

Nanotransportadores Para Administração Pulmonar de Insulina: Uma Nova Estratégia na Diabetes

F. Andrade^{1,2}, B. Sarmento², M. Videira¹

1- "iMed.UL - Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences", Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal

2- Departamento de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal

Resumo

Com o avanço da biotecnologia vários são os péptidos e proteínas com interesse terapêutico que têm vindo a ser desenvolvidos. Porém, a maioria é administrada por via parenteral como a insulina o que, em muitos casos, leva a uma reduzida aceitação por parte dos doentes.

Sendo a Diabetes Mellitus (DM) uma doença com elevada prevalência, especialmente nos países desenvolvidos, o desenvolvimento de formulações para administração não invasiva de insulina é o objetivo de vários cientistas e empresas ligadas ao sector farmacêutico, pois a administração subcutânea leva a uma reduzida *compliance* dos doentes.

Devido às suas características anatomofisiológicas, a via pulmonar aparenta ser uma alternativa promissora às injeções subcutâneas de insulina. Várias formulações para administração pulmonar de insulina encontram-se, actualmente, em diferentes fases de desenvolvimento, tendo obtido resultados positivos no que respeita ao controlo glicémico e à satisfação do doente. Uma destas (Exubera[®]) foi aprovada para comercialização pela FDA e EMEA porém, problemas inerentes ao produto levaram à sua retirada do mercado.

Coloca-se, assim, a questão se será a via inalatória uma alternativa viável às injeções subcutâneas de insulina e se a utilização de nanotransportadores constitui uma estratégia efectiva na resolução dos problemas associados às actuais formulações para administração pulmonar de proteínas.

O presente trabalho tem como finalidade efectuar uma revisão de alguns estudos efectuados sobre a administração pulmonar de insulina, bem como estudar a potencialidade do recurso a nanotransportadores para o desenvolvimento de novas e melhoradas formulações.

Abstract

With the advance of biotechnology, there are several peptides and proteins with therapeutic value being developed. However, most are administered parenterally as insulin, which in many cases, leads to a reduced acceptance by patients.

Diabetes Mellitus is a disease with a high prevalence, especially in developed countries, and the development of formulations for non-invasive administration of insulin is the aim for several scientists and companies involved in the pharmaceutical sector, because a subcutaneous administration leads to a reduced compliance of patients.

Due to its anatomical and physiological characteristics, the pulmonary route appears to be a promising alternative to the subcutaneous injections of insulin. Currently, several formulations for pulmonary delivery of insulin are at different stages of development and have obtained positive results in what regards to the glycemic control and patient satisfaction. One of these (Exubera[®]) was approved for marketing by the FDA and EMEA. However, inherent problems to the use of this product led to its withdrawal from the market.

Therefore, two questions are relevant: will inhalation be a viable alternative to subcutaneous injections of insulin and is the use of nanocarriers an effective strategy in addressing the problems associated with current formulations for pulmonary delivery of proteins?

The aim of this article is to undertake a review of some studies on pulmonary insulin delivery as well as study the potential use of nanocarriers to develop some new and improved formulations.

ABORDAGENS TERAPÊUTICAS COM INSULINA

Actualmente a administração de insulina faz-se recorrendo à via parenteral, sendo a via subcutânea a mais usual em caso de tratamento prolongado. Apesar de a via subcutânea possuir um início de acção mais lento, é mais confortável para os doentes comparativamente às restantes vias parentais ⁽¹⁾. As injeções regulares de insulina podem ser dolorosas e inconvenientes para o doente levando, em alguns casos, a reduzida *compliance* e a um aumento dos custos da terapêuti-

ca, factos que impulsionaram a pesquisa de novas vias de administração ⁽²⁻⁴⁾. Além disso, existem outras desvantagens no recurso à insulina injectada, entre elas, o estigma social associado à utilização de agulhas, as flutuações observadas na taxa de absorção e no tempo de acção devido à alteração do local de injeção, fluxo sanguíneo, postura corporal ou profundidade de injeção e, ainda, a necessidade de esterilização e conservação das soluções/suspensões de insulina no frio (2-8°C) ^(2,5).

