



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2340033 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/455 (2006.01)
A61K 31/465 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.02.24
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.10.09
(86)	Europeisk søknadsnr	10730134.3
(86)	Europeisk innleveringsdag	2010.06.25
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.07.06
(30)	Prioritet	2009.06.26, EP, 09163940 2009.07.01, US, 222168 P
(84)	Utpekte stater	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
(73)	Innehaver	Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, DK-Danmark
(72)	Oppfinner	OLSEN, Helle, Birk, Novo Nordisk A/SNovo Allé, DK-2880 Bagsværd, DK-Danmark HAVE Lund, Svend, Novo Nordisk A/SNovo Allé, DK-Bagsværd 2880, DK-Danmark RIBEL, Ulla, Novo Nordisk A/SNovo Allé, DK-Bagsværd 2880, DK-Danmark STURIS, Jeppe, Novo Nordisk A/SNovo Allé, DK-2880 Bagsværd, DK-Danmark NAVER, Helle, Novo Nordisk A/SNovo Allé, DK-2880 Bagsværd, DK-Danmark SCHLEIN, Morten, Novo Nordisk A/SNovo Allé, DK-2880 Bagsværd, DK-Danmark LUDVIGSEN, Svend, Novo Nordisk A/SNovo Allé, DK-2880 Bagsværd, DK-Danmark
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 1813 Vika, 0123 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Preparat omfattende insulin, nikotinamid og arginin
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A- 1 283 051 WO-A-2009/021955 WO-A-91/09617 WO-A-96/10417

Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse vedrører farmasøytiske preparater som omfatter en insulinforbindelse, en nikotinforbindelse, arginin og fosfatbuffer.

5 Bakgrunn for oppfinnelsen

Diabetes mellitus er en metabolsk forstyrrelse der evnen til å benytte glukose er delvis eller fullstendig gått tapt. Omtrent 5 % av alle mennesker lider av diabetes og forstyrrelsen når epidemiske proporsjoner.

10 Siden introduksjonen av insulin på 1920-tallet har kontinuerlige forbedringer blitt gjort i behandlingen av diabetes. For å hjelpe til å unngå høye blodsukkernivåer praktiserer diabetespasienter ofte multippel injeksjonsterapi, hvorved insulin blir administrert sammen med hvert måltid. Siden diabetespasienter har blitt behandlet med insulin i flere årtier er det et stort behov for trygge og livskvalitetsforbedrende insulinpreparater. Blant de kommersielt tilgjengelige insulinpreparatene kan raskt
15 virkende, midlere virkende og forlenget virkende preparater bli nevnt.

I behandlingen av diabetes mellitus har mange ulike typer farmasøytiske preparater med insulin blitt foreslått og benyttet, slik som vanlig insulin (slik som Actrapid®), isofan-insulin (betegnet NPH), insulin-sink-suspensjoner (slik som Semilente® og Ul-tralente) og bifase-isofan-insulin (slik som NovoMix®). Humane insulinanaloger
20 og derivater har også blitt utviklet, som er designet for spesifikke virkningsprofiler, dvs., rask virkning eller forlenget virkning. Noen av de kommersielt tilgjengelige insulinpreparatene som omfatter slike raskt virkende insulinanaloger inkluderer NovoRapid® (preparat av humant B28Asp-insulin), Humalog® (preparat av humant B28LysB29Pro-insulin) og Apidra® (preparat av humant B3LysB29Glu-insulin).

25 WO 91/09617 og WO 96/10417 (Novo Nordisk A/S) tilkjenner gir insulinpreparater inneholdende nikotinamid eller nikotinsyre eller et salt derav.

Oftest blir farmasøytiske preparater av insuliner administrert subkutant ved injeksjon. Viktig for pasienten er virkningsprofilen til insulinet, noe som betyr virkningen av insulin på glukosemetabolisme som en funksjon av tid fra injeksjon. I
30 denne profilen er blant annet tiden for virkningsstart, den maksimale verdien og den totale varigheten av virkningen viktig. I tilfellet med bolus-insuliner er en mengde insulinpreparater med ulike virkningsprofiler ønskelige og etterspurt av pasientene. Én pasient kan samme dag benytte insulinpreparater med svært forskjellige virkningsprofiler. Den ønskede virkningsprofilen er for eksempel avhengig av tiden
35 på døgnet og mengden og sammensetningen av måltidet som er inntatt av pasienten.

Like viktig for pasienten er den kjemiske stabiliteten til insulinpreparatene, for eksempel grunnet den omfattende anvendelsen av pennliknende injeksjonsinnretninger slik som innretninger som inneholder Penfill®-patroner, der

et insulinpreparat er lagret inntil hele patronen er tom, noe som kan være minst 1 til 2 uker for innretninger som inneholder patroner med 1,5-3,0 ml. Under lagring forekommer kovalente kjemiske endringer i insulinstrukturen. Dette kan føre til dannelse av molekyler som kan være mindre aktive og/eller potensielt immunogene slik som deamideringsprodukter og transformasjonsprodukter med høyere molekylvekt (dimerer, polymerer). Også viktig er videre den fysiske stabiliteten til insulinpreparatene fordi langtidslagring til slutt kan føre til dannelse av uløselige fibriller, som er biologisk inaktive og potensielt immunogene.

10 Oppsummering av oppfinnelsen

Oppfinnelsen vedrører insulinpreparater med fordelaktig absorpsjonsrate og fordelaktig kjemisk og fysisk aktivitet. Foreliggende oppfinnelse vedrører insulinpreparater som omfatter humant insulin og/eller analoger derav, nikotinamid eller nikotinsyre og/eller salter derav, arginin og en fosfatbuffer.

15 I én utførelsesform vedrører foreliggende oppfinnelse et insulinpreparat som omfatter:

- en insulinforbindelse,
- en nikotinforbindelse,
- arginin, og
- 20 - fosfatbuffer.

I en annen utførelsesform kan insulinpreparatet ytterligere omfatte glutaminsyre.

I en annen utførelsesform gjelder foreliggende oppfinnelse også preparatet i anvendelse for behandling av diabetes mellitus i et individ eller til reduksjon av glukosenivået i blod hos et individ som omfatter administrering av et insulinpreparat ifølge oppfinnelsen til et individ eller pattedyr.

