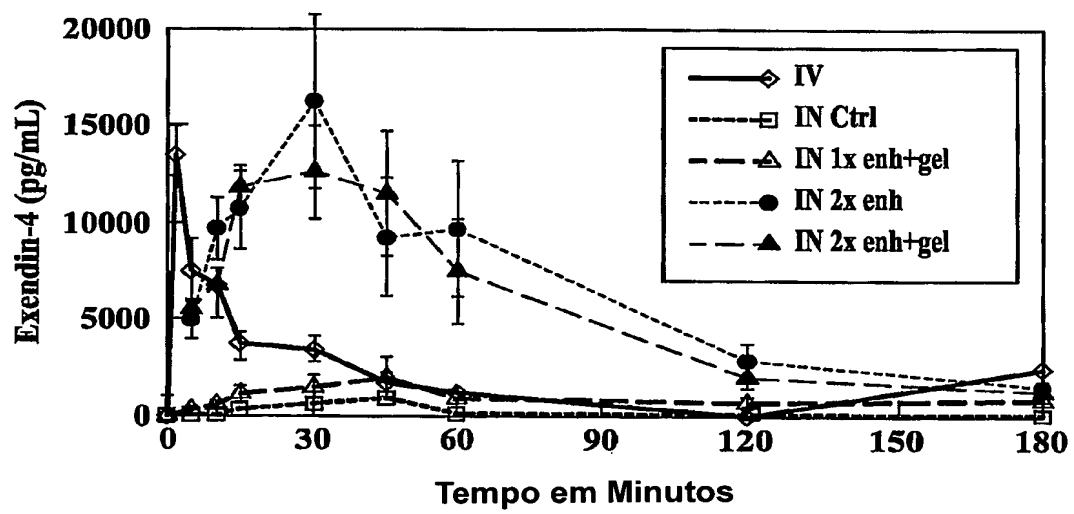
reivindicações 1 até 15, caracterizado pelo fato de que a formulação é estável pelo menos por 4 semanas a 5°C.

17. USO DE UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA AQUOSA PARA ELABORAR UM MEDICAMENTO, caracterizado pelo fato do medicamento ser administrado de forma intranasal a um sujeito para tratar uma doença metabólica seleccionada do grupo que consiste na hiperglicemia, diabetes mellitus insulino-dependente, diabetes gestacional, diabetes mellitus não insulino-dependente, obesidade ou dislipidemia para tratar condições beneficiadas suprimindo o apetite, aumentar a saciedade, promover a perda de peso, diminuir a ingestão de alimento, diminuir a velocidade do esvaziamento gástrico, reduzir a glucose no plasma ou promover a secreção de insulina.

*FIG.1*

**FIG.2**

*FIG.3*

*FIG.4*

RESUMO

FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA AQUOSA PARA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL E USO DE UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA AQUOSA PARA ELABORAR UM MEDICAMENTO

- 5 A presente invenção refere-se a uma formulação farmacêutica que contém uma mistura de uma quantidade farmacêuticamente activa de péptido que regula glucose (GRP) e intensificadores, onde formulação farmacêutica é empregue no tratamento de um síndrome metabólico.