As novas vias de administração de insulina incluem a oral, nasal, rectal, transdérmica, uterina, inalatória, infusão intraperitoneal ou implantação subcutânea de *pellets* ^(1,6). A administração oral é considerada a via mais atractiva para a administração de fármacos devido à sua conveniência de administração, reduzido custo de produção em geral e elevada *compliance* por parte dos doentes. Porém, a biodisponibilidade de proteínas e péptidos após administração oral é muito reduzida devido à sua instabilidade no tracto gastrointestinal (pH ácido e degradação proteolítica) e reduzida permeabili-

Correspondência:

Fernanda Andrade
Departamento de Tecnologia Farmacêutica
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
Rua Aníbal Cunha 164
4050-047 Porto
Tel.: +351 222078949
Fax: +351 222073977
E-mail: frdsandrade@ff.ul.pt
mtf09001@ff.up.pt

Quadro I - Dispositivos e formulações para inalação de insulina, respectivos fabricantes e fase de desenvolvimento em que se encontram.

Nome comercial	Fabricante	Parceiro	Tipo de Formulação e Dispositivo	Fase de Desenvolvimento	Notas
Exubera®	Nektar	Pfizer	DPI -Inalador Passivo	Comercialização (2006)	Comercialização Interrompida (2007)
AIR® (HIIP)	Alkermes	E. Lilly	DPI - Inalador Passivo	Fase III	Ensaio Interrompidos (2008)
Aerodose®	Aerogen	-	Aerossol Líquido - Inalador Passivo	Fase II	-
Spiros®	Dura Pharmaceuticals	E. Lilly	DPI - Inalador Electromecânico	Fase I	Descontinuado
AERx® iDMS	Aradigm	Novo Nordisk	Aerossol Líquido - Inalador Controlado por Microprocessador	Fase III	Ensaio Interrompidos (2008)
Technosphere®	Pharmaceutical Discovery Corporation	Mannkind	DPI (micropartículas) Inalador Passivo	Fase III	-
Microdose DPI®	Microdose Technologies	Elan Corporation	DPI - Inalador Electrónico	Fase I	-
Alveair®	CoreMed	-	Aerossol Líquido - Inalador Mecânico	Fase I	-
Bio-Air®	BioSante Pharmaceuticals	-	DPI (partículas revestidas)	Pré-clínico	-
-	Kos Pharmaceuticals	-	MDI (cristais)	Fase II	-

Legenda: DPI – *Dry Powder Inhaler* (Inalador de pó seco); MDI – *Metered Dose Inhaler* (Inalador pressurizado com válvula doseadora); HIIP - *Human Insulin Inhalation Powder* (Insulina humana em pó para inalação); iDMS - *Insulin Diabetes Management System* (Sistema insulínico para controlo da Diabetes).

dade através da mucosa intestinal⁽⁷⁻¹⁰⁾. Como as restantes proteínas, a insulina quando administrada oralmente não é absorvida pela mucosa gastrointestinal devido ao seu reduzido coeficiente de partição, sendo de seguida metabolizada em péptidos desprovidos de actividade biológica^(8,11), o que faz com que apenas uma reduzida dose de insulina administrada oralmente atinja a circulação sistémica⁽⁶⁾. A administração nasal e transdérmica requerem promotores para uma adequada absorção^(6,11), a infusão intraperitoneal e a implantação subcutânea de *pellets* são invasivas e a administração rectal e uterina são pouco cómodas. Devido às características fisiológicas do sistema respiratório, a via pulmonar tem recebido atenção especial para administração de fármacos, entre eles proteínas e péptidos^(12,13).

ADMINISTRAÇÃO PULMONAR DE INSULINA

Através da administração pulmonar é possível aceder rapidamente à circulação sistémica por um epitélio de reduzida espessura (~0,1-0,5µm) e elevada área de superfície de absorção (100-150m²) que possui actividade enzimática intra e extracelular inferior ao tracto gastrointestinal e um extenso fornecimento sanguíneo. Esta é uma via de administração não invasiva, que permite terapêuticas locais e sistémicas e que evita o efeito de primeira passagem^(2,14-16). Todas estas características associadas ao facto de a biodisponibilidade de proteínas e péptidos administrados por via pulmonar ser 10-200 vezes superior quando comparada com as restantes vias não invasivas⁽¹⁷⁾ tornam a inalação uma via alternativa promissora para administração de proteínas e péptidos como a insulina^(6,10).