Beskrivelse av tegningene

Figur 1 viser utviklingen i prosentandel av totalt insulininnhold i nedbrytningsprodukter i løpet av lagring i 2 uker ved 37 °C av preparater ifølge foreliggende oppfinnelse. Bokstaven A refererer til en NovoRapid®-referanse og de andre bokstavene tilsvarer insulin-aspart-preparater som beskrevet i tabell 1 i eksempel 1. Sammenlignet med NovoRapid®-preparatet (preparat A) fører tilsetning av nikotinamid (preparat B og D) til en økt dannelse av nedbrytningsprodukter, mens den kombinerte tilsetningen av nikotinamid, glutaminsyre og arginin (preparat C og E) har et for det meste liknende nedbrytningsmønster, med lavere dannelse av HMWP.

Figur 2 viser utviklingen av prosentandel av totalt insulininnhold i nedbrytningsprodukter i løpet av lagring i 2 uker ved 37 °C av preparater ifølge denne oppfinnelsen. Bokstaven A refererer til en NovoRapid®-referanse og de andre bokstavene tilsvarende insulin-aspart-preparater som beskrevet i tabell 1 i eksempel 1. Den kombinerte virkningen av nikotinamid, glutaminsyre og arginin, preparatene F, G, H, og I, som er forskjellige i buffersystem, fosfat- eller trisbuffer, og konsentrasjonen av insulin og Zn, 0,6 mM og 0,3 mM eller 1,2 mM og 0,6 mM, har et nedbrytningsmønster som likner det for NovoRapid®-preparatet, preparat A.

Figur 3 glukosekonsentrasjonen (snitt +/- SEM, N=8) i plasma etter subkutan injeksjon av griser med en dose på 1 nmol/kg ved 0 minutter av preparater ifølge denne oppfinnelsen. Bokstaven A refererer til en NovoRapid®-referanse og de andre bokstavene tilsvarende insulin-aspart-preparater som beskrevet i tabell 1 i eksempel 1. Sammenlignet med NovoRapid®-preparatet (preparat A) er den initiale raten for plasmaglukosesenkning raskere for preparatet som er tilsatt nikotinamid (preparat N) og enda raskere for en kombinasjon av nikotinamid og arginin (preparat M).

Figur 4 viser glukosekonsentrasjonen i plasma (snitt +/- SEM, N=7) etter subkutan injeksjon i griser med en dose på 1 nmol/kg ved 0 minutter av preparater ifølge denne oppfinnelsen. Bokstaven A refererer til en NovoRapid®-referanse og de andre bokstavene tilsvarende insulin-aspart-preparater som beskrevet i tabell 1 i eksempel 1. Sammenlignet med NovoRapid®-preparatet (preparat A) er den initiale raten for plasmaglukosesenkning raskere for et preparat med en kombinasjon av nikotinamid, arginin og glutaminsyre (preparat L) og for et preparat med en kombinasjon av nikotinamid og arginin (preparat K).

Figur 5 viser insulin-aspart-konsentrasjonen i plasma (snitt +/- SEM, N=7) etter subkutan injeksjon av griser med en dose på 1 nmol/kg ved 0 minutter med preparater ifølge denne oppfinnelsen. Bokstaven A refererer til NovoRapid®-referanse og de andre bokstavene tilsvarende insulin-aspart-preparater som beskrevet i tabell 1 i eksempel 1. Sammenlignet med NovoRapid®-preparatet (preparat A) er den initiale absorpsjonsraten til insulinkomponenten i preparatet med nikotinamid (preparat J), kombinasjonen av nikotinamid og arginin (preparat K) og kombinasjonen av nikotinamid, arginin og glutaminsyre (preparat L) markert raskere.

35 **Beskrivelse av oppfinnelsen**

Absorpsjonen etter subkutan injeksjon av insulinforbindelsen i insulinpreparatene ifølge foreliggende oppfinnelse ble overraskende funnet å være raskere enn den for referanseinsulinpreparatene. Denne egenskapen er nyttig for raskt virkende insuliner, spesielt i sammenheng med et flerinjeksjonsregime der insulin blir gitt før

hvert måltid. Med raskere virkningsstart kan insulinet hensiktsmessig bli tatt tettere opp mot måltidet enn med konvensjonelle raskt virkende insulinløsninger. Videre minsker en raskere forsvinning av insulin sannsynligvis risikoen for hypoglykemi.

- Insulinpreparatene ifølge foreliggende oppfinnelse er raskt virkende
- 5 insulinpreparater som omfatter en insulinforbindelse slik som insulin aspart, en nikotinforbindelse, slik som nikotinamid, aminosyren arginin og fosfatbuffer. Eventuelt kan insulinpreparatene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatte ytterligere aminosyrer slik som glutaminsyre. Disse insulinpreparatene har en rask absorpsjonsprofil som hermer normal fysiologi mer nøyaktig enn eksisterende
- 10 terapier. Videre har insulinpreparatene ifølge foreliggende oppfinnelse kjemisk og fysisk stabilitet som er hensiktsmessig for kommersielle farmasøytiske preparater.
- Insulinpreparatene ifølge foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en enda raskere virkningsstart sammenlignet med eksisterende insulinterapier. Slike ultra-raske insulinpreparater har fordelene av å gjenopprette førstefase insulinfrigjøring,
- 15 injeksjonshensiktsmessighet og stenger av hepatisk glukoseproduksjon. Insulinpreparatene ifølge foreliggende oppfinnelse har en fordelaktig absorpsjonsrate fra subcutis inn i plasma med en økning av initial absorpsjonsrate fra 1,5 til 5 ganger sammenlignet med konvensjonelle preparater slik som NovoRapid®, som antydnet ved flere PK/PD eksperimenter på griser. Den raskere
- 20 absorpsjonsraten kan forbedre glykemisk kontroll og hensiktsmessighet og kan tillate en forskyvning fra dosering før måltider til etter måltider. Foreliggende oppfinnelse er delvis basert på den overraskende oppdagelsen av at selv om tilsetningen av nikotinamid muliggjør økningen i absorpsjonsrate så har dette også en negativ effekt på kjemisk stabilitet ved signifikant å øke mengden HMWP.
- 25 Insulinpreparatene ifølge foreliggende oppfinnelse har en forbedret kjemisk stabilitet ved tilsetning av arginin, noe som for eksempel gjenspeiles i en reduksjon i dannelsen av dimere og polymerer og desamido-insuliner etter lagring. Insulinpreparatene ifølge foreliggende oppfinnelse kan videre også ha forbedret fysisk stabilitet, noe som kan være nyttig ved anvendelse i pumper.
- 30 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et insulinpreparat som omfatter en insulinforbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse som er til stede i en konsentrasjon fra omtrent 0,1 mM til omtrent 10,0 mM, og der nevnte preparat har en pH fra 3 til 8,5. Preparatet omfatter også en nikotinforbindelse, arginin og fosfatbuffer. Preparatet kan ytterligere omfatte proteaseinhibitor(er), metallioner, et
- 35 buffersystem, conserveringsmidler, tonisitettsmidler, chelaterende midler, stabilisatorer og surfaktanter.

