



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

(11) PI 1014760-8 B1



(22) Data do Depósito: 25/06/2010

(45) Data de Concessão: 13/04/2021

(54) Título: PREPARAÇÃO COMPREENDENDO INSULINA, NICOTINAMIDA E ARGININA

(51) Int.Cl.: A61K 38/28; A61K 31/465; A61K 47/18; A61P 3/10; A61K 45/06.

(30) Prioridade Unionista: 01/07/2009 US 61/222,168; 26/06/2009 EP 09 163940.1.

(73) Titular(es): NOVO NORDISK A/S.

(72) Inventor(es): HELLE BIRK OLSEN; SVEND HAVELUND; ULLA RIBEL; JEPPE STURIS; HELLE NAVER; MORTEN SCHLEIN; SVEND LUDVIGSEN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2010059069 de 25/06/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/149772 de 29/12/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 26/12/2011

(57) Resumo: PREPARAÇÃO COMPREENDENDO INSULINA, NICOTINAMIDA E UM AMINOÁCIDO. A presente invenção refere-se a preparações de insulina compreendendo um composto de insulina ou uma mistura de dois ou mais compostos de insulina, um composto nicotínico e um aminoácido.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"PREPARAÇÃO COMPREENDENDO INSULINA, NICOTINAMIDA E
ARGININA".**

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção refere-se a preparações farmacêuticas compreendendo um composto de insulina, um composto nicotínico e um aminoácido.

Antecedentes da Invenção

[0002] Diabetes mellitus é um distúrbio metabólico no qual a capacidade de utilizar glicose é parcialmente ou completamente perdida. Cerca de 5% de toda a população sofrem de diabetes e o distúrbio já se aproxima de proporções epidêmicas.

[0003] Desde a introdução na insulina na década de 1920, constantes aperfeiçoamentos vêm sendo feitos no tratamento do diabetes. Para evitar níveis glicêmicos altos, os pacientes diabéticos normalmente praticam uma terapia de múltiplas injeções, por meio da qual insulina é administrada junto com cada refeição. Como os pacientes diabéticos são tratados com insulina há várias décadas, são bastante necessárias preparações de insulina seguras e que melhorem a qualidade de vida. Entre as preparações de insulina comercialmente disponíveis, podemos mencionados as preparações de ação rápida, as de ação intermediária e as de ação prolongada.

[0004] No tratamento do diabetes mellitus, já foram sugeridas e usadas muitas variedades de preparações farmacêuticas de insulina, tais como insulina regular (tal como Actrapid[®]), insulina isófana (designada NPH), suspensões zíncicas de insulina (tais como Semilente[®], Lente[®], e Ultralente[®]), e insulina isófana bifásica (tal como NovoMix[®]). Análogos e derivados de insulina humana também já foram desenvolvidos, desenhados para perfis de ação específicos, isto é, ação rápida ou ação prolongada. Algumas das preparações de insulina

comercialmente disponíveis compreendendo tais análogos de insulina de ação rápida incluem NovoRapid® (preparação de insulina humana B28Asp), Humalog® (preparação de insulina humana B28LysB29Pro) e Apidra® (preparação de insulina humana B3LysB29Glu).

[0005] Os pedidos internacionais WO 91/09617 e WO/9610417 (Novo Nordisk A/S) divulgam preparações de insulina contendo nicotinamida ou ácido nicotínico ou um sal do mesmo.

[0006] As preparações farmacêuticas de insulinas mais frequentes são administradas por injeção subcutânea. O importante para o paciente é o perfil de ação da insulina, o que significa a ação da insulina no metabolismo da glicose em função do tempo de injeção. Neste perfil, entre outros fatores, são importantes o tempo de início de ação, o valor máximo e a duração total de ação. No caso de insulinas em bolo, uma variedade de preparações de insulina com diferentes perfis de ação são almejadas e requisitas pelos pacientes. Um paciente pode, no mesmo dia, usar preparações de insulina com perfis de ação muito diferentes. O perfil de ação desejado depende, por exemplo, da hora do dia e da quantidade e composição da refeição ingerida pelo paciente.

[0007] Igualmente importante para o paciente é a estabilidade química das preparações de insulina, por exemplo, devido ao uso excessivo de dispositivos de injeção do tipo caneta tais como os dispositivos que contêm cartuchos Penfill®, nos quais uma preparação de insulina fica armazenada até o cartucho inteiro ficar vazio, o que pode levar pelo menos 1 ou 2 semanas para dispositivos contendo cartuchos de 1,5-3,0 mL. Durante o armazenamento, ocorrem alterações químicas covalentes na estrutura da insulina. Isto pode levar à formação de moléculas que podem ser menos ativas e/ou potencialmente imunogênicas tais como produtos de desamidação e produtos de transformação de peso molecular mais alto (dímeros, polímeros). Além disso, também importante é a estabilidade física das preparações de

insulina, uma vez que o armazenamento prolongado pode eventualmente levar à formação de fibrilas insolúveis, que são biologicamente inativas e potencialmente imunogênicas.

Sumário da Invenção

[0008] A invenção refere-se a preparações de insulina com taxa de absorção vantajosa e estabilidade química e física vantajosa. A presente invenção refere-se a preparações de insulina compreendendo insulina humana e/ou análogos da mesma, nicotinamida ou ácido nicotínico e/ou sais dos mesmos e arginina.

[0009] Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a uma preparação de insulina compreendendo:

um composto de insulina,
um composto nicotínico, e
arginina.

[00010] Em uma outra modalidade a preparação de insulina pode compreender ainda ácido glutâmico.

[00011] Em uma outra modalidade, a presente invenção também contempla um método para o tratamento de diabetes mellitus em um indivíduo ou para reduzir o nível de glicose sanguínea em um indivíduo compreendendo administrar ao indivíduo ou mamífero uma preparação de insulina de acordo com a invenção.

Descrição dos Desenhos

[00012] A Figura 1 mostra o desenvolvimento em percentagem do teor total de insulina de produtos de degradação durante 2 semanas de armazenamento a 37°C de preparações de acordo com a presente invenção. A letra **A** refere-se à NovoRapid® de referência e as demais letras correspondem a preparações de insulina aspart descritas na Tabela 1 do Exemplo 1. Comparada com a preparação NovoRapid® (preparação **A**), a adição de nicotinamida (preparações **B** e **D**) leva a uma formação aumentada de produtos de degradação, ao passo que a

adição combinada de nicotinamida, ácido glutâmico e arginina (preparações **C** e **E**), apresenta um padrão de degradação bastante semelhante, com menos formação de proteína de alto peso molecular (HMWP). A Figura 2 mostra o desenvolvimento em percentagem do teor total de insulina de produtos de degradação durante 2 semanas de armazenamento a 37°C de preparações de acordo com esta invenção. A letra **A** refere-se à NovoRapid® de referência e as demais letras correspondem a preparações de insulina aspart descritas na Tabela 1 do Exemplo 1. A adição combinada de nicotinamida, ácido glutâmico e arginina, preparações **F**, **G**, **H**, e **I**, que diferem no sistema tamponante, tampão fosfato ou tris, e na concentração de insulina e Zn, 0,6 mM e 0,3 mM ou 1,2 mM e 0,6 mM, apresenta um padrão de degradação semelhante ao da preparação NovoRapid®, preparação **A**.

[00013] A Figura 3 mostra a concentração de glicose (média +/- SEM, N=8) no plasma depois de injeção subcutânea em porcos de uma dose de 1 nmol/kg em 0 minutos de preparações de acordo com esta invenção. A letra **A** refere-se à NovoRapid® de referência e as demais letras correspondem a preparações de insulina aspart descritas na Tabela 1 do Exemplo 1. Comparada com a preparação NovoRapid® (preparação **A**) a taxa inicial de redução da glicose plasmática é mais rápida para a preparação com adição de nicotinamida (preparação **N**) e ainda mais rápida para uma combinação de nicotinamida e arginina (preparação **M**).

[00014] A Figura 4 mostra a concentração de glicose no plasma (média +/- SEM, N=7) depois de injeção subcutânea em porcos de uma dose de 1 nmol/kg em 0 minutos de preparações de acordo com esta invenção. A letra **A** refere-se à NovoRapid® de referência e as demais letras correspondem a preparações de insulina aspart descritas na Tabela 1 do Exemplo 1. Comparada com a preparação NovoRapid® (preparação **A**), a taxa inicial de redução da glicose plasmática é mais

rápida para uma preparação com uma combinação de nicotinamida, arginina e ácido glutâmico (preparação **L**) e para uma preparação com uma combinação de nicotinamida e arginina (preparação **K**).

[00015] A Figura 5 mostra a concentração de insulina aspart no plasma (média +/- SEM, N=7) depois de injeção subcutânea em porcos de uma dose 1 nmol/kg em 0 minutos de preparações de acordo com esta invenção. A letra **A** refere-se à NovoRapid® de referência e as demais letras correspondem a preparações de insulina aspart descritas na Tabela 1 do Exemplo 1. Comparada com a preparação NovoRapid®, (preparação **A**), a taxa de absorção inicial do componente insulina das preparações com nicotinamida (preparação **J**), da combinação de nicotinamida e arginina (preparação **K**), e da combinação de nicotinamida, arginina e ácido glutâmico (preparação **L**) é acentuadamente mais rápida.

Descrição da Invenção

[00016] A absorção após injeção subcutânea do composto de insulina nas preparações de insulina da presente invenção mostrou-se surpreendentemente mais rápida que aquela das preparações de insulina de referência. Esta propriedade é útil para insulinas de ação rápida, em particular com relação a um regime de injeções múltiplas onde a insulina é administrada antes de cada refeição. Com um início de ação mais rápido, a insulina pode ser convenientemente tomada mais perto da refeição do que com soluções de insulina de ação rápida convencionais. Além disso, um desaparecimento mais rápido da insulina possivelmente reduz o risco de hipoglicemia após a refeição.