Sendo a diabetes *mellitus* (DM) uma doença progressiva com complicações macro e microvasculares o controlo glicémico deve ser efectuado precocemente. Como foi referido, a administração subcutânea de insulina diminui a *compliance*

dos doentes e atrasa, em muitos casos, o início da terapêutica insulínica. Desta forma, a administração pulmonar de insulina poderá ser uma alternativa viável às injeções subcutâneas e constituir uma mais-valia na optimização do controlo glicémico, reduzindo assim a morbilidade e mortalidade associadas à DM⁽¹⁸⁾.

Vários são os dispositivos para inalação de insulina que tem vindo a ser desenvolvidos, alguns dos quais se encontram em fase de ensaios clínicos. Entre eles o Exubera® da Pfizer (único aprovado pela FDA e EMEA para comercialização), AIR® (HIIP) da E. Lilly, Aerodose® da Aerogen, Spiros® da Dura Pharmaceuticals, AERx® da Aradigm, Technosphere® da Pharmaceutical Discovery Corporation, Microdose DPI® da Elan Corporation, Alveair® da CoreMed, Bio-Air® da BioSante Pharmaceuticals e dispositivo BAI (*breath-actuated inhaler*) da Kos Pharmaceuticals^(6,18,19) (Quadro I).

De uma maneira geral, doentes a quem foi administrado formulações de insulina inalada demonstram controlo glicémico pós-prandial similar, semelhantes valores de HbA_{1c}, início de acção mais rápido, menor aumento de peso corporal, menor incidência e severidade de hipoglicémia e maior satisfação (maior conforto e conveniência) em comparação com os doentes sujeitos a injeção subcutânea de insulina regular^(1,2,6,11,18-24). Os estudos sugerem que esta é uma via de administração bem tolerada no tratamento de doentes com DM tipo 1 e 2 não se tendo verificado alterações significativas na função respiratória como espirometria, volume pulmonar, capacidade de difusão e saturação de oxigénio^(3,6,11,22). Em Outubro de 2007, aproximadamente 2 anos após a obtenção de AIM, a Pfizer decidiu retirar o Exubera® do mercado por este não alcançar as expectativas financeiras. O facto de ser uma insulina de curta duração de acção implica a injeção de uma insulina de longa duração de acção para controlo glicémico nocturno^(25,26). Além disso, a biodisponibilidade da insulina nesta formulação era bastante reduzida, 10-



Figura 1 - Dispositivo para inalação de insulina Exubera® (retirado de 10).

20% da subcutânea, e o complexo dispositivo de inalação (Figura 1) aumentava os custos da terapêutica e diminuía a *compliance* e aceitação por parte dos médicos e doentes ^(2,27). Também por razões comerciais foram interrompidos os ensaios clínicos do AERx® e do AIR® ⁽¹⁹⁾. No que respeita ao perfil de efeitos adversos bem como a sua frequência, estes são semelhantes à insulina subcutânea com excepção de tosse, que diminui com o uso prolongado, e

dispneia verificada em alguns doentes. Verifica-se ainda um aumento dos níveis séricos de anticorpos anti-insulina após administração pulmonar, não estando ainda relacionados com qualquer alteração clínica significativa e estabilizando ao final de 6 a 12 semanas ^(6,18-20,22,23).

Em Abril de 2008 a Pfizer anunciou em comunicado que se verificou a ocorrência de um maior número de casos de cancro no pulmão em doentes diabéticos fumadores que utilizaram Exubera®, quando comparado com os restantes tratamentos para a DM. Esta poder-se-á dever à capacidade vasodilatadora e promotora do crescimento da insulina ⁽²³⁾. Porém, devido ao reduzido número de casos, não foi possível estabelecer uma relação causal entre o aparecimento de cancro do pulmão e a utilização de Exubera®.