I én utførelsesform omfatter insulinpreparatene et humant insulin, en analog eller kombinasjoner derav, nikotinamid og/eller nikotinsyre og/eller salter derav og arginin og/eller salter derav og fosfatbuffer.

I én utførelsesform omfatter insulinpreparatene ifølge foreliggende oppfinnelse en vandig løsning av humant B28Asp-insulin, nikotinamid, arginin og fosfatbuffer.

Innholdet av humant B28Asp-insulin i løsningene i denne oppfinnelsen kan ligge i området på 15 til 500 internasjonale enheter (IU)/ml, fortrinnsvis i området 50 til 333 IU/ml, i preparater for injeksjon. For andre formål med parenteral administrering kan likevel innholdet av insulinforbindelse være høyere.

Det blir her også beskrevet et insulinpreparat som omfatter en insulinforbindelse, en nikotinforbindelse, glutaminsyre, arginin og fosfatbuffer.

I foreliggende kontekst tilsvarer enheten «IU» 6 nmol.

Uttrykket «insulin aspart» refererer til human insulinanalog B28Asp humant insulin. Uttrykket «virkningsstart» refererer til tiden fra injeksjon til PK kurven skifter til en økning.

Uttrykket «absorpsjonsrate» refererer til stigningstallet på PK-kurven.

En «insulinforbindelse» ifølge oppfinnelsen skal her forstås å være humant insulin, en insulinanalog og/eller enhver kombinasjon derav.

Uttrykket «humant insulin» betyr slik det benyttes her det humane hormonet hvis struktur og egenskaper er velkjente. Humant insulin har to polypeptidkjeder som er koblet sammen med disulfidbroer mellom cysteinrester, nemlig A-kjeden og B-kjeden. A-kjeden er peptid på 21 aminosyrer og B-kjeden er et peptid på 30 aminosyrer, der de to kjedene er koblet sammen med tre disulfidbroer: én mellom cysteinene i posisjon 6 og 11 på A-kjeden, den andre mellom cysteinet i posisjon 7 på A-kjeden og cysteinet i posisjon 7 på B-kjeden, og den tredje mellom cysteinet i posisjon 20 på A-kjeden og cysteinet i posisjon 19 i B-kjeden.

Hormonet blir syntetisert som et enkeltkjedet forløper proinsulin (preproinsulin) som består av et propeptid på 24 aminosyrer etterfulgt av proinsulin inneholdende 86 aminosyrer i konfigurasjonen: propeptid-B-Arg-Arg-C-Lys-Arg-A, der C er et koblingspeptid på 31 aminosyrer. Arg-Arg og Lys-Arg er kløyvingssteder for kløyving av koblingspeptidet fra A- og B-kjeden.

Med «insulinanalog» som benyttet her er det ment et polypeptid som er avledet fra primærstrukturen for naturlig forekommende insulin, for eksempel den for humant insulin, ved mutasjon. Én eller flere mutasjoner blir innført ved å fjerne og/eller substituere minst én aminosyrerest som forekommer i det naturlig forekommende insulinet og/eller ved å addere minst én aminosyrerest. De adderte og/eller substituerte aminosyrerestene kan enten være kodebare aminosyrerester eller andre naturlige forekommende aminosyrerester.

I én utførelsesform omfatter en insulinanalog mindre enn 8 modifiseringer (substitusjoner, delesjoner, addisjoner og enhver kombinasjon derav) relativt i forhold til opphavs-insulinet, alternativt færre enn 7 modifiseringer relativt

opphavs-insulinet, alternativt færre enn 6 modifiseringer relativt opphavs-insulinet, alternativt færre enn 5 modifiseringer relativt opphavs-insulinet, alternativt færre enn 4 modifiseringer relativt opphavs-insulinet, alternativt færre enn 3 modifiseringer relativt opphavs-insulinet, alternativt færre enn 2 modifiseringer relativt opphavs-insulinet.

Mutasjoner i insulinmolekylet blir betegnet ved å vise til kjeden (A eller B), posisjonen og koden på tre bokstaver for aminosyren som substituerer den native aminosyren. Med «desB30» eller «B(1-29)» er det ment en naturlig insulin-B-kjede eller analog derav som mangler B30-aminosyreresten, og med humant B28Asp-insulin er det ment humant insulin der aminosyreresten i posisjon 28 på B-kjeden har blitt substituert med Asp.

Eksempler på insulinanaloger er slike der Pro i posisjon 28 på B-kjeden er mutert med Asp, Lys, Leu, Val eller Ala og/eller Lys i posisjon B29 er mutert med Pro, Glu eller Asp. Videre kan Asn i posisjon B3 være substituert med Thr, Lys, Gln, Glu eller Asp. Aminosyreresten i posisjon A21 kan være mutert med Gly. Aminosyren i posisjon B1 kan være mutert med Glu. Aminosyren i posisjon B16 kan være mutert med Glu eller His. Ytterligere eksempler på insulinanaloger er delesjonsanalogene, for eksempel analoger der B30-aminosyren i humant insulin har blitt fjernet (humant des(B30)-insulin), insulinanaloger der B1-aminosyren i humant insulin har blitt fjernet (humant des(B1)-insulin), humant des(B28-B30)-insulin og humant des(B27)-insulin. Insulinanaloger der A-kjeden og/eller B-kjeden har en N-terminal forlengning og insulinanaloger der A-kjeden og/eller B-kjeden har en C-terminal forlengning slik som to argininrester addert på C-terminalen av B-kjeden er også eksempler på insulinanaloger. Ytterligere eksempler er insulinanaloger som omfatter kombinasjoner av de nevnte mutasjonene. Insulinanaloger der aminosyren i posisjon A14 er Asn, Gln, Glu, Arg, Asp, Gly eller His, aminosyren i posisjon B25 er His og som eventuelt ytterligere omfatter én eller flere ytterligere mutasjoner er ytterligere eksempler på insulinanaloger. Insulinanaloger av humant insulin der aminosyreresten i posisjon A21 er Gly og der insulinanalogen er ytterligere forlenget på C-terminalen med to argininrester er også eksempler på insulinanaloger.