[00017] As preparações de insulina da presente invenção compreendem preparações de insulina de ação rápida compreendendo um composto de insulina tal como insulina aspart, um composto nicotínico, tal como nicotinamida e o aminoácido arginina. Opcionalmente, as preparações de insulina da presente invenção podem compreender outros

aminoácidos tais como ácido glutâmico. Estas preparações de insulina têm um perfil de absorção rápida que imita a fisiologia normal de uma forma mais exata do que as terapias existentes. Além disso, as preparações de insulina da presente invenção possuem estabilidade química e física adequadas para preparações farmacêuticas comerciais.

[00018] As preparações de insulina da presente invenção proporcionam um início de ação ainda mais rápido em relação às terapias com insulina já existentes. Tais preparações de insulina de ação ultra-rápida apresentam a vantagem de restaurar a primeira fase da secreção de insulina, conveniência de injeção e interrupção da produção de glicose hepática. As preparações de insulina da presente invenção apresentam uma taxa de absorção favorável da subcutis para o plasma com um aumento na taxa de absorção inicial variando de 1,5 a 5 vezes, em comparação com preparações convencionais tais como NovoRapid[®], conforme sugerido por várias experiências PK/PD em porcos. Esta taxa de absorção mais rápida pode melhorar o controle glicêmico e a conveniência e pode possibilitar uma troca da medicação antes das refeições para medicação após as refeições. A presente invenção baseia-se, em parte, na surpreendente constatação de que, embora a adição de nicotinamida possibilite um aumento na taxa de absorção, ela também pode ter um efeito negativo na estabilidade química aumentando significativamente a quantidade de HMWP. As preparações de insulina da presente invenção apresentam um estabilidade química melhorada por meio da adição de arginina, o que se reflete por exemplo em uma redução na formação de dímeros e polímeros e desamido de insulinas após armazenamento. As preparações de insulina da presente invenção podem ademais ter uma estabilidade física melhorada, o que pode ser útil para uso em bombas.

[00019] A presente invenção oferece uma preparação de insulina

compreendendo um composto de insulina de acordo com a presente invenção que está presente em uma concentração de cerca de 0,1 mM a cerca de 10,0 mM, e onde referida preparação tem um pH de 3 a 8,5. A preparação também compreende um composto nicotínico e arginina. A preparação pode compreender ainda inibidores de protease, íons metálicos, um sistema tamponante, preservativos, agentes de tonicidade, agentes quelantes, estabilizantes e tensoativos.

[00020] Em uma modalidade as preparações de insulina compreendem uma insulina humana, um análogo ou combinações das mesmas, nicotinamida e/ou ácido nicotínico e/ou sais dos mesmos e arginina e/ou sais dos mesmos.

[00021] Em uma modalidade, as preparações de insulina de acordo com a presente invenção compreendem uma solução aquosa de insulina humana B28Asp, nicotinamida e arginina.

[00022] O teor de insulina humana B28Asp nas soluções desta invenção podem variar na faixa de 15 a 500 unidades internacionais (IU)/mL, de preferência na faixa de 50 a 333 IU/mL, nas preparações para injeção. No entanto, com o objetivo de administração parenteral, o teor do composto de insulina pode ser mais alto.

[00023] Também se encontra descrita neste relatório uma preparação de insulina compreendendo um composto de insulina, um composto nicotínico e ácido glutâmico.

[00024] No presente contexto a unidade "IU" corresponde a 6 nmol.

[00025] O termo "insulina aspart" refere-se ao análogo de insulina humana insulina humana B28Asp.

[00026] O termo "início de ação" refere-se ao tempo desde a injeção até a curva PK se deslocar para um aumento.

[00027] O termo "taxa de absorção" refere-se à inclinação da curva PK.

[00028] Um "composto de insulina" de acordo com a invenção deve

ser entendido neste relatório como as insulina humana, um análogo de insulina e/ou qualquer combinação dos mesmos.

[00029] O termo "insulina humana" conforme usado neste relatório significa o hormônio humano cuja estrutura e propriedades são bastante conhecidas. A insulina humana possui duas cadeias polipeptídicas que são conectadas por pontes dissulfeto entre resíduos cisteína, a saber, a cadeia A e a cadeia B. A cadeia A é um peptídeo de 21 aminoácidos e a cadeia B é um peptídeo de 30 aminoácidos, as duas cadeias estando conectadas por três pontes dissulfeto: uma entre as cisteínas nas posições 6 e 11 da cadeia A, a segunda entre a cisteína posição 7 da cadeia A e a cisteína na posição 7 da cadeia B, e a terceira entre a cisteína na posição 20 da cadeia A e a cisteína na posição 19 da cadeia B.

[00030] O hormônio é sintetizado como uma proinsulina precursora de cadeia simples (preproinsulina) consistindo em um prepeptídeo de 24 aminoácidos seguido por uma proinsulina contendo 86 aminoácidos na configuração: prepeptídeo-B-Arg Arg-C-Lys Arg-A, onde C é um peptídeo de conexão dos 31 aminoácidos. Arg-Arg e Lys-Arg são sítios de clivagem para clivagem do peptídeo de ligação das cadeias A e B.

[00031] Por "análogo de insulina" conforme usado neste relatório entende-se um polipeptídeo derivado da estrutura primária de uma insulina natural, por exemplo aquela da insulina humana, por mutação. Uma ou mais mutações são feitas por deleção e/ou substituição de pelo menos um resíduo aminoacídico que ocorre na insulina natural e/ou por adição de pelo menos um resíduo aminoacídico. Os resíduos aminoacídicos adicionados e/ou substituídos podem ser resíduos aminoacídicos codificáveis ou outros resíduos aminoacídicos de ocorrência natural.

[00032] Em uma modalidade um análogo de insulina compreende menos de 8 modificações (substituições, deleções, adições e qualquer

combinação das mesmas) em relação à insulina parental, alternativamente menos de 7 modificações em relação à insulina parental, alternativamente menos de 6 modificações em relação à insulina parental, alternativamente menos de 5 modificações em relação à insulina parental, alternativamente menos de 4 modificações em relação à insulina parental, alternativamente menos de 3 modificações em relação à insulina parental, alternativamente menos de 2 modificações em relação à insulina parental.

[00033] As mutações na molécula de insulina são representadas indicando-se a cadeia (A ou B), a posição, e o código de três letras do aminoácido substituindo o aminoácido nativo. Por "desB30" ou "B(1-29)" entende-se uma cadeia B da insulina natural ou um análogo da mesma sem o resíduo aminoacídico B30, e por insulina humana B28Asp entende-se insulina humana onde o resíduo aminoacídico na posição 28 da cadeia B fora substituído por Asp.

[00034] Exemplos de análogos de insulina são aqueles onde Pro na posição 28 da cadeia B é mutado com Asp, Lys, Leu, Val, ou Ala e/ou Lys na posição B29 é mutado com Pro, Glu ou Asp. Além disso, Asn na posição B3 pode ser mutado com Thr, Lys, Gln, Glu ou Asp. O resíduo aminoacídico na posição A21 pode ser mutado com Gly. O aminoácido na posição B1 pode ser mutado com Glu. O aminoácido na posição B16 pode ser mutado com Glu ou His. Outros exemplos de análogos de insulina são os análogos por deleção, por exemplo análogos nos quais o aminoácido B30 na insulina humana fora deletado (insulina humana des(B30)), análogos de insulina onde o aminoácido B1 na insulina humana fora deletado (insulina humana des(B1)), insulina humana des(B28-B30) e insulina humana des(B27). Análogos de insulina nos quais a cadeia A e/ou a cadeia B têm uma extensão N-terminal e análogos de insulina nos quais a cadeia A e/ou a cadeia B têm uma extensão C-terminal tais como aqueles com dois resíduos arginina

adicionados ao terminal C da cadeia B também são exemplos de análogos de insulina. Outros exemplos são análogos de insulina compreendendo combinações das mutações mencionadas. Análogos de insulina nos quais o aminoácido na posição A14 é Asn, Gln, Glu, Arg, Asp, Gly ou His, o aminoácido na posição B25 é His e que opcionalmente compreendem ainda uma ou mais mutações adicionais constituem outros exemplos de análogos de insulina. Análogos de insulina da insulina humana nos quais o resíduo aminoacídico na posição A21 é Gly e nos quais o análogo de insulina é ainda prolongado no terminal C com dois resíduos arginina também são exemplos de análogos de insulina.

[00035] Outros exemplos de análogos de insulina incluem, porém sem limitação: insulina humana DesB30; insulina humana AspB28; insulina humana AspB28,desB30; insulina humana LysB3,GluB29; insulina humana LysB28,ProB29; insulina humana GlyA21,ArgB31,ArgB32; insulina humana GluA14,HisB25; insulina humana HisA14,HisB25; insulina humana GluA14,HisB25,desB30; insulina humana HisA14, HisB25,desB30; insulina humana GluA14,HisB25,desB27,desB28,desB29,desB30; insulina humana GluA14,HisB25,GluB27,desB30; insulina humana GluA14,HisB16,HisB25,desB30; insulina humana HisA14,HisB16,HisB25,desB30; insulina humana HisA8,GluA14,HisB25,GluB27,desB30; insulina humana HisA8,GluA14,GluB1,GluB16,HisB25,GluB27,desB30; insulina humana e insulina humana HisA8,GluA14,GluB16,HisB25,desB30.

[00036] O termo "composto nicotínico" inclui nicotinamida, ácido nicotínico, niacina, niacinamida e vitamina B3 e/ou sais dos mesmos e/ou qualquer combinação dos mesmos.

[00037] De acordo com a presente invenção, a concentração do composto nicotínico e/ou sais dos mesmos varia na faixa de cerca de 1

mM a cerca de 300 mM ou de cerca de 5 mM a cerca de 200 mM.