Relativamente a contra-indicações, fumadores, asmáticos e doentes com DPOC possuem absorção alterada da insulina inalada comparativamente com os restantes doentes. Verifica-se uma absorção aumentada no caso dos fumadores devido, possivelmente, aos reduzidos níveis de surfactante. Quanto aos asmáticos e aos doentes com DPOC a absorção de insulina é diminuída devido à restrição aérea e às anormalidades pulmonares estruturais a nível da difusão aérea e circulação capilar, respectivamente ^(1,6,22). Apesar da diminuição do efeito metabólico da insulina inalada em doentes diabéticos com comorbilidades que afectam a função pulmonar, a segurança desta não parece ser alterada. Porém, é prudente aguardar os resultados de ensaios clínicos em progresso antes de considerar a utilização de insulina inalada como terapêutica neste tipo de doentes ^(21,22). Devido à falta de estudos a utilização de insulina inalada não deverá ser administrada a crianças e grávidas ⁽²²⁾. Estudos efectuados em diabéticos com e sem infecções do tracto respiratório superior não verificaram diferenças na taxa de absorção de insulina nos diferentes grupos ⁽²²⁾.

NANOMEDICINA E A DIABETES MELLITUS

A aplicação da nanotecnologia à Medicina tem vindo a ser alvo de um crescente interesse ao longo dos últimos anos. Assim como na Imagiologia e na terapêutica anti-tumoral, também se verifica um desenvolvimento da Nanomedicina aplicada à terapêutica da DM. Nomeadamente, a monitorização contínua e menos invasiva dos níveis séricos de glucose recorrendo a nanosensores e a utilização de nanotransportadores para administração de insulina ^(7,28,29).

Aproximadamente metade dos fármacos identificados como potencialmente úteis em terapêutica, alguns dos quais com o maior interesse, são pouco solúveis em água, facto que leva à sua exclusão para futuro desenvolvimento galénico ⁽³⁰⁾. Este problema poderá ser resolvido com a utilização de nanotransportadores. Devido ao seu reduzido diâmetro médio, estes possuem um rácio área de superfície/volume bastante elevado, o que lhes confere elevadas velocidades de dissolução e solubilidade de saturação. Estas características permitem aumentar a biodisponibilidade de fármacos hidrofóbicos insolúveis, impedir a sua agregação quando administrados por via intravenosa e aumentar a rapidez de início de acção ^(13,30,31). Possuem ainda várias vantagens como o aumento da estabilidade e do transporte transepitelial, obtenção de propriedades de libertação controlada, penetração profunda nos tecidos, maior *uptake* celular, elevada resistência, condutividade, durabilidade, capacidade de escapar ao sistema defensivo *in vivo* quando <70nm (ex. *clearance* mucociliar e fagocitose por macrófagos) e, desta forma, aumentar o tempo de residência dos fármacos ^(13,14,30-34). Podem ser utilizados para a incorporação de fármacos permitindo a sua protecção da degradação, o direccionamento a órgãos/tecidos pretendidos e a redução dos efeitos secundários ^(15,35,36). Relativamente à encapsulação de proteínas, estes permitem diminuir a sua imunogenicidade, diminuindo assim a toxicidade da formulação ⁽²⁶⁾.

Apesar das diversas vantagens apresentadas pelos nanotransportadores, o seu reduzido tamanho confere elevada reactividade para com os componentes celulares, facto que poderá ser importante do ponto de vista toxicológico. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram indução de respostas inflamatórias e lesão do epitélio a nível pulmonar, assim como efeitos extrapulmonares como *stress* oxidativo ou aumento da coagulação sanguínea ^(34,37,38). Tais respostas podem, posteriormente, provocar alterações em vários sistemas do organismo como o cardiovascular ou o imune. Tais estudos recorrem a doses bastante elevadas de nanopartículas, que não correspondem às reais doses de exposição ⁽³⁴⁾, no entanto, este facto não deverá ser descurado, requerendo-se estudos mais aprofundados.

TERAPÊUTICA POR ADMINISTRAÇÃO PULMONAR DE INSULINA ENCAPSULADA EM NANOTRANSPORTADORES

Como é possível verificar, a administração pulmonar de insulina é possível. No entanto, as formulações convencionais

apresentam biodisponibilidades reduzidas, bem como capacidade para induzir a produção de anticorpos anti-insulina. Com o intuito de ultrapassar tais problemas equaciona-se o recurso a nanotransportadores.