Ytterligere eksempler på insulinanaloger inkluderer, men er ikke begrenset til: Humant desB30-insulin, humant AspB28-insulin, humant AspB28,desB30-insulin, humant LysB3GluB29-insulin, humant LysB28,ProB29-insulin, humant GlyA21,ArgB31,ArgB32-insulin, humant GluA14,HisB25-insulin, humant HisA14,HisB25-insulin, humant GluA14,HisB25,desB30-insulin, humant HisA14,HisB25,desB30-insulin, humant GluA14,HisB25,desB27,desB28,desB29,desB30-insulin, humant GluA14,HisB25,GluB27,desB30-insulin, humant GluA14,HisB16,HisB25,desB30-insulin, humant HisA14,HisB16,HisB25,desB30-insulin, humant HisA8,GluA14,HisB25,GluB27,desB30-insulin, humant

HisA8,GluA14,GluB1,GluB16,HisB25,GluB27,desB30-insulin og humant HisA8,GluA14,GluB16,HisB25,desB30-insulin.

Uttrykket «nikotinforbindelse» inkluderer nikotinamid, nikotinsyre, niacin, niacinamid og vitamin B3 og/eller salter derav og/eller enhver kombinasjon derav.

- 5 Ifølge foreliggende oppfinnelse ligger konsentrasjonen av nikotinforbindelsen og/eller salter derav i området fra omtrent 1 mM til omtrent 300 mM eller fra omtrent 5 mM til omtrent 200 mM.

Uttrykket «arginin» eller «Arg» inkluderer aminosyren arginin og/eller et salt derav.

I én utførelsesform omfatter insulinpreparatet 1 til 100 mM arginin.

- 10 I én utførelsesform omfatter insulinpreparatet 1 til 20 mM arginin.

I én utførelsesform omfatter insulinpreparatet 20 til 90 mM arginin.

I én utførelsesform omfatter insulinpreparatet 30 til 85 mM arginin.

Uttrykket «glutaminsyre» eller «Glu» inkluderer aminosyren glutaminsyre og/eller et salt derav.

- 15 I én utførelsesform omfatter insulinpreparatet 1 til 100 mM glutaminsyre.

I én utførelsesform omfatter insulinpreparatet 20 til 90 mM glutaminsyre.

I én utførelsesform omfatter insulinpreparatet 30 til 85 mM glutaminsyre.

- 20 Uttrykket «farmasøytisk preparat» eller «insulinpreparat» betyr slik de benyttes her et produkt som omfatter en insulinforbindelse, dvs., et humant insulin, en analog derav og/eller kombinasjoner derav og en nikotinforbindelse og en aminosyre, eventuelt sammen med andre eksipienser slik som conserveringsmidler, chelaterende midler, tonisitettsmodifiserende midler, fyllmidler, stabilisatorer, antioksidanter, polymerer og surfaktanter, metallioner, oljeholdige vehikler og proteiner (for eksempel humant serumalbumin, gelatin eller proteiner), der nevnte insulinpreparat
- 25 er nyttig i behandling, forebygging eller reduksjon av alvorlighet av en sykdom eller forstyrrelse ved administrering av nevnte insulinpreparat til en person. Slik er et insulinpreparat også kjent på fagområdet som et farmasøytisk preparat eller farmasøytisk sammensetning.

- 30 Bufferen kan være valgt fra gruppen som består av, men som ikke er begrenset til, natriumacetat, natriumkarbonat, citrat, natriumdihydrogenfosfat, dinatriumhydrogenfosfat, natriumfosfat og tris(hydroksymetyl)-aminometan, bicin, tricin, eplesyre, suksinat, maleinsyre, fumarsyre, vinsyre, asparaginsyre eller blandinger derav. Hver av disse spesifikke bufferne utgjør en alternativ utførelsesform av oppfinnelsen.

- 35 Insulinpreparatet ifølge foreliggende oppfinnelse kan ytterligere omfatte andre ingredienser som er felles for insulinpreparater, for eksempel sinkkompleksmidler slik som citrat.

Glyserol og/eller mannitol og/eller natriumklorid kan være til stede i en mengde tilsvarende en konsentrasjon på 0 til 250 mM, 0 til 200 mM eller 0 til 100 mM.

Stabilisatorer, surfaktanter og konserveringsmidler kan også foreligge i insulinpreparatene ifølge denne oppfinnelsen.

- 5 Insulinpreparatene ifølge foreliggende oppfinnelse kan ytterligere omfatte et farmasøytisk akseptabelt konserveringsmiddel. Konserveringsmiddelet kan foreligge i en mengde som er tilstrekkelig til å oppnå en konserverende effekt. Mengden av konserveringsmiddel i et insulinpreparat kan bli bestemt fra for eksempel litteraturen på fagområdet og/eller de kjente mengdene av konserveringsmidler i for eksempel
- 10 kommersielle produkter. Hvert av disse spesifikke konserveringsmidlene utgjør en alternativ utførelsesform av oppfinnelsen. Anvendelsen av et konserveringsmiddel i farmasøytiske preparater er for eksempel beskrevet i Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19. utgave, 1995.

- 15 Konserveringsmiddelet som foreligger i insulinpreparatet ifølge denne oppfinnelsen kan være som i de opp til nå kjente, konvensjonelle insulinpreparatene, for eksempel fenol, m-cresol og metylparaben.

- Insulinpreparatet ifølge foreliggende oppfinnelse kan ytterligere omfatte et chelaterende middel. Anvendelsen av et chelaterende middel i farmasøytiske preparater er velkjent for fagfolk på området. Av hensiktsmessige grunner refereres det til Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19. utgave, 1995.
- 20

- Insulinpreparatet ifølge foreliggende oppfinnelse kan ytterligere omfatte en stabilisator. Uttrykket «stabilisator» refererer slik det benyttes her til kjemikalier tilsatt polypeptidinnholdende farmasøytiske preparater for å stabilisere peptidet, dvs., øke hyllelagringstiden og/eller anvendelsestiden av slike preparater på
- 25 brukerstedet. Av hensiktsmessige grunner refereres det til Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19. utgave, 1995.