[00038] O termo "arginina" ou "Arg" inclui o aminoácido arginina e/ou um sal do mesmo.

[00039] Em uma modalidade, a preparação de insulina compreende 1 a 100 mM de arginina.

[00040] Em uma modalidade, a preparação de insulina compreende 1 a 20 mM de arginina.

[00041] Em uma modalidade, a preparação de insulina compreende 20 a 90 mM de arginina.

[00042] Em uma modalidade, a preparação de insulina compreende 30 a 85 mM de arginina.

[00043] O termo "ácido glutâmico" ou "Glu" inclui o aminoácido ácido glutâmico e/ou um sal do mesmo.

[00044] Em uma modalidade, a preparação de insulina compreende 1 a 100 mM de ácido glutâmico.

[00045] Em uma modalidade, a preparação de insulina compreende 20 a 90 mM de ácido glutâmico.

[00046] Em uma modalidade, a preparação de insulina compreende 30 a 85 mM de ácido glutâmico.

[00047] O termo "preparação farmacêutica" ou "preparação de insulina" conforme usado neste relatório significa um produto compreendendo um composto de insulina, isto é, uma insulina humana, um análogo da mesma e/ou combinações da mesma e um composto nicotínico e um aminoácido, opcionalmente junto com outros excipientes tais como preservativos, agentes quelantes, modificadores da tonicidade, agentes de encoimento, estabilizantes, antioxidantes, polímeros e tensoativos, íons metálicos, veículos oleaginosos e proteínas (por exemplo, albumina sérica humana, gelatina ou proteínas), a referida preparação de insulina sendo útil para o tratamento, prevenção ou redução da severidade de uma doença ou

distúrbio por administração da referida preparação de preparação de insulina a uma pessoa. Portanto, uma preparação de insulina também é conhecida na técnica como uma preparação farmacêutica ou composição farmacêutica.

[00048] O tampão pode ser selecionado do grupo que consiste em, porém sem limitação, acetato de sódio, carbonato de sódio, citrato, fosfato diácido de sódio, fosfato ácido dissódico, fosfato de sódio, e tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico ou misturas dos mesmos. Cada um destes tampões constitui uma modalidade alternativa da invenção.

[00049] A preparação de insulina da presente invenção pode compreender ainda outros componentes comuns em preparações de insulina, por exemplo agentes complexantes de zinco tal como citrato, e tampões à base de fosfato.

[00050] Glicerol e/ou manitol e/ou cloreto de sódio podem estar presentes em uma quantidade correspondente a uma concentração de 0 a 250 mM, 0 a 200 mM ou 0 a 100 mM.

[00051] Estabilizantes, tensoativos e preservativos também podem estar presentes nas preparações de insulina desta invenção.

[00052] As preparações de insulina da presente invenção podem compreender ainda um preservativo farmacêuticamente aceitável. O preservativo pode estar presente em uma quantidade suficiente para obter um efeito de preservação. A quantidade de preservativo em uma preparação de insulina pode ser determinado por exemplo a partir da literatura no campo e/ou das quantidades conhecidas de preservativo por exemplo em produtos comerciais. Cada um desses preservativos específicos constitui uma modalidade alternativa da invenção. O uso de um preservativo em preparações farmacêuticas está descrito, por exemplo, em Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th

edition, 1995.

[00053] O preservativo presente na preparação de insulina desta invenção pode ser o mesmo que aqueles usados até hoje nas preparações de insulina convencionais, por exemplo fenol, m-cresol e metilparabeno.

[00054] A preparação de insulina da presente invenção pode compreender ainda um agente quelante. O uso de um agente quelante em preparações farmacêuticas é bastante conhecido pelo especialista na técnica. A título de conveniência fazemos referência a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th edition, 1995.

[00055] A preparação de insulina da presente invenção pode compreender ainda um estabilizante. O termo "estabilizante" conforme usado neste relatório refere-se a produtos químicos adicionados a preparações farmacêuticas contendo polipeptídeo a fim de estabilizar o peptídeo, isto é, para aumentar a vida de prateleira ou o tempo em uso de tais preparações. A título de conveniência fazemos referência a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th edition, 1995.

[00056] A preparação de insulina da presente invenção pode compreender ainda um tensoativo. O termo "tensoativo" conforme usado neste relatório refere-se a todas as moléculas ou íons que são compreendidas de uma parte solúvel em água (hidrófila), a cabeça, e um segmento solúvel em gordura (lipofílico). Os tensoativos se acumulam de preferência nas interfaces, cuja parte hidrófila é orientada para a água (fase hidrófila) e a parte lipofílica para a fase oleosa ou hidrófoba (isto é, vidro, ar, óleo etc.). A concentração à qual os tensoativos começam a formar micelas é conhecida como a concentração de micelas crítica ou CMC. Além disso, os tensoativos diminuem a tensão superficial de um líquido. Os tensoativos também são conhecidos como compostos anfipáticos. O termo "detergente" em geral é um sinônimo usado para tensoativos. O uso de um tensoativo

em preparações farmacêuticas é bastante conhecido pelo especialista na técnica. A título de conveniência fazemos referência a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th edition, 1995.

[00057] Em uma outra modalidade a invenção refere-se a uma preparação de insulina compreendendo uma solução aquosa de um composto de insulina da presente invenção, e um tampão, onde o referido composto de insulina está presente em uma concentração de 0,1 mM ou mais, e onde a referida preparação tem um pH de cerca de 3,0 a cerca de 8,5 à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$).

[00058] A presente invenção também se refere a métodos para produzir as preparações de insulina da invenção.

[00059] Em uma modalidade, o método para fazer preparações de insulina da invenção compreende:

a) preparar uma solução por dissolução do composto de insulina ou de uma mistura de compostos de insulina em água ou tampão;

b) preparar uma solução por dissolução de um íon metálico divalente em água ou tampão;

c) preparar uma solução por dissolução de um preservativo em água ou tampão;

d) preparar uma solução por dissolução de um agente de isotonicidade em água ou tampão ;

e) preparar uma solução por dissolução de um tensoativo e/ou um estabilizante em água ou tampão;

f) misturar a solução a) e uma ou mais das soluções b), c), d), e e);

Finalmente ajustar o pH da mistura em f) no pH desejado seguido por uma filtração estéril.

[00060] As preparações de insulina da presente invenção podem ser usadas no tratamento de diabetes por administração parenteral.

Recomenda-se que a dosagem das preparações de insulina desta invenção a ser administrada ao paciente seja determinada pelo médico.

[00061] A administração parenteral pode ser feita por injeção subcutânea,, intramuscular, intraperitoneal ou intravenosa por meio de uma seringa, opcionalmente uma seringa do tipo caneta. Alternativamente, a administração parenteral pode ser feita por meio de uma bomba de infusão. Como uma outra alternativa, as preparações de insulina contendo o composto de insulina da invenção também podem ser adaptados para administração transdérmica, por exemplo por injeção sem agulha ou a partir de um emplastro, opcionalmente um emplastro iontoforético, ou por administração transmucosa, por exemplo bucal.

[00062] As preparações de insulina de acordo com a presente invenção podem ser administradas ao paciente com necessidade de tal tratamento em vários sítios, por exemplo, em sítios tópicos, por exemplo, sítios da pele e da mucosa, em sítios que desviam a absorção, por exemplo, administração em uma artéria, em uma veia, no coração, em sítios que envolvem absorção, por exemplo, administração na pele, sob a pele, em um músculo ou no abdômen.

[00063] Em uma modalidade da invenção a preparação de insulina é uma preparação aquosa, isto é, preparação compreendendo água. Tal preparação é tipicamente uma solução ou uma suspensão. Em uma outra modalidade da invenção a preparação de insulina é uma solução aquosa.

[00064] O termo "preparação aquosa" é definido como uma preparação compreendendo pelo menos 50% p/p de água. Igualmente, o termo "solução aquosa" é definido como uma solução compreendendo pelo menos 50% p/p de água, e o termo "suspensão aquosa" é definido como uma suspensão compreendendo pelo menos 50% p/p de água.

[00065] As suspensões aquosas podem conter os compostos ativos

em mistura com excipientes adequados para a produção de suspensões aquosas.

[00066] Em uma modalidade, as preparações de insulina desta invenção são bastante adequadas para aplicação por dispositivos do tipo caneta usados para terapia com insulina por injeção.

[00067] Em uma modalidade as preparações de insulina da presente invenção podem ser usadas em bombas para administração de insulina.

[00068] O termo "estabilidade física" da preparação de insulina conforme usado neste relatório refere-se à tendência da proteína para formar agregados biologicamente inativos e/ou insolúveis da proteína como resultado da exposição da proteínas a esforços termomecânicos e/ou interação com interfaces e superfícies que são desestabilizantes, tais como superfícies e interfaces hidrófobas. A estabilidade física das preparações aquosas de proteínas é avaliada por meio de inspeção visual e/ou medições da turvação depois de exposição da preparação introduzida em recipientes adequados (por exemplo cartuchos ou frascos) a esforços mecânicos/físicos (por exemplo agitação) a diferentes temperaturas por vários períodos de tempo. A inspeção visual das preparações é feita em uma luz de foco nítido com um fundo escuro. A turvação da preparação é caracterizada por um escore visual que classifica o grau de turvação por exemplo em uma escala de 0 a 3 (uma preparação que não exhibe turvação corresponde a um escore visual 0, e uma preparação que exhibe turvação à luz do dia corresponde a um escore visual 3). Uma preparação é classificada como fisicamente instável em relação à agregação da proteína, quando ela exhibe turvação visual à luz do dia. Alternativamente, a turvação da preparação pode ser avaliada por simples medições da turvação bastante conhecidas pelo especialista na técnica. A estabilidade física das preparações aquosas de proteína também pode ser avaliada usando-se um agente ou sonda espectroscópicos da condição conformacional da proteína. A sonda é

de preferência uma molécula pequena que de preferência se liga a um confôrmero não nativo da proteína. Um exemplo de uma sonda espectroscópica molecular pequena da estrutura da proteína é a tioflavina T. Tioflavina T é um corante fluorescente que vem sendo amplamente usada para a detecção de fibrilas amiloides. Na presença de fibrilas, e talvez também de outras configurações proteicas, a tioflavina T dá origem a um novo máximo de excitação a cerca de 450 nm emissão acentuada a cerca de 482 nm quando ligada a uma forma de proteína fibrilar. A tioflavina T não ligada é essencialmente não fluorescente nos comprimentos de onda.