Várias formulações contendo nanotransportadores têm vindo a ser desenvolvidas para a administração de insulina por várias vias, tendo sido, em alguns casos, confirmada a retenção da estrutura e da actividade biológica da insulina após a encapsulação^(5,8,27,35,39). No que respeita à administração pulmonar, verifica-se uma maior aceitação por parte dos doentes quando comparado com a injeção subcutânea. Estudos demonstram que formulações de insulina encapsulada em nanotransportadores provocam uma redução significativa dos níveis sistémicos de glucose, verificando-se, em alguns casos, um efeito prolongado no tempo (superior a 48h) quando comparado com soluções de insulina para inalação^(15,35,40-43). Algumas formulações permitem uma libertação controlada da insulina reduzindo, assim, a frequência de administração e a necessidade de injeção de insulina de longa duração de acção para a manutenção dos valores de insulina basal. São exemplo de tais formulações os agregados de liposomas que libertam insulina consoante o nível sérico de glucose produzidos por Karathanasis e colegas. Após a sua administração foi alcançado um controlo glicémico satisfatório, porém, tal formulação não poderá ser utilizada em humanos, pois a concanavalina A, o componente chave para a sensibilidade do sistema à glucose que promove a libertação de insulina, é bastante imunogénica⁽²⁵⁾.

São exemplo de nanotransportadores utilizados na administração pulmonar de insulina as nanopartículas de lecitina desenvolvidas por Nyambura e colegas obtidas por métodos de emulsificação seguido de liofilização com um diâmetro médio de 300nm e deposição alveolar de 45% (m/m) da dose emitida. Foi confirmada a retenção da estrutura primária, secundária e terciária da insulina após processamento, porém não foram efectuados ensaios *in vivo* no que respeita ao controlo glicémico⁽²⁷⁾. Yamamoto e colegas produziram nanocompositos de PLGA recorrendo à técnica de emulsificação/evaporação do solvente seguindo-se granulação. Foram efectuados estudos de deposição pulmonar *in vitro* e *in vivo* tendo-se verificado uma deposição alveolar de aproximadamente 45% da dose emitida e um efeito farmacológico prolongado (superior a 12h) quando comparado com soluções de insulina administradas por via intratraqueal e endovenosa⁽⁴¹⁾. Kawashima e colegas obtiveram nanoesferas de PLGA com diâmetro médio de 400nm e deposição alveolar de 75%, utilizando o método de emulsificação/evaporação do solvente modificado. Ensaio de dissolução *in vitro* demonstram um perfil de libertação de insulina caracterizado por um *burst effect* inicial seguido de libertação prolongada. Tal resultado faz prever um efeito terapêutico prolongado da insulina, facto comprovado por estudos efectuados em animais, nos quais, se verificou uma redução significativa dos níveis sistémicos de glucose que se prolonga por um período de tempo superior a 48h, quando comparado com uma solução aquosa de insulina para inalação⁽⁴²⁾. Esta libertação bifásica de insulina poderá mimetizar as misturas de insulina

de curta duração e longa duração de acção existentes no mercado para injeção. Grenha e colegas produziram nanocompositos de quitosano com e sem revestimento lipídico obtidos por gelificação iónica seguida de secagem por aspersão. As nanopartículas obtidas possuíam um diâmetro médio entre 380 e 450nm e uma eficiência de encapsulação entre 65 e 81%. O quitosano possui características de mucoadesão que lhe confere a capacidade para promover a absorção de péptidos e proteínas através de mucosas. Estudos *in vitro* demonstram uma libertação rápida da insulina no caso dos nanocompositos sem revestimento lipídico e uma libertação controlada na formulação contendo revestimento lipídico. Porém, não foram efectuados estudos *in vivo* com as formulações para determinar o seu potencial terapêutico^(44,45). As nanopartículas de PBCA: dextrano obtidas por Zhang e colegas recorrendo ao método de polimerização *in situ* apresentam um diâmetro médio de 255nm e uma eficiência de encapsulação de 79%. Ensaio *in vitro* demonstram um perfil de libertação de insulina caracterizado por um *burst effect* inicial seguido de libertação prolongada. Estudos *in vivo* caracterizam-se por um efeito terapêutico prolongado no tempo quando comparado com solução de insulina administrada intratraquealmente e uma biodisponibilidade de 57% comparativamente com a administração subcutânea⁽⁴⁶⁾. Liu e colegas produziram nanopartículas lipídicas sólidas obtidas por dupla emulsão contendo micelas no seu interior com diâmetro médio 115nm e uma eficiência de encapsulação de 98%. Estudos *in vitro* demonstram libertação prolongada de insulina. Foi ainda demonstrada a retenção da integridade da insulina após encapsulação e estabilidade da formulação após 6 meses de acondicionamento a 4°C⁽⁴⁷⁾. Os lipossomas obtidos por Bi e colegas através da técnica de evaporação em fase reversa possuíam um diâmetro médio de 295nm e uma eficiência de encapsulação de 43%, tendo sido de seguida submetidos a congelação por aspersão e posterior evaporação do solvente. A formulação demonstrou ser estável após 3 meses de acondicionamento, promovendo uma diminuição dos níveis sistémicos de glucose prolongada no tempo (12h) quando comparada com soluções para administração pulmonar de insulina e injeção subcutânea⁽⁴³⁾. Huang e colegas produziram lipossomas recorrendo ao método de destabilização de membrana/diálise com diâmetro médio de 203nm e eficiência de encapsulação de 52%. Estudos *in vivo* demonstram uma deposição homogénea dos lipossomas nos alvéolos pulmonares, redução dos níveis sistémicos de glucose e ausência de imunoreacção do tecido pulmonar após administração⁽⁴⁸⁾.