- Insulinpreparatet ifølge foreliggende oppfinnelse kan ytterligere omfatte en surfaktant. Uttrykket «surfaktant» refererer slik det benyttes her til ethvert molekyl eller ion som er omfattet av en vannløselig (hydrofil) del, hodet, og et fettløselig (lipofilt) segment. Surfaktanter akkumuleres fortrinnsvis på grenseflater, der den hydrofile delen er orientert mot vannet (hydrofil fase) og den lipofile delen mot oljefasen eller den hydrofobe fasen (dvs., glass, luft, olje, osv.). Konsentrasjonen ved hvilken surfaktanter begynner å danne miceller er kjent som den kritiske micellekonsentrasjonen eller CMC. Videre senker surfaktanter overflatespenningen
- 30 i en væske. Surfaktanter er også kjent som amfipatiske forbindelser. Uttrykket «detergent» er et synonym som benyttes på surfaktanter generelt. Anvendelsen av en surfaktant i farmasøytiske preparater er velkjent for fagfolk på området. Av hensiktsmessige grunner refereres det til Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19. utgave, 1995.
- 35

I en ytterligere utførelsesform vedrører oppfinnelsen et insulinpreparat som omfatter en vandig løsning av en insulinforbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse, og en fosfatbuffer, der nevnte insulinforbindelse foreligger i en konsentrasjon fra 0,1 mM eller høyere, og der nevnte preparat har en pH fra omtrent 3,0 til omtrent 8,5 ved romtemperatur (~25 °C).

Foreliggende oppfinnelse vedrører også fremgangsmåter for fremstilling av insulinpreparater ifølge oppfinnelsen.

I én utførelsesform omfatter fremgangsmåten for fremstilling av insulinpreparater ifølge oppfinnelsen:

- 10 a) klargjøre en løsning ved å løse opp insulinforbindelsen eller en blanding av insulinforbindelser i vann eller buffer,
- b) klargjøre en løsning ved å løse opp et divalent metallion i vann eller buffer,
- 15 c) klargjøre en løsning ved å løse opp et conserveringsmiddel i vann eller buffer,
- d) klargjøre en løsning ved å løse opp et isotonisitetsmiddel i vann eller buffer,
- e) klargjøre en løsning ved å løse opp en surfaktant og/eller en stabilisator i vann eller buffer,
- 20 f) blande løsning a) med én eller flere av løsningene b), c), d) og e), og til slutt justere pH i blandingen f) til den ønskede pH etterfulgt av sterilfiltrering.

Insulinpreparatet ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli benyttet i behandlingen av diabetes ved parenteral administrering. Det er anbefalt at doseringen av insulinpreparatene ifølge denne oppfinnelsen som skal administreres til pasienten blir valgt av en lege.

Parenteral administrering kan bli utført ved subkutan, intramuskulær, intraperitoneal eller intravenøs injeksjon ved hjelp av en sprøyte, eventuelt en pennliknende sprøyte. Alternativt kan parenteral administrering bli utført ved hjelp av en infusjonspumpe. Som en ytterligere mulighet kan insulinpreparatene inneholdende insulinforbindelsen ifølge oppfinnelsen også bli tilpasset transdermal administrering, for eksempel ved nålfri injeksjon fra et plaster, eventuelt et iontoforetisk plaster, eller transmukosal, for eksempel buccal administrering.

Insulinpreparater ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli administrert til en pasient med behov for slik behandling på flere steder, for eksempel på topiske steder, for eksempel steder på hud eller slimhinner, på steder som omgår absorpsjon, for eksempel administrering i en arterie, i en vene, i hjertet og på steder som involverer

absorpsjon, for eksempel administrering på huden, under huden, i en muskel eller i buken.

I én utførelsesform av oppfinnelsen er insulinpreparatet et vandig preparat, dvs., preparat som omfatter vann. Et slikt preparat er typisk en løsning eller en
5 suspensjon. I en ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er insulinpreparatet en vandig løsning.

Uttrykket «vandig preparat» er definert som et preparat som omfatter minst 50 % vekt/vekt vann. Likeledes er uttrykket «vandig løsning» definert som en løsning som omfatter minst 50 % vekt/vekt vann, og uttrykket «vandig suspensjon» er
10 definert som en suspensjon omfattende minst 50 % vekt/vekt vann.

Vandige suspensjoner kan inneholde de aktive forbindelsene i blanding med eksipienser som er passende for fremstillingen av vandige suspensjoner.

I én utførelsesform er insulinpreparatene ifølge denne oppfinnelsen veltilpasset for anvendelse i pennliknende innretninger som benyttes til insulinterapi ved injeksjon.

15 I én utførelsesform kan insulinpreparatene ifølge foreliggende oppfinnelse bli benyttet i pumper for administrering av insulin.

Uttrykket «fysisk stabilitet» av insulinpreparatet slik det benyttes her refererer til proteinets tendens til å danne biologisk inaktive og/eller uløselige aggregater av proteinet som et resultat av eksponering av proteinet overfor termo-mekanisk stress
20 og/eller interaksjon med grenseflater og overflater som er destabiliserende, slik som hydrofobe overflater og grenseflater. Fysisk stabilitet for de vandige proteinpreparatene blir evaluert ved hjelp av visuell inspeksjon og/eller turbiditetsmålinger etter eksponering av preparatet som er fylt i passende beholdere (for eksempel patroner eller rør) overfor mekanisk/fysisk belastning (for eksempel
25 risting) ved ulike temperaturer i ulike tidsperioder. Visuell inspeksjon av preparatene blir utført i et skarpt fokusert lys med en mørk bakgrunn. Turbiditeten i preparatet blir karakterisert ved en visuell skåringsrangering av graden av turbiditet på for eksempel en skala fra 0 til 3 (et preparat som ikke viser noen turbiditet tilsvarende en visuell skåringsverdi på 0, og et preparat som viser visuell turbiditet i
30 dagslys tilsvarende visuell skåringsverdi 3). Et preparat blir klassifisert som fysisk ustabilt med hensyn på proteinaggregering når det viser visuell turbiditet i dagslys. Alternativt kan turbiditeten i preparatet bli evaluert ved enkle turbiditetsmålinger som er velkjente for fagfolk på området. Fysisk stabilitet for vandige proteinpreparater kan også bli evaluert ved å benytte et spektroskopisk middel eller
35 probe for den konformasjonelle statusen til proteinet. Proben er fortrinnsvis et lite molekyl som fortrinnsvis binder til en ikke-nativ konformer av proteinet. Ett eksempel på en liten, molekylær, spektroskopisk probe for proteinstruktur er Thioflavin T. Thioflavin T er et fluorescerende fargestoff som har blitt benyttet mye til påvisningen av amyloide fibriller. I nærværet av fibriller, og kanskje andre

proteinkonfigurasjoner også, så gir Thioflavin T opphav til et nytt eksitasjonsmaksimum ved omtrent 450 nm og forsterket emisjon ved omtrent 482 nm når det er bundet til en fibrill-proteinform. Ikke-bundet Thioflavin T er så å si ikke-fluorescerende ved bølgelengdene.