[00069] O termo "estabilidade química" da preparação de proteína conforme usado neste relatório refere-se a alterações na estrutura covalente da proteína que levam à formação de produtos de degradação química com menos potência biológica potencial e/ou com potenciais propriedades imunogênicas aumentadas comparada com a estrutura da proteína nativa. Vários produtos de degradação química podem ser formados, dependendo do tipo e da natureza da proteína nativa e do ambiente ao qual a proteína é exposta. Quantidades crescentes de produtos de degradação química geralmente são observadas durante o armazenamento e uso da preparação de proteínas. A maioria das proteínas tendem à desamidação, um processo no qual o grupo amida da cadeia lateral nos resíduos glutaminil ou asparaginil é hidrolisado para formar um ácido carboxílico livre ou resíduos asparaginil para formar um derivado IsoAsp. Outras rotas de degradação envolve a formação de produtos de alto peso molecular onde duas ou mais moléculas de proteína são covalentemente ligadas uma à outra através de transamidação e/ou interações dissulfeto levando à formação de produtos de degradação diméricos, oligoméricos ou poliméricos covalentemente ligados (*Stability of Protein Pharmaceuticals*, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, New York 1992). Oxidação (por

exemplo de resíduos metionina) pode ser mencionada como uma outra variante de degradação química. A estabilidade química da preparação de proteínas pode ser avaliada medindo-se a quantidade dos produtos de degradação química em várias ocasiões após exposição a diferentes condições ambientais (a formação de produtos de degradação normalmente pode ser acelerada por exemplo pelo aumento de temperatura). A quantidade de cada produto de degradação individual normalmente é determinada por separação dos produtos de degradação dependendo do tamanho e/ou da carga da molécula usando-se várias técnicas de cromatografia (por exemplo SEC-HPLC e/ou RP-HPLC). Como os produtos de HMWP são potencialmente imunogênicos e não biologicamente ativos, baixos níveis de HMWP são vantajosos.

[00070] O termo "preparação estabilizada" refere-se a uma preparação com estabilidade física aumentada, estabilidade química aumentada ou estabilidade físico-química aumentada. Em geral, uma preparação deve ser estável durante o uso e o armazenamento (de acordo com as condições recomendadas de uso e armazenamento) até a data de vencimento.

[00071] O termo "diabetes" ou "diabetes mellitus" inclui diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes gestacional (durante a gravidez) e outras doenças que causem hiperglicemia. O termo é usado para indicar um distúrbio metabólico no qual o pâncreas produz quantidades insuficientes de insulina, ou no qual as células do corpo não respondem apropriadamente à insulina impedindo assim que as células absorvam glicose. Como resultado, a glicose se acumula no sangue.

[00072] Diabetes tipo 1, também chamada de diabetes mellitus dependente de insulina (IDDM) e diabetes de início na juventude, é causado por destruição das células B, geralmente levando a uma deficiência absoluta de insulina.

[00073] Diabetes tipo 2, também conhecida como diabetes mellitus não dependente de insulina li (NIDDM) e diabetes de início na vida adulta, está associado à resistência predominante à insulina e por conseguinte deficiência relativa de insulina e/ou um defeito predominantemente secretório de insulina com resistência à insulina.

[00074] O termo "farmaceuticamente aceitável" conforme usado neste relatório significa adequado para aplicações farmacêuticas normais, isto é, que não provoca eventos adversos graves nos pacientes.

[00075] O termo "tratamento de uma doença" conforme usado neste relatório significa o controle e cuidado de um paciente que já desenvolveu a doença, condição ou distúrbio e inclui tratamento, prevenção ou alívio da doença. O objetivo do tratamento é combater a doença, condição ou distúrbio. Tratamento inclui a administração dos compostos ativos para eliminar ou controlar a doença, condição ou distúrbio assim como para aliviar os sintomas ou complicações associados à doença, condição ou distúrbio, e prevenção da doença, condição ou distúrbio.

[00076] Em uma outra modalidade, um análogo de insulina de acordo com a invenção é para ser usado como um medicamento para retardar ou prevenir a evolução da doença no diabetes tipo 2.

[00077] Em uma modalidade da presente invenção, a preparação de insulina de acordo com a invenção é para ser usada como um medicamento para o tratamento ou a prevenção de hiperglicemia incluindo hiperglicemia induzida por estresse, diabetes tipo 2, tolerância prejudicada à glicose, diabetes tipo 1, e queimaduras, incisões cirúrgicas e outras doenças ou lesões nas quais um efeito anabólico se faz necessário no tratamento, infarto do miocárdio, derrame, doença cardíaca coronariana e outros distúrbios cardiovasculares é oferecida.

[00078] Em uma outra modalidade da presente invenção, um método

para o tratamento ou a prevenção de hiperglicemia incluindo hiperglicemia induzida por estresse, diabetes tipo 2, tolerância prejudicada à glicose, diabetes tipo 1, e queimaduras, incisões cirúrgicas e outras doenças ou lesões nas quais um efeito anabólico se faz necessário no tratamento, infarto do miocárdio, doença cardíaca coronariana e outros distúrbios cardiovasculares, derrame, o método compreendendo administrar a um paciente com necessidade de tal tratamento uma quantidade eficaz para tal tratamento de uma preparação de insulina de acordo com a invenção, é oferecido.

[00079] O tratamento com uma preparação de insulina de acordo com a presente invenção também pode ser combinado com uma segunda ou mais substâncias farmacologicamente ativas, por exemplo selecionadas dentre agentes antidiabéticos, agentes antiobesidade, agentes reguladores do apetite, agentes anti-hipertensivos, agentes para o tratamento e/ou a prevenção de complicações resultantes de diabetes ou associadas ao mesmo e agentes para o tratamento e/ou a prevenção de complicações e distúrbios resultantes de obesidade ou associados à mesma.

[00080] O tratamento com uma preparação de insulina de acordo com a presente invenção também pode ser combinado com cirurgia bariátrica - uma cirurgia que influencia os níveis de glicose e/ou a homeostasia dos lipídios tais como bandagem gástrica ou desvio gástrico.

[00081] A produção de polipeptídios, por exemplo, insulinas, é bastante conhecida na literatura. Um análogo de insulina de acordo com a invenção pode por exemplo ser produzido por síntese de peptídios clássica, por exemplo síntese de peptídios em fase sólida usando a química de t-Boc ou Fmoc ou outras técnicas bem estabelecidas, vide por exemplo Greene & Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 1999. O análogo de insulina também pode ser

produzido por um método que compreende cultivar uma célula hospedeira contendo uma sequência de DNA codificando o análogo e capaz de expressar o análogo de insulina em um meio nutriente adequado em condições que permitam a expressão do análogo de insulina. Para análogos de insulina compreendendo resíduos aminoacídicos artificiais, a célula recombinante deve ser modificada de tal maneira que os aminoácidos artificiais sejam incorporados no análogo, por exemplo através do uso de mutantes de tRNA. Portanto, em resumo, os análogos de insulina de acordo com a invenção são preparados de maneira análoga à preparação de análogos de insulina conhecidos.

[00082] Diversos métodos podem ser usados para a produção de insulina humana e de análogos de insulina humana. Por exemplo, três métodos importantes que são usados na produção de insulina em micro-organismos estão descritos no documento WO2008034881. Dois destes envolvem *Escherichia coli*, seja com a expressão de uma proteína de fusão grande no citoplasma (Frank et al. (1981) in Peptides: Proceedings of the 7th American Peptide Chemistry Symposium (Rich & Gross, eds.), Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. págs. 729-739), seja com o uso de um peptídeo de sinal para permitir a secreção no espaço periplasmático (Chan et al. (1981) PNAS 78:5401-5404). Um terceiro método utiliza *Saccharomyces cerevisiae* para secretar um precursor de insulina no meio (Thim et al. (1986) PNAS 83:6766-6770). A técnica anterior divulga inúmeros precursores de insulina que são expressos em *E. coli* ou *Saccharomyces cerevisiae*, vide os documentos US 5.962.267, WO 95/16708, EP 0055945, EP 0163529, EP 0347845 e EP 0741188.

[00083] Os análogos de insulina são produzidos por expressão de uma sequência de DNA codificando o análogo de insulina em questão em uma célula hospedeira adequada por técnicas bastante conhecidas

divulgadas por exemplo no documento US 6500645. O análogo de insulina ou é expresso diretamente ou como uma molécula parceira que possui uma extensão N-terminal na cadeia B ou uma extensão C-terminal na cadeia B. A extensão N-terminal pode ter a função de aumentar o rendimento do produto expresso diretamente e pode ter até 15 resíduos aminoacídicos de comprimento. A extensão N-terminal deve ser clivada in vitro depois de isolamento do caldo de cultura e portanto terá um sítio de clivagem perto de B1. Extensões N-terminais do tipo adequado na presente invenção estão descritas nos documentos US 5.395.922, e EP 765.395. A extensão C-terminal pode ter a função de proteger a molécula de insulina madura ou de análogo de insulina contra processamento proteolítico intracelular por exoproteases da célula hospedeira. A extensão C-terminal deve ser clivada seja extracelularmente no caldo de cultura pela carboxipeptidase ativa secretada ou in vitro depois de isolamento do caldo de cultura. Um método para produzir insulina madura e análogos de insulina com extensões C-terminais na cadeia B que são removidas por carboxipeptidase está descrito no documento WO 08037735. O produto de insulina alvo do processo pode ser uma insulina humana de duas cadeias ou um análogo de insulina humana de duas cadeias que pode ter ou não uma extensão C-terminal curta da cadeia B. Se o produto de insulina alvo não tiver uma extensão C-terminal da cadeia B, então a referida extensão C-terminal deve poder ser subsequentemente clivada da cadeia B antes de etapas de purificação posteriores.