CONCLUSÃO

Devido à fisiologia dos pulmões a administração de fármacos por via inalatória apresenta-se como uma promissora alternativa não invasiva à administração subcutânea de vários fármacos, entre eles, proteínas como a insulina. Este facto permite aumentar a *compliance* dos doentes com DM e iniciar a terapêutica insulinémica precocemente, otimizando assim o controlo glicémico e diminuindo os efeitos ma-

cro e microvasculares derivados dos elevados níveis de glucose plasmática.

Resultados em ensaios clínicos demonstram utilidade da insulina inalada pois, entre outros, alcançou controlo glicémico pós-prandial similar, menor aumento de peso corporal, menor incidência e severidade de hipoglicémia e maior satisfação por parte dos doentes em comparação com a injeção subcutânea de insulina regular.

A utilização de nanotransportadores permite, entre outros, proteger a insulina da degradação, diminuir a sua imunogenicidade e efeitos adversos, aumentar o transporte trans-epitelial e o uptake celular e obter formulações de libertação controlada. Desta forma, o problema da reduzida biodisponibilidade observada em formulações de insulina para administração pulmonar como o Exubera® poderá ser ultrapassado com recurso a nanotransportadores. Formulações de libertação controlada para administração pulmonar poderão reduzir ou anular a necessidade de injeções subcutâneas de insulina de longa duração de acção para o controlo glicémico nocturno.

Vários têm sido os estudos realizados com o intuito de desenvolver formulações de insulina recorrendo a nanotransportadores para administração oral ou pulmonar, tendo-se obtido diferentes percentagens de eficiência de encapsulação e de deposição alveolar, diferentes diâmetros médios e retenção da sua actividade biológica. Resultados preliminares com tais formulações para administração pulmonar demonstram redução significativa dos níveis sistémicos de glucose e efeito prolongado no tempo quando comparado com soluções para inalação não contendo nanotransportadores. Perspectiva-se um aumento do desenvolvimento de formulações contendo nanotransportadores para melhorar as propriedades de diversos fármacos como maior biodisponibilidade, libertação controlada ou direccionamento a determinados órgãos e tecidos. Permitem também a administração de fármacos hidrofóbicos insolúveis que, caso contrário, seriam excluídos na fase de desenvolvimento galénico apesar de possuírem elevado potencial terapêutico.