- 5 Uttrykket «kjemisk stabilitet» for proteinpreparatet refererer slik det benyttes her til endringer i den kovalente proteinstrukturen som fører til dannelse av kjemiske nedbrytningsprodukter med potensielt lavere biologisk styrke og/eller potensielt økte immunogene egenskaper sammenlignet med den native proteinstrukturen. Ulike kjemiske nedbrytningsprodukter kan bli dannet avhengig av typen og
- 10 egenskapene til det native proteinet og miljøet som proteinet er eksponert overfor. Økende mengder kjemiske nedbrytningsprodukter blir ofte sett under lagring og anvendelse av proteinpreparatet. Det fleste proteiner er utsatt for deamidering, som er en prosess der sidekjedeamidgruppen på glutaminy- eller asparaginyrester blir hydrolysert for å danne en fri karboksylsyre eller asparaginyrester for å danne et
- 15 IsoAsp-derivat. Andre nedbrytningsveier involverer dannelse av produkter med høy molekylvekt der to eller flere proteinmolekyler er kovalent bundet til hverandre via transamidering og/eller disulfidinteraksjoner som fører til dannelse av kovalent bundne dimer-, oligomer- og polymernedbrytningsprodukter (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern, T.J. & Manning M.C., Plenum Press, New York 1992).
- 20 Oksidasjon (av for eksempel metioninrester) kan bli nevnt som en annen variant av kjemisk nedbrytning. Den kjemiske stabiliteten til proteinpreparatet kan bli evaluert ved å måle mengden av de kjemiske nedbrytningsproduktene på ulike tidspunkter etter eksponering overfor ulike miljømessige betingelser (dannelsen av nedbrytningsprodukter kan ofte bli akselerert ved for eksempel økning av
- 25 temperaturen). Mengden av hvert individuelle nedbrytningsprodukt blir ofte bestemt ved separasjon av nedbrytningsproduktene avhengig av molekylstørrelse og/eller ladning ved å benytte ulike kromatografiteknikker (for eksempel SEC-HPLC og/eller RP-HPLC). Fordi HMWP-produkter er potensielt immunogene og ikke biologisk aktive er lave nivåer av HMWP fordelaktig.
- 30 Uttrykket «stabilisert preparat» refererer til et preparat med økt fysisk stabilitet, økt kjemisk stabilitet eller økt fysisk og kjemisk stabilitet. Generelt må et preparat være stabilt under bruk og lagring (i overensstemmelse med anbefalte anvendelses- og lagringsbetingelser) inntil utløpsdatoen nås.
- 35 Uttrykket «diabetes» eller «diabetes mellitus» inkluderer type 1 diabetes, type 2 diabetes, svangerskapsdiabetes (under graviditet) og andre tilstander som forårsaker hyperglykemi. Uttrykket blir benyttet på en metabolsk forstyrrelse der pankreas produserer utilstrekkelige mengder insulin, eller der cellene i kroppen mangler evnen til å respondere hensiktsmessig på insulin og som slik forhindrer cellene fra å absorbere glukose. Som et resultat øker innholdet av glukose i blodet.

Type 1 diabetes, som også blir kalt insulinavhengig diabetes mellitus (IDDM), er forårsaket av ødeleggelse av B-celler, noe som vanligvis fører til absolutt insulinmangel.

5 Type 2 diabetes, som også er kjent som ikke-insulinavhengig diabetes mellitus (NIDDM), er assosiert med fremherskende insulinresistens og slik relativ insulinmangel og/eller en fremherskende insulinutskillende defekt med insulinresistens.

10 Uttrykket «farmasøytisk akseptabel» betyr slik det blir benyttet her passende for normale farmasøytiske applikasjoner, dvs., som ikke gir opphav til noen alvorlige, skadelige hendelser hos pasienter.

15 Uttrykket «behandling av en sykdom» betyr slik det benyttes her håndteringen og pleien av en pasient som har utviklet sykdommen, tilstanden eller forstyrrelsen og inkluderer behandling, forebygging eller lindring av sykdommen. Formålet med behandling er å bekjempe sykdommen, tilstanden eller forstyrrelsen. Behandling
15 inkluderer administreringen av de aktive forbindelsene for å eliminere eller kontrollere sykdommen, tilstanden eller forstyrrelsen i tillegg til å lindre symptomene eller komplikasjonene som er assosiert med sykdommen, tilstanden eller forstyrrelsen, og forebygging av sykdommen, tilstanden eller forstyrrelsen.

20 I en annen utførelsesform blir en insulinanalog ifølge oppfinnelsen benyttet som et medikament for å forsinke eller forebygge sykdomsprogresjon ved type 2 diabetes.

I én utførelsesform av foreliggende oppfinnelse er insulinpreparatet ifølge oppfinnelsen til anvendelse som et medikament for behandlingen eller forebyggingen av hyperglykemi, inkludert stressindusert hyperglykemi, type 2 diabetes, forstyrret glukosetoleranse, type 1 diabetes, og brannså, operasjonssår og
25 andre sykdommer eller skader der en anabol effekt er nødvendig i behandlingen, hjerteinfarkt, slag, koronar hjertesykdom og andre kardiovaskulære forstyrrelser.

I en ytterligere utførelsesform av foreliggende oppfinnelse er insulinpreparatet til anvendelse i behandlingen eller forebyggingen av hyperglykemi, inkludert stressindusert hyperglykemi, type 2 diabetes, forstyrret glukosetoleranse, type 1
30 diabetes, og brannså, operasjonssår og andre sykdommer eller skader der en anabol effekt er nødvendig i behandlingen, hjerteinfarkt, koronar hjertesykdom og andre kardiovaskulære forstyrrelser, slag, der anvendelsen omfatter administrering til en pasient med behov for slik behandling av en effektiv mengde for slik behandling av et insulinpreparat ifølge oppfinnelsen.

35 Behandlingen med et insulinpreparat ifølge oppfinnelsen kan også bli kombinert med et andre eller mer farmakologisk aktivt stoff, for eksempel valgt fra antidiabetiske midler, antifedmemidler, appetittregulerende midler, antihypertensjonsmidler, midler for behandlingen og/eller forebyggingen av komplikasjoner som skyldes eller er assosiert med diabetes og midler for

behandlingen og/eller forebyggingen av komplikasjoner og forstyrrelser som skyldes eller er assosiert med fedme.