[00084] A presente invenção também contempla a lista não limitativa de modalidades a seguir, que estão descritas ainda em alguma parte deste relatório.

1. Uma preparação de insulina compreendendo:
um composto de insulina,
um composto nicotínico, e

arginina.

2. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 1, onde o composto de insulina é insulina humana ou um análogo de insulina.

3. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina é a insulina humana B28Asp.

4. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina é a insulina humana B28LysB29Pro.

5. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina é a insulina humana B3LysB29Glu.

6. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está presente em uma faixa selecionada dentre as seguintes: 0,1-10,0 mM; 0,1-3,0 mM; 0,1-2,5 mM; 0,1-2,0 mM; 0,1-1,5 mM; 0,2-2,5 mM; 0,2-2,0 mM; 0,2-1,5 mM; 0,3-3,0 mM; 0,3-2,5 mM; 0,3-2,0 mM; 0,3-1,5 mM; 0,5-1,3 mM and 0,6-1,2 mM.

7. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está presente em uma quantidade de cerca de 0,1 mM a cerca de 10,0 mM.

8. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está presente em uma quantidade de cerca de 0,1 mM a cerca de 3,0 mM.

9. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está presente em uma quantidade de cerca de 0,1 mM a cerca de 2,5 mM.

10. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está

presente em uma quantidade de cerca de 0,1 mM a cerca de 2,0 mM.

11. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está presente em uma quantidade de cerca de 0,1 mM a cerca de 1,5 mM.

12. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está presente em uma quantidade de cerca de 0,2 mM a cerca de 2,5 mM.

13. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está presente em uma quantidade de cerca de 0,2 mM a cerca de 2,0 mM.

14. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está presente em uma quantidade de cerca de 0,2 mM a cerca de 1,5 mM.

15. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está presente em uma quantidade de cerca de 0,3 mM a cerca de 3,0 mM.

16. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está presente em uma quantidade de cerca de 0,3 mM a cerca de 2,5 mM.

17. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está presente em uma quantidade de cerca de 0,3 mM a cerca de 2,0 mM.

18. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está presente em uma quantidade de cerca de 0,3 mM a cerca de 1,5 mM.

19. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está presente em uma quantidade de cerca de 0,5 mM a cerca de 1,3 mM.

20. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está

presente em uma quantidade de cerca de 0,3 mM a cerca de 1,2 mM.

21. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está presente em uma quantidade de cerca de 0,6 mM a cerca de 1,2 mM.

22. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está presente em uma quantidade de cerca de 0,6 ou cerca de 1,2 mM.

23. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está presente em uma quantidade de cerca de 0,3 mM.

24. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está presente em uma quantidade de cerca de 0,6 mM.

25. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto de insulina está presente em uma quantidade de cerca de 1,2 mM.

26. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto nicotínico é selecionado do grupo que consiste em nicotinamida, ácido nicotínico, niacina, niacinamida e vitamina B3 e/ou sais dos mesmos e/ou qualquer combinação dos mesmos.

27. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto nicotínico é selecionado dentre nicotinamida e ácido nicotínico e/ou sais dos mesmos e/ou qualquer combinação dos mesmos.

28. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o composto nicotínico está presente em uma faixa selecionada dentre as seguintes: 1-300 mM; 5-200 mM; 40-120 mM, 70-140 mM ou 80-130 mM.

29. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma

das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 1 mM a cerca de 300 mM do composto nicotínico.

30. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 8 mM a cerca de 260 mM do composto nicotínico.

31. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 5 mM a cerca de 200 mM do composto nicotínico.

32. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 1 mM a cerca de 150 mM do composto nicotínico.

33. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 5 mM a cerca de 20 mM do composto nicotínico.

34. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 20 mM a cerca de 120 mM do composto nicotínico.

35. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 40 mM a cerca de 120 mM do composto nicotínico.

36. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 20 mM a cerca de 40 mM do composto nicotínico.

37. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 60 mM a cerca de 80 mM do composto nicotínico.

38. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 70 mM a cerca de 140 mM do composto nicotínico.

39. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma

das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 80 mM a cerca de 130 mM do composto nicotínico.

40. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 8 mM, 30 mM, 100 mM ou 130 mM do composto nicotínico.

41. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 8 mM do composto nicotínico.

42. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 30 mM, 100 mM ou 130 mM do composto nicotínico.

43. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 30 mM do composto nicotínico.

44. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 100 mM do composto nicotínico.

45. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 130 mM do composto nicotínico.

46. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 150 mM do composto nicotínico.

47. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo as seguintes faixas do composto de arginina: 1-100 mM, 5-120 mM, 8-85 mM, 20-90 mM, 30-90 mM, 30-85 mM, 30-60 mM ou 10-40 mM.

48. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo as seguintes faixas do composto de arginina: 1-120 mM, 8-85 mM ou 1-40 mM.

49. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 1 mM a cerca de 120 mM de arginina.

50. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 1 mM a cerca de 100 mM de arginina.

51. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 5 mM a cerca de 120 mM de arginina.

52. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 20 mM a cerca de 90 mM de arginina.

53. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 30 mM a cerca de 85 mM de arginina.

54. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 8 mM a cerca de 85 mM de arginina.

55. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 30 mM a cerca de 60 mM de arginina.

56. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 10 mM a cerca de 40 mM de arginina.

57. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo de cerca de 1 mM a cerca de 40 mM de arginina.

58. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde arginina está presente em uma faixa selecionada dentre as seguintes: 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM,

6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM ou 40 mM, 45 mM, 50 mM, 55 mM ou 60 mM.

59. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 1 mM de arginina.

60. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 2 mM de arginina.

61. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 3 mM de arginina.

62. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 4 mM de arginina.

63. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 5 mM de arginina.

64. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 6 mM de arginina.

65. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 7 mM de arginina.

66. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 8 mM de arginina.

67. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 9 mM de arginina.

68. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma

das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 10 mM de arginina.

69. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 15 mM de arginina.

70. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 20 mM de arginina.

71. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 25 mM de arginina.

72. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 30 mM de arginina.

73. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 35 mM de arginina.

74. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 40 mM de arginina.

75. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 45 mM de arginina.

76. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 50 mM de arginina.

77. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 55 mM de arginina.

78. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma

das modalidades precedentes, compreendendo cerca de 60 mM de arginina.

79. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, compreendendo ainda ácido glutâmico.

80. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 79, onde ácido glutâmico está presente em uma faixa selecionada dentre as seguintes: : 1-100 mM, 20-90 mM, 30-90 mM, 30-85 mM ou 30-50 mM.

81. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 79, compreendendo de cerca de 1 mM a cerca de 100 mM de ácido glutâmico.

82. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 79, compreendendo de cerca de 20 mM a cerca de 90 mM de ácido glutâmico.

83. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 79, compreendendo de cerca de 30 mM a cerca de 85 mM de ácido glutâmico.

84. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 79, compreendendo de cerca de 30 mM a cerca de 50 mM de ácido glutâmico.

85. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 79, compreendendo cerca de 30 mM ou 50 mM de ácido glutâmico.

86. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 79, compreendendo cerca de 30 mM de ácido glutâmico.

87. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 79, compreendendo cerca de 50 mM de ácido glutâmico.

88. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, que compreende ainda um íon metálico, agentes preservativos, agentes de isotonicidade e estabilizantes, detergentes e tampões.

89. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 88, onde o referido tampão é Tris.

90. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 89, compreendendo de cerca de 2 mM a cerca de 50 mM de Tris.

91. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 89, compreendendo de cerca de 10 mM a cerca de 40 mM de Tris.

92. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 89, compreendendo de cerca de 20 mM a cerca de 30 mM de Tris.

93. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 89, compreendendo cerca de 10 mM, 20 mM, 30 mM ou 40 mM de Tris.

94. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 89, compreendendo cerca de 10 mM de Tris.

95. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 89, compreendendo cerca de 20 mM de Tris.

96. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 89, compreendendo cerca de 30 mM de Tris.

97. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 89, compreendendo cerca de 40 mM de Tris.

98. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 89, onde o íon metálico é zinco.

99. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 98, onde menos de cerca de 6 íons de zinco estão presentes por hexâmero do composto de insulina.

100. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 98, onde menos de cerca de 4 íons de zinco estão presentes por hexâmero do composto de insulina.

101. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 98, onde menos de cerca de 3 íons de zinco estão presentes por hexâmero do composto de insulina.

102. A preparação de insulina de acordo com a modalidade

98, onde a proporção molar de zinco:insulina varia de cerca de 2:6 a cerca de 5:6.

103. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 98, onde a proporção molar de zinco:insulina varia de cerca de 2,5:6 a cerca de 4,5:6.

104. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 98, onde a proporção molar de zinco:insulina varia de cerca de 3:6 a cerca de 4:6.

105. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 98, onde a proporção molar de zinco:insulina é de cerca de 2:6.

106. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 98, onde a proporção molar de zinco:insulina é de cerca de 2,5:6.

107. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 98, onde a proporção molar de zinco:insulina é de cerca de 3:6.

108. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 98, onde a proporção molar de zinco:insulina é de cerca de 3,5:6.

109. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 98, onde a proporção molar de zinco:insulina é de cerca de 4:6.

110. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 98, onde a proporção molar de zinco:insulina é de cerca de 4,5:6.

111. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 98, onde a proporção molar de zinco:insulina é de cerca de 5:6.

112. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 88, onde o estabilizante é um detergente não iônico.

113. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 112, onde o detergente é polissorbato 20 (Tween 20) ou polissorbato 80 (Tween 80).

114. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 112, onde o detergente é polissorbato 20 (Tween 20).

115. A preparação de insulina de acordo com a modalidade

112, onde o detergente é polissorbato 80 (Tween 80).

116. A preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades 112-115, compreendendo de cerca de 5 a 100 ppm, de cerca de 10 a cerca de 50 ppm ou de cerca de 10 a cerca de 20 ppm de polissorbato.

117. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 88, compreendendo ainda um composto fenólico.

118. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 117, onde o referido composto fenólico está presente em uma quantidade de cerca de 0 a cerca de 6 mg/mL ou de cerca de 0 a cerca de 4 mg/mL.

119. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 88, compreendendo ainda m-cresol.

120. A preparação de insulina de acordo com a modalidade 119, onde m-cresol está presente em uma quantidade de cerca de 0,5 a cerca de 4,0 mg/mL ou de cerca de 0,6 a cerca de 4,0 mg/mL.

121. Uma preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o pH varia de neutro a fracamente básico.

122. Uma preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o pH varia de cerca de 7,0 a cerca de 8,0.

123. Uma preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o pH é cerca de 7,0.

124. Uma preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o pH é cerca de 7,1.

125. Uma preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o pH é cerca de 7,2.

126. Uma preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o pH é cerca de 7,3.

127. Uma preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o pH é cerca de 7,4.

128. Uma preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o pH é cerca de 7,5.

129. Uma preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o pH é cerca de 7,6.

130. Uma preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o pH é cerca de 7,7.

131. Uma preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o pH é cerca de 7,8.

132. Uma preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o pH é cerca de 7,9.

133. Uma preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, onde o pH é cerca de 8,0.

134. Método para redução do nível de glicose sanguínea em mamíferos por administração a um paciente com necessidade de tal tratamento de uma dose terapeuticamente ativa de uma preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes.

135. Método para o tratamento de diabetes mellitus em um indivíduo compreendendo administrar ao indivíduo uma preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes.

136. Método de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, para administração parenteral.

137. Uma preparação de insulina de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, para uso no tratamento ou na prevenção de hiperglicemia incluindo hiperglicemia induzida por estresse, diabetes tipo 2, tolerância prejudicada à glicose, diabetes tipo 1, e queimaduras, incisões cirúrgicas e outras doenças ou lesões nas quais um efeito anabólico se faz necessário no tratamento, infarto do miocárdio, derrame, doença cardíaca coronariana e outros distúrbios

cardiovasculares e tratamento de pacientes diabéticos e não diabéticos doentes em estado crítico.

[00085] A invenção é ainda ilustrada pelos exemplos que se seguem que não devem ser interpretados como limitativos da mesma.

[00086] Todas as referências, incluindo publicações, pedidos de patente, e patentes, citadas neste relatório estão aqui incorporadas em sua integridade a título de referência e na mesma medida em que cada uma dessas referências estivesse individualmente e especificamente indicada como incorporada a título de referência e estão relatadas em sua integridade (na extensão máxima permitida por lei).

[00087] Todos os títulos e subtítulos neste relatório são usados a título de conveniência apenas e não devem ser interpretados como limitativos da mesma de forma alguma.

[00088] O uso de todo e qualquer exemplo, ou linguagem exemplificativa (por exemplo, "tal como") dado neste relatório destina-se a esclarecer melhor a invenção e não representa qualquer limitação ao escopo da invenção exceto onde reivindicado em contrário. Nenhuma linguagem neste relatório deve ser interpretada como indicativa de qualquer elemento não reivindicado como essencial para a prática da invenção.

[00089] A citação e incorporação de documentos de patentes neste relatório é feita apenas a título de conveniência e não reflete qualquer panorama da validade, patenteabilidade, e/ou viabilidade de tais documentos de patente.

[00090] Esta invenção inclui todas as modificações e equivalentes da matéria relacionada nas reivindicações apenas da forma permitida por lei.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Preparação de preparações farmacêuticas

[00091] As preparações farmacêuticas da presente invenção podem ser formuladas como uma solução aquosa. O meio aquoso é tornado isotônico, por exemplo, com cloreto de sódio ou glicerol. Além disso, o meio aquoso pode conter íons de zinco, por exemplo adicionados como acetato de zinco ou cloreto de zinco, tampões e preservativos. Arginina pode ser adicionada como Arg, HCl. O valor do pH da preparação é ajustado no valor desejado e pode variar entre cerca de 3 e cerca de 8,5, entre cerca de 3 e cerca de 5 ou cerca de 6,5 e cerca de 7,5 dependendo do ponto isoelétrico, pI, da insulina em questão.

Tabela 1. Composição de preparações de insulina de acordo com esta invenção

	Insulina aspart (mM)	Zn (mM)	Fenol (mM)	m-cresol (mM)	NaCl (mM)	Fosfato (mM)	Tris (mM)	Glicerol (%w/v)	Arginina, HCl (mM)	Nicotinamida (mM)	Ácido glutâmico (mM)	pH
A*	0,6	0,3	16	16	10	7		1,6				7,4
B	0,6	0,3	16	16	2	7				130		7,4
C	0,6	0,3	16	16	2	7			50	80	50	7,4
D	0,6	0,3	16	16	2		7			130		7,4
E	0,6	0,3	16	16	2		7		50	80	50	7,4
F	0,6	0,3	16	16	20	7			30	80	30	7,4
G	0,6	0,3	16	16	20		7		30	80	30	7,4
H	1,2	0,6	16	16	20	7			30	80	30	7,4
I	1,2	0,6	16	16	20		7		30	80	30	7,4
J	0,6	0,3	16	16	10		7	1,3		80		7,4
K	0,6	0,3	16	16	10		7	0,77	30	80		7,4
L	0,6	0,3	16	16	10		7	0,24	30	80	30	7,4
M	0,6	0,3	16	16	10		7		60	100		7,4
N	0,6	0,3	16	16	10		7	1,13		100		7,4

* NovoRapid® comercialmente disponível

Tabela 2. Composição de outras preparações de insulina de acordo com esta invenção

Preparação n°	[Insulina aspart] mM	[Zn ²⁺] mM	[fenol] mM	[Arg] mM	[Gly] mM	[Glu] mM	[His] mM	[Nicotin amida] mM
1	0,6	0,3	32					260
2	0,6	0,3	32	10				260
3	0,6	0,3	32	20				260
4	0,6	0,3	32	30				260
5	0,6	0,3	32	40				260
6	0,6	0,3	32	50				260
7	0,6	0,3	32		50			260
8	0,6	0,3	32			50		260
9	0,6	0,3	32				50	260

Exemplo 2

Análise da estabilidade química da insulina

Cromatografia por exclusão de tamanho

[00092] A determinação quantitativa da proteína de alto peso molecular e (HMWP) da insulina aspart monomérica foi efetuada em insulina Waters (300 x 7,8mm, peça n° wat 201549) com um eluente contendo 2,5M de ácido acético, 4 mM de L-arginina e 20%(v/v) de acetonitrila a uma taxa de fluxo de 1 mL/min e 40°C. A detecção foi feita em um detector de absorvência ajustável (Waters 486) a 276 nm. O volume de injeção foi 40 µl e uma insulina humana 600 µM padrão. A HMWP e a concentração das preparações foram medidas em cada ponto de amostragem.

Cromatografia de fase reversa (UPLC)

[00093] A determinação das impurezas relacionadas com a insulina aspart foi feita em sistema de UPLC usando uma coluna BEH RP C8

2,1 x 100 mm, tamanho de partícula de 1,7 µm, peça Waters n° 186002878 com uma taxa de fluxo de 0,5mL/min., a 40°C detecção a 20 nm. A eluição foi efetuada com uma fase móvel consistindo no seguinte:

A. 10% (p/v) de acetonitrila, 2,8% (p/p) de sulfato de sódio, 0,3% (p/p) ácido o-fosfórico, pH 3,5.

B. 70% (p/v) de acetonitrila. Gradiente: 0-11 min isocrático com 73%/27% de A/B, 11-12 alteração linear para 52%/48% A/B, 13-15 min. alteração linear para 73%/27% de A/B, 15-20 min. gradiente isocrático a 73%/27% de A/B.

[00094] A quantidade de B28iso-aspartato, desamido e outras impurezas relacionadas foi determinada como área de absorvência medida em percentagem da área de absorvência total determinada depois da eluição dos preservativos. O método de RP-UPLC é equivalente ao método analítico usado para controle de qualidade dos fármacos de insulina aspart comercializados pela Novo Nordisk.

[00095] A adição de arginina reduz a quantidade de produtos de degradação formados, especialmente as formas HMWP e desamido, se a concentração de arginina for aumentada na faixa de 10 a 50 mM degradação é ainda mais reduzida. A estabilidade física medida no tempo de latência no ensaio de ThT é reduzida com a adição de arginina e fica cada vez mais reduzida quando a concentração de arginina é aumentada. O desempenho global de 50 mM de arginina é superior a 50 mM de glicina, 50 mM de ácido glutâmico, ou 50 mM de histidina no que diz respeito à redução da formação de produtos de degradação, como mostrado na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3. Dados da estabilidade física e química para as preparações de insulina 1-9 da Tabela 2 (Exemplo 1).