BIBLIOGRAFIA

- Brunton L, Lazo J, Parker K, editors. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th ed: McGraw-Hill Professional; 2006.
- Klingler C, Müller B, Steckel H. Insulin-micro- and nanoparticles for pulmonary delivery. *Int J Pharm.* 2009; 377(1-2): 173-9.
- Bailey M, Gorman E, Munson E, Berkland C. Pure insulin nanoparticle agglomerates for pulmonary delivery. *Langmuir.* 2008; 24(23): 13614-20.
- Bayat A, Larijani B, Ahmadian S, Junginger H, Rafiee-Tehrani M. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and its quaternized derivatives. *Nanomedicine.* 2008; 4(2): 115-20.
- Kumar P, Saini T, Chandrasekar D, Yellepeddi V, Ramakrishna S, Diwan P. Novel approach for delivery of insulin loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles using a combination of stabilizers. *Drug Deliv.* 2007; 14(8): 517-23.
- Cefalu W. Concept, strategies, and feasibility of noninvasive insulin delivery. *Diabetes Care.* 2004; 27(1): 239-46.
- Pickup J, Zhi Z, Khan F, Saxl T, Birch D. Nanomedicine and its potential in diabetes research and practice. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008; 24(8): 604-10.
- Sarmiento B, Ribeiro A, Veiga F, Ferreira D. Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2006; 53(2): 193-202.
- Goto T, Morishita M, Nishimura K, Nakanishi M, Kato A, Ehara J, et al. Novel mucosal insulin delivery systems based on fusogenic liposomes. *Pharm Res.* 2006; 23(2): 384-91.
- Sadrzadeh N, Glembourtt M, Stevenson C. Peptide drug delivery strategies for the treatment of diabetes. *J Pharm Sci.* 2007; 96(8): 1925-54.
- Skylar J, Cefalu W, Kourides I, Landschulz W, Balagtas C, Cheng S, et al. Efficacy of inhaled human insulin in type 1 diabetes mellitus: a randomised proof-of-concept study. *Lancet.* 2001; 357(9253): 331-5.
- Sweeney L, Wang Z, Loebenberg R, Wong J, Lange C, Finlay W. Spray-freeze-dried liposomal ciprofloxacin powder for inhaled aerosol drug delivery. *Int J Pharm.* 2005; 305(1-2): 180-5.
- Bailey M, Berkland C. Nanoparticle formulations in pulmonary drug delivery. *Med Res Rev.* 2009; 29(1): 196-212.
- Grenha A, Carrión-Recio D, Teijeiro-Osorio D, Seijo B, Remuñán-López C, editors. Nano and microparticulate carriers for pulmonary drug delivery. R.M.N. Ravi Kumar ed: American Scientific Publishers; 2008.
- Sung J, Pulliam B, Edwards D. Nanoparticles for drug delivery to the lungs. *Trends Biotechnol.* 2007; 25(12): 563-70.
- Henkin R. Inhaled insulin-Intrapulmonary, intranasal, and other routes of administration: Mechanisms of action. *Nutrition.* 2010; 26(1): 33-9.
- Tomoda K, Ohkoshi T, Nakajima T, Makino K. Preparation and properties of inhalable nanocomposite particles: effects of the size, weight ratio of the primary nanoparticles in nanocomposite particles and temperature at a spray-dryer inlet upon properties of nanocomposite particles. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2008; 64(1): 70-6.
- Davis S. The role of inhaled insulin in the treatment of type 2 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2008; 22(6): 420-9.
- Garg S, Kelly W. Insulin Delivery via Lungs – Is It Still Possible? *Diabetes Technology & Therapeutics.* 2009; 11(2): S-1-S-3.
- Rosenstock J, Cefalu W, Hollander P, Belanger A, Eliaschewitz F, Gross J, et al. Two-year pulmonary safety and efficacy of inhaled human insulin (Exubera) in adult patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2008; 31(9): 1723-8.
- Wolzt M, de la Peña A, Berclaz P, Tibaldi F, Gates J, Muchmore D. AIR inhaled insulin versus subcutaneous insulin: pharmacokinetics, glucodynamics, and pulmonary function in asthma. *Diabetes Care.* 2008; 31(4): 735-40.
- González Sarmiento E. [Inhaled insulin and its effects on the lungs]. *Arch Bronconeumol.* 2007; 43(12): 643-5.
- de Galan B, Simsek S, Tack C, Heine R. Efficacy and safety of inhaled insulin in the treatment of diabetes mellitus. *Neth J Med.* 2006; 64(9): 319-25.
- Cappelleri J, Cefalu W, Rosenstock J, Kourides I, Gerber R. Treatment satisfaction in type 2 diabetes: a comparison between an inhaled insulin regimen and a subcutaneous insulin regimen. *Clin Ther.* 2002; 24(4): 552-64.
- Karathanasis E, Bhavane R, Annapragada A. Glucose-sensing pulmonary delivery of human insulin to the systemic circulation of rats. *Int J Nanomedicine.* 2007; 2(3): 501-13.
- Ungaro F, d'Emmanuele di Villa Bianca R, Giovino C, Miro A,