Preparação n°	Estabilidade física, tempo de latência (min) no ensaio com ThT	Estabilidade química			
		Teor de produto de degradação (%) medido como a diferença entre o teor depois de incubação por duas semanas a 37°C e a 4°C			
		B28 IsoAsp	formas des-amido	Outras impurezas relacionadas	HMW P
1	160	1,17	3,67	1,73	1,36
2	80	1,30	3,05	0,82	0,65
3	80	1,30	2,49	0,64	0,34
4	60	1,31	2,26	0,79	0,20
5	60	1,27	2,27	0,37	0,19
6	40	1,36	1,99	0,47	0,16
7	100	1,26	4,72	2,21	1,11
8	50	1,39	3,41	1,07	0,70
9	0	1,75	6,99	2,22	1,01

Exemplo 3

Estudos farmacocinéticos (PK)/ farmacodinâmicos (PD) no modelo de porco LYD e ensaio de análise do plasma

Estudos PK/PD em porcos LYD

[00096] Os estudos de PK/PD foram realizados em porcos domésticos fêmeas, híbridos LYD, pesando entre 55 e 110kg. Os porcos foram cateterizados na veia jugular através de uma veia da orelha pelo menos 2 dias antes do estudo. A última refeição antes do início do estudo foi servida aos animais aproximadamente 18 horas antes da injeção da preparação de teste, e os animais tiveram livre acesso à água durante todo o tempo do período de jejum e do período de teste.

[00097] No tempo 0 hora a preparação de teste foi dada por via subcutânea na parte lateral do pescoço. Uma amostra de sangue foi coletada antes da medicação e em intervalos de tempo regulares após a medicação amostras eram coletadas do cateter e colocadas em tubos

de vidro de 1,5 mL pré-revestidos com heparina. As amostras de sangue foram mantidas em água gelada até a separação do plasma por centrifugação por 10 min, 3000 rpm a 4°C, o que foi feito nos 30 primeiros minutos. As amostras de plasma foram armazenadas a 4°C por um curto período de tempo (2-3 horas) ou a -18°C para armazenamento prolongado e foram analisadas quanto ao teor de glicose em YSI ou Konelab 30i e quanto a concentração de insulina Aspart por LOCI.

Imunoensaio de canalização de oxigênio luminescente (LOCI) para quantificação da insulina aspart

[00098] O LOCI para insulina aspart é um imunoensaio em sanduíche baseado em anticorpo monoclonal e aplica a proximidade de duas contas, as contas aceptoras revestidas com európio e as contar doadoras revestidas com estreptavidina. As contas aceptoras foram revestidas com um anticorpo específico contra insulina humana e reconhecem a insulina aspart nas amostras de plasma. Um segundo anticorpo biotilado se liga especificamente à insulina aspart e junto com as contas revestidas com estreptavidina, eles formam o sanduíche. Iluminação do imunocomplexo contas-agregado libera oxigênio singleto das contas doadoras que se canaliza nas contas aceptoras e desencadeia quimioluminescência. A quimioluminescência foi medida e a quantidade de luz gerada é proporcional à concentração de insulina aspart.

[00099] Comparada com o produto comercializado NovoRapid®, a taxa inicial de redução da glicose plasmática é mais rápida para as preparações da presente invenção (Figuras 3 e 4). Da mesma forma, quando comparada com o NovoRapid®, a taxa de absorção inicial do componente insulina das preparações da presente invenção, é acentuadamente mais rápida (Figura 5).

Exemplo 4

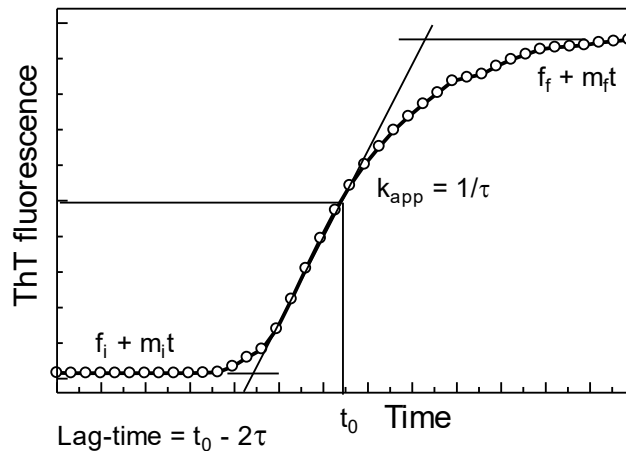
Introdução geral a ensaios de fibrilação com ThT para avaliação da estabilidade física das formulações de proteínas

[000100] A baixa estabilidade física de um peptídeo pode levar à formação de fibrilas amiloides, que é observada como estruturas macromoleculares bem ordenadas semelhantes a fios na amostra, eventualmente resultando na formação de gel. Estas são tradicionalmente medidas por inspeção visual da amostra. No entanto, esse tipo de medição é muito subjetivo e depende do observador. Portanto, a aplicação de uma sonda indicadora de molécula pequena é muito mais vantajosa. A tioflavina T (ThT) é uma sonda desse tipo e tem uma assinatura de fluorescência distinta quando se liga a fibrilas [Naiki et al. (1989) *Anal. Biochem.* **177**, 244-249; LeVine (1999) *Methods. Enzymol.* **309**, 274-284].

[000101] O tempo em curso para a formação de fibrilas pode ser descrito por uma curva sigmoide com a seguinte expressão [Nielsen et al. (2001) *Biochemistry* **40**, 6036-6046]:

$$F = f_i + m_i t + \frac{f_f + m_f t}{1 + e^{-[(t-t_0)/\tau]}} \quad \text{Eq.(1)}$$

[000102] Aqui, F é a fluorescência de ThT no tempo t. A constante t₀ é o tempo necessário para atingir 50% da fluorescência máxima. Os dois parâmetros importantes que descrevem a formação de fibrilas são o tempo de latência calculado por t₀ – 2τ e a constante da taxa aparente k_{app} = 1/τ.



[000103] A formação de um intermediário parcialmente dobrado do peptídeo é sugerida como um mecanismo iniciador geral para fibrilação. Poucos desses intermediários nucleiam para formar um gabarito no qual outros intermediários podem se reunir e a fibrilação continua. O tempo de latência corresponde ao intervalo no qual a massa de núcleo crítica se acumula e a constante da taxa aparente é a taxa à qual a fibrila se forma.

Preparação de Amostras

[000104] Novas amostras eram preparadas antes de cada ensaio. A composição de cada amostra está descrita em cada um dos exemplos. O pH da amostra foi ajustado no valor desejado usando-se quantidades apropriadas de NaOH concentrado e HClO₄ ou HCl. Tioflavina T foi adicionada às amostras de uma solução de estoque em H₂O até atingir uma concentração final de 1 μ M.

[000105] Alíquotas de 200 μ l de amostra foram colocadas em uma placa de microtitulação de 96 compartimento (Packard OptiPlate™-96, poliestireno branco). De modo geral, quatro ou oito réplicas de cada amostra (correspondendo a uma condição de teste) foram colocadas em uma coluna de compartimentos. A placa foi vedada com Scotch Pad (Qiagen).

Incubação e Medição da Fluorescência

[000106] Incubação à temperatura dada, agitação e medição da emissão da fluorescência de ThT foram feitas em uma leitura de placa de fluorescência Fluoroskan Ascent FL ou em uma leitura de placa de fluorescência Varioskan (Thermo LabSystems). A temperatura foi ajustada em 37 °C. A agitação orbital foi ajustada em 960 rpm com uma amplitude de 1 mm em todos os dados apresentados. A medição da fluorescência foi feita usando-se excitação através de um filtro de 444 nm e a medição da emissão através de um filtro de 485 nm.

[000107] Cada operação foi iniciada com incubação da placa à temperatura de ensaio por 10 minutos. A placa foi medida a cada 20 minutos durante o período de tempo desejado. Entre uma medição e outra, a placa foi agitada e aquecida da maneira descrita.

Manipulação dos Dados

[000108] Os pontos de medição foram arquivados no formato Microsoft Excel para processamento posterior e o desenho e ajuste da curva foi efetuado usando o software GraphPad Prism. A emissão de fundo de ThT na ausência de fibrilas foi desprezível. Os valores dos dados são tipicamente uma média de quatro ou oito amostras e estão mostrados com barras de erro padrão. Somente os dados obtidos na mesma experiência (isto é, amostras na mesma placa) estão apresentados no mesmo gráfico garantindo uma medida relativa da fibrilação entre as experiências.

[000109] O conjunto de dados pode ser introduzido na Eq. (1). No entanto, como nem sempre é possível curvas totalmente sigmóides durante o tempo de medição, os tempos de latência aqui foram determinados visualmente a partir da curva de fluorescência da ThT no tempo em que a fluorescência da ThT é diferente do nível de fundo.

Medição das Concentrações Inicial e Final

[000110] A concentração de peptídeo em cada uma das formulações testadas foi medida tanto antes da aplicação no ensaio de fibrilação com

ThT ("inicial") como depois de terminada a fibrilação com ThT ("depois do ensaio com ThT"). As concentrações foram determinados por métodos de HPLC reversa usando um padrão de pramLintide como referência. Antes da medição após o término da fibrilação 150 µl foram coletados de cada uma das réplicas e transferidos para um tubo Eppendorf. Estes foram centrifugados a 30000 G por 40 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados através de um filtro de 0,22 µm antes de serem aplicados ao sistema de HPLC.

REIVINDICAÇÕES

1. Preparação de insulina, caracterizada pelo fato de que compreende:

um composto de insulina, em que o referido composto nicotínico é nicotinamida e/ou sais da mesma, um composto nicotínico, e arginina.

2. Preparação de insulina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o referido composto de insulina é insulina de ação rápida.

3. Preparação de insulina, de acordo com precedentes reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o composto de insulina é insulina humana ou um análogo de insulina.

4. Preparação de insulina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o composto de insulina é insulina humana B28Asp, ou insulina humana B28LysB29Pro, ou insulina humana B3LysB29Glu.

5. Preparação de insulina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o composto de insulina está presente em uma quantidade de 0,2 mM a 2,0 mM.

6. Preparação de insulina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o composto de insulina está presente em uma quantidade de 0,3 mM a 1,2 mM.

7. Preparação de insulina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende de 5 mM a 200 mM de composto nicotínico.

8. Preparação de insulina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende de 80 mM a 200 mM de composto nicotínico.

9. Preparação de insulina, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizada pelo fato de que compreende de 20mM a 90mM de arginina.

10. Preparação de insulina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende de 10 mM a 40 mM de arginina.

11. Preparação de insulina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende 20 mM de arginina.

12. Preparação de insulina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende:

de 20 mM de arginina, e

80 mM a 200 mM de composto nicotínico.

13. Preparação de insulina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento ou na prevenção de diabetes mellitus, hiperglicemia, hiperglicemia induzida por estresse, diabetes tipo 2, tolerância prejudicada à glicose, diabetes tipo 1, queimaduras, incisões cirúrgicas, infarto do miocárdio, derrame, doença cardíaca coronariana e distúrbios cardiovasculares.

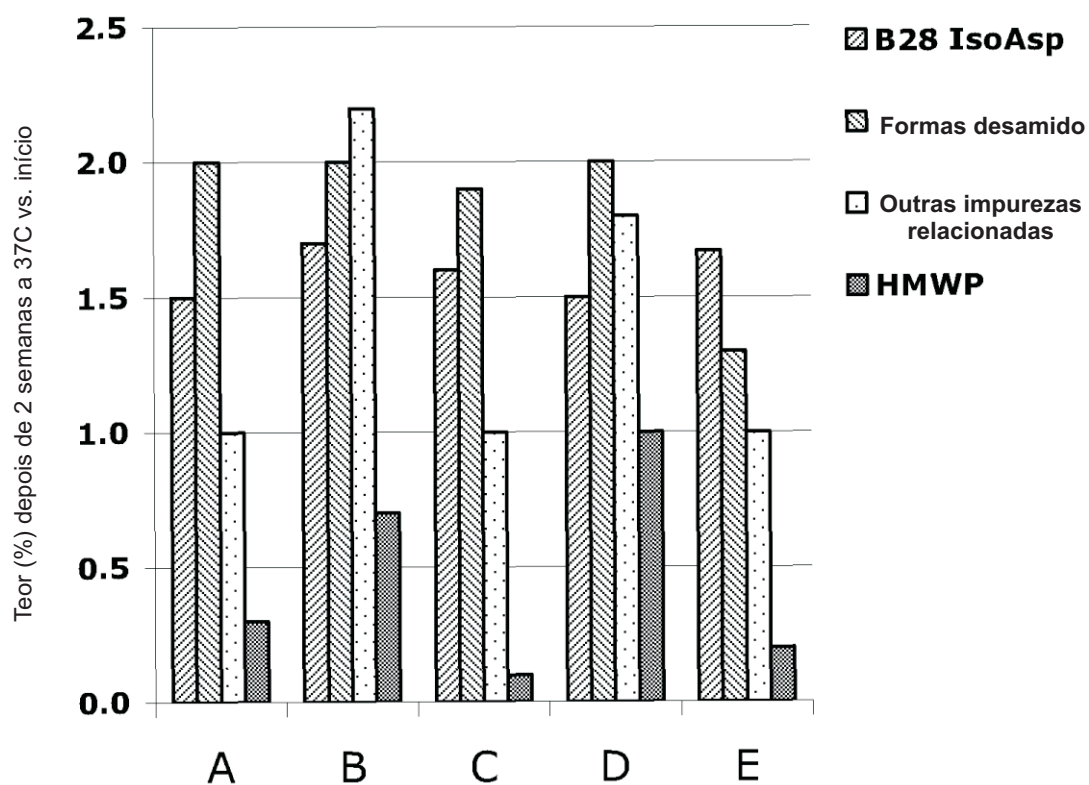


Fig. 1/5

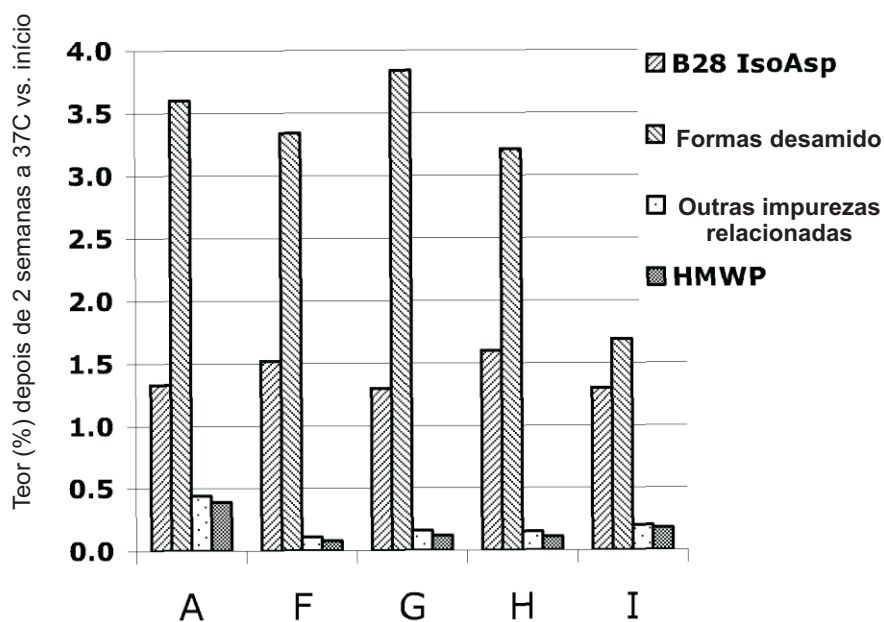


Fig. 2/5

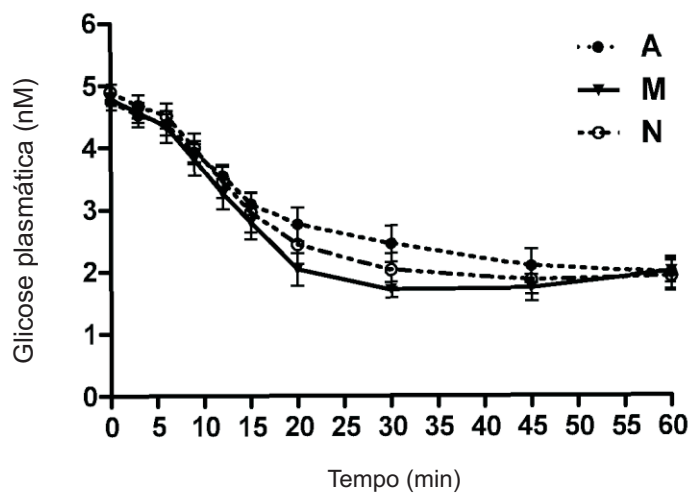
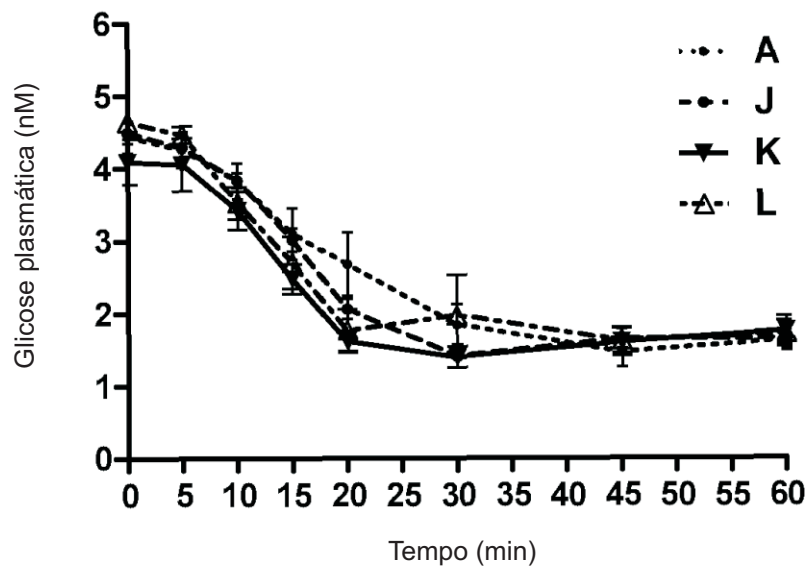
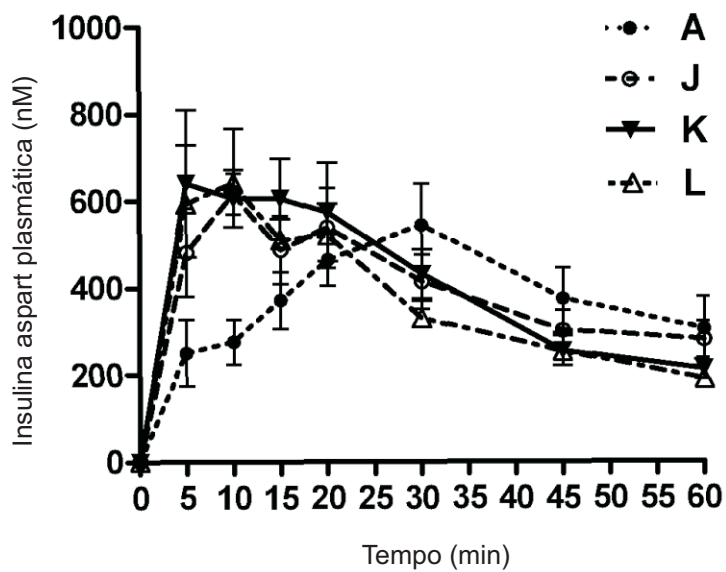


Fig. 3/5

**Fig. 4/5****Fig. 5/5**