- Sorrentino R, Quaglia F, et al. Insulin-loaded PLGA/cyclodextrin large porous particles with improved aerosolization properties: in vivo deposition and hypoglycaemic activity after delivery to rat lungs. *J Control Release*. 2009; 135(1): 25-34.
27. Nyambura B, Kellaway I, Taylor K. Insulin nanoparticles: stability and aerosolization from pressurized metered dose inhalers. *Int J Pharm*. 2009; 375(1-2): 114-22.
28. Cavalcanti A, Shirinzadeh B, Kretly L. Medical nanorobotics for diabetes control. *Nanomedicine*. 2008; 4(2): 127-38.
29. Pearce M, Melanko J, Salem A. Multifunctional nanorods for biomedical applications. *Pharm Res*. 2007; 24(12): 2335-52.
30. Torchilin V. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res*. 2007; 24(1): 1-16.
31. Yang W, Peters J, Williams R. Inhaled nanoparticles--a current review. *Int J Pharm*. 2008; 356(1-2): 239-47.
32. Lai S, Wang Y, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009; 61(2): 158-71.
33. Hartig S, Greene R, DasGupta J, Carlesso G, Dikov M, Prokop A, et al. Multifunctional nanoparticulate polyelectrolyte complexes. *Pharm Res*. 2007; 24(12): 2353-69.
34. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*. 2005; 113(7): 823-39.
35. Soppimath K, Aminabhavi T, Kulkarni A, Rudzinski W. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*. 2001; 70(1-2): 1-20.
36. Martins S, Sarmiento B, Ferreira D, Souto E. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery--liposomes versus lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2007; 2(4): 595-607.
37. Möller W, Felten K, Sommerer K, Scheuch G, Meyer G, Meyer P, et al. Deposition, retention, and translocation of ultrafine particles from the central airways and lung periphery. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 177(4): 426-32.
38. Renwick L, Brown D, Clouter A, Donaldson K. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med*. 2004; 61(5): 442-7.
39. Sarmiento B, Ferreira D, Jorgensen L, van de Weert M. Probing insulin's secondary structure after entrapment into alginate/chitosan nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007; 65(1): 10-7.
40. Vila A, Sánchez A, Tobío M, Calvo P, Alonso M. Design of biodegradable particles for protein delivery. *J Control Release*. 2002; 78(1-3): 15-24.
41. Yamamoto H, Hoshina W, Kurashima H, Takeuchi H, Kawashima Y, Yokoyama T, et al. Engineering of poly(DL-lactic-co-glycolic acid) nanocomposite particles for dry powder inhalation dosage forms of insulin with the spray-fluidized bed granulating system. *Advanced Powder Technology*. 2007; 18(2): 215-28.
42. Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H, Fujioka S, Hino T. Pulmonary delivery of insulin with nebulized DL-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres to prolong hypoglycemic effect. *J Control Release*. 1999; 62(1-2): 279-87.
43. Bi R, Shao W, Wang Q, Zhang N. Spray-freeze-dried dry powder inhalation of insulin-loaded liposomes for enhanced pulmonary delivery. *J Drug Target*. 2008; 16(9): 639-48.
44. Grenha A, Seijo B, Remuñán-López C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2005; 25(4-5): 427-37.
45. Grenha A, Remuñán-López C, Carvalho E, Seijo B. Microspheres containing lipid/chitosan nanoparticles complexes for pulmonary delivery of therapeutic proteins. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008; 69(1): 83-93.
46. Zhang Q, Shen Z, Nagai T. Prolonged hypoglycemic effect of insulin-loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles after pulmonary administration to normal rats. *Int J Pharm*. 2001; 218(1-2): 75-80.
47. Liu J, Gong T, Fu H, Wang C, Wang X, Chen Q, et al. Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. *Int J Pharm*. 2008; 356(1-2): 333-44.
48. Huang Y, Wang C. Pulmonary delivery of insulin by liposomal carriers. *J Control Release*. 2006; 113(1): 9-14.