Behandlingen med et insulinpreparat ifølge foreliggende oppfinnelse kan også bli kombinert med overvektbehandlende kirurgi – som er en kirurgi som påvirker
 5 glukosenivåene og/eller lipidhomeostasen slik som magesekkreduksjon eller magesekk-bypass.

Produksjonen av polypeptider, for eksempel insuliner, er velkjent på fagområdet. En insulinanalog ifølge oppfinnelsen kan for eksempel bli produsert ved klassisk
 10 peptidsyntese, for eksempel fastfase-peptidsyntese ved å benytte t-Boc- eller Fmoc-kjemi eller andre veletablerte teknikker, se for eksempel Greene and Wuts, «Protective Groups in Organic Synthesis», John Wiley & Sons, 1999.

Insulinanalogen kan også bli produsert med en fremgangsmåte som omfatter dyrking av en vertscelle inneholdende en DNA-sekvens som koder for analogen og som er i stand til å uttrykke insulinanalogen i et passende næringsmiddelmedium
 15 ved betingelser som muliggjør uttrykkingen av insulinanalogen. For insulinanaloger som omfatter ikke-naturlige aminosyrerester bør den rekombinante cellen bli modifisert slik at de ikke-naturlige aminosyrene blir inkorporert i analogen, for eksempel ved anvendelse av tRNA-mutanter. Dermed blir kort fortalt insulinanalogene ifølge oppfinnelsen fremstilt analogt med fremstillingen av kjente
 20 insulinanaloger.

Flere fremgangsmåter kan bli benyttet til fremstillingen av humant insulin og humane insulinanaloger. For eksempel blir tre hovedfremgangsmåter som blir benyttet i fremstillingen av insulin i mikroorganismer tilkjennegjort i WO
 25 2008034881. To av disse involverer *Escherichia coli*, med enten uttrykkingen av et stort fusjonsprotein i cytoplasma (Frank et al., (1981) i *Peptides: Proceedings of the 7th American Peptide Chemistry Symposium* (Rich & Gross eds.) Pierce Chemical Co., Rockford, Ill, s.729-739) eller anvendelsen av et signalpeptid for å muliggjøre utskilling i det periplasmatiske rommet (Chan et al. (1981) *PNAS* 78:5401-5404). En tredje fremgangsmåte benytter *Saccharomyces cerevisiae* for å skille ut en
 30 insulinforløper inn i mediet (Thim et al. (1986) *PNAS* 83:6766-6770). Den kjente teknikken tilkjennegir et antall insulinforløpere som blir uttrykt i enten *E.coli* eller *Saccharomyces cerevisiae*, vide US 5,962,267, WO 95/16708, EP 0055945, EP 0163529, EP 0347845 og EP 0741188.

Insulinanalogene blir fremstilt ved uttrykking av en DNA-sekvens som koder for
 35 insulinanalogen det er snakk om i en passende vertscelle ved velkjent teknikk som tilkjennegjort i for eksempel US 6500645. Insulinanalogen blir enten uttrykt direkte eller som et forløpermolekyl som har en N-terminal forlengning på B-kjeden eller en C-terminal forlengning på B-kjeden. Den N-terminale forlengningen kan være på opp til 15 aminosyrerester lang. Den N-terminale forlengningen skal bli kløyvd av
 40 in vitro etter isolering fra kulturmediet og vil derfor ha et kløyvingssete inntil B1.

N-terminale forlengninger av typen som er hensiktsmessig i foreliggende oppfinnelse er tilkjennegjort i US 5,395, 922 og EP 765,395. Den C-terminale forlengningen kan ha funksjonen av å beskytte det modne insulin- eller insulinanalogmolekylet mot intracellulær proteolytisk prosessering ved vertscelle-eksoproteaser. Den C-terminale forlengningen skal bli kløyd av enten ekstracellulært i kulturmediet ved utskilte, aktive karboksypeptidaser eller in vitro etter isolering fra kulturmediet. En fremgangsmåte for produksjon av modent insulin og insulinanaloger med C-terminale forlengninger på B-kjeden som blir fjernet med karboksypeptidase er tilkjennegjort i WO 08037735. Det ønskede insulinproduktet av prosessen kan enten være et humant tokjedet insulin eller en human tokjedet insulinanalog som kan ha, men som ikke behøver å ha, en kort C-terminal forlengning av B-kjeden. Dersom det ønskede insulinproduktet ikke har noen C-terminal forlengning av B-kjeden så bør nevnte C-terminale forlengning være i stand til deretter å bli kløyd av B-kjeden før ytterligere rensetrinn.

Foreliggende oppfinnelse kontemplerer også den følgende ikke-begrensende listen av utførelsesformer, som er ytterligere beskrevet andre steder heri:

1. Insulinpreparat, omfattende:

- en insulinforbindelse,
- en nikotinforbindelse
- arginin og
- en fosfatbuffer.

2. Insulinpreparat ifølge utførelsesform 1, der insulinforbindelsen er humant insulin eller en insulinanalog.

3. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen er humant B28Asp-insulin.

4. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen er humant B28LysB29Pro-insulin.

5. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen er humant B3LysB29Glu-insulin.

6. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i et område som er valgt fra det følgende: 0,1-10,0mM, 0,1-3,0mM, 0,1-2,5mM, 0,1-2,0mM, 0,1-1,5mM, 0,2-2,5mM, 0,2-2,0mM, 0,2-1,5mM, 0,3-3,0mM, 0,3-2,5mM, 0,3-2,0mM, 0,3-1,5mM, 0,5-1,3mM og 0,6-1,2mM.

7. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden fra omtrent 0,1mM til omtrent 10,0mM.

8. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden fra omtrent 0,1mM til omtrent 3,0mM.
9. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden fra omtrent 0,1mM til omtrent 2,5mM.
- 5 10. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden fra omtrent 0,1mM til omtrent 2,0mM.
11. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden fra omtrent 0,1mM til omtrent 1,5mM.
- 10 12. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden fra omtrent 0,2mM til omtrent 2,5mM.
13. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden fra omtrent 0,2mM til omtrent 2,0mM.
14. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden fra omtrent 0,2mM til omtrent 1,5mM.
- 15 15. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden fra omtrent 0,3mM til omtrent 3,0mM.
16. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden fra omtrent 0,3mM til omtrent 2,5mM.
- 20 17. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden fra omtrent 0,3mM til omtrent 2,0mM.
18. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden fra omtrent 0,3mM til omtrent 1,5mM.
19. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden fra omtrent 0,5mM til omtrent 1,3mM.
- 25 20. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden fra omtrent 0,3mM til omtrent 1,2mM.
21. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden fra omtrent 0,6mM til omtrent 1,2mM.
- 30 22. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden fra omtrent 0,6mM til omtrent 1,2mM.
23. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden på omtrent 0,3mM.
24. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden på omtrent 0,6mM.
- 35 25. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der insulinforbindelsen foreligger i mengden på omtrent 1,2mM.

26. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der nikotinforbindelsen er valgt fra gruppen som består av nikotinamid, nikotinsyre, niacin, niacinamid og vitamin B3 og/eller salter derav og/eller enhver kombinasjon derav.
- 5 27. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der nikotinforbindelsen er valgt fra nikotinamid og nikotinsyre og/eller salter derav og/eller enhver kombinasjon derav.
28. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der nikotinforbindelsen foreligger i et område som er valgt fra de følgende: 1-300mM,
10 5-200mM, 40-120mM, 70-140mM eller 80-130mM.
29. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 1mM til omtrent 300mM av nikotinforbindelsen.
30. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 8mM til omtrent 260mM av nikotinforbindelsen.
- 15 31. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 5mM til omtrent 200mM av nikotinforbindelsen.
32. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 1mM til omtrent 150mM av nikotinforbindelsen.
33. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter
20 fra omtrent 5mM til omtrent 20mM av nikotinforbindelsen.
34. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 20mM til omtrent 120mM av nikotinforbindelsen.
35. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 40mM til omtrent 120mM av nikotinforbindelsen.
- 25 36. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 20mM til omtrent 40mM av nikotinforbindelsen.
37. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 60mM til omtrent 800mM av nikotinforbindelsen.
38. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter
30 fra omtrent 70mM til omtrent 140mM av nikotinforbindelsen.
39. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 80mM til omtrent 130mM av nikotinforbindelsen.
40. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 8mM, 30mM, 100mM eller 130mM av nikotinforbindelsen.
- 35 41. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 8mM av nikotinforbindelsen.

42. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 30mM, 100mM eller 130mM av nikotinforbindelsen.
43. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 30mM av nikotinforbindelsen.
- 5 44. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 100mM av nikotinforbindelsen.
45. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 130mM av nikotinforbindelsen.
- 10 46. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 150mM av nikotinforbindelsen.
47. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter de følgende områdene for argininforbindelse: 1-100mM, 5-120mM, 8-85mM, 20-90mM, 30-90mM, 30-85mM, 30-60mM eller 10-40mM.
- 15 48. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter de følgende områdene for argininforbindelse: 1-120mM, 8-85mM eller 1-40mM.
49. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 1mM til omtrent 120mM arginin.
50. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 1mM til omtrent 100mM arginin.
- 20 51. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 5mM til omtrent 120mM arginin.
52. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 20mM til omtrent 90mM arginin.
53. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter 25 fra omtrent 30mM til omtrent 85mM arginin.
54. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 8mM til omtrent 85mM arginin.
55. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 30mM til omtrent 60mM arginin.
- 30 56. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 10mM til omtrent 40mM arginin.
57. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter fra omtrent 1mM til omtrent 40mM arginin.
- 35 58. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der arginin foreligger i et område valgt fra de følgende; 1mM, 2 med mer, 3mM, 4mM, 5mM,

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

59. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 1mM arginin.
- 5 60. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 2mM arginin.
61. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 3mM arginin.
- 10 62. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 4mM arginin.
63. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 5mM arginin.
64. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 6mM arginin.
- 15 65. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 7mM arginin.
66. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 8mM arginin.
- 20 67. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 9mM arginin.
68. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 10mM arginin.
69. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 15mM arginin.
- 25 70. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 20mM arginin.
71. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 25mM arginin.
- 30 72. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 30mM arginin.
73. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 35mM arginin.
74. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 40mM arginin.
- 35 75. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 45mM arginin.

76. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 50mM arginin.
77. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 55mM arginin.
- 5 78. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som omfatter omtrent 60mM arginin.
79. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som ytterligere omfatter glutaminsyre.
- 10 80. Insulinpreparat ifølge utførelsesform 79, der glutaminsyre er til stede i et område som er valgt fra følgende: 1-100mM, 20-90mM, 30-90mM, 30-85mM eller 30-50mM.
81. Insulinpreparat ifølge utførelsesform 79, som omfatter fra omtrent 1mM til omtrent 100mM glutaminsyre.
- 15 82. Insulinpreparat ifølge utførelsesform 79, som omfatter fra omtrent 20mM til omtrent 90mM glutaminsyre.
83. Insulinpreparat ifølge utførelsesform 79, som omfatter fra omtrent 30mM til omtrent 85mM glutaminsyre.
84. Insulinpreparat ifølge utførelsesform 79, som omfatter fra omtrent 30mM til omtrent 50mM glutaminsyre.
- 20 85. Insulinpreparat ifølge utførelsesform 79, som omfatter omtrent 30mM eller omtrent 50mM glutaminsyre.
86. Insulinpreparat ifølge utførelsesform 79, som omfatter omtrent 30mM glutaminsyre.
- 25 87. Insulinpreparat ifølge utførelsesform 79, som omfatter omtrent 50mM glutaminsyre.
88. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, som ytterligere omfatter et metallion, conserveringsmiddel/-midler, isotonsitetsmiddel/-midler og stabilisator(er), detergent(er) og buffer(e).
- 30 89. Insulinpreparat ifølge utførelsesform 88, der stabilisatoren er en ikke-ionisk detergent.
90. Insulinpreparat ifølge utførelsesform 89, der detergenten er polysorbat 20 (Tween 20) eller polysorbat 80 (Tween 80).
91. Insulinpreparat ifølge utførelsesform 89, der detergenten er polysorbat 20 (Tween 20).
- 35 92. Insulinpreparat ifølge utførelsesform 89, der detergenten er polysorbat 80 (Tween 80).

93. Insulinpreparat ifølge enhver av utførelsesformene 89-92, som omfatter fra omtrent 5 til 100 ppm, fra omtrent 10 til omtrent 50 ppm, fra omtrent 10 til omtrent 20 ppm med polysorbat.
- 5 94. Insulinpreparat ifølge utførelsesform 88, som ytterligere omfatter en fenolforbindelse.
95. Insulinpreparat ifølge utførelsesform 94, der nevnte fenolforbindelse er til stede i en mengde fra omtrent 0 til omtrent 6 mg/ml eller fra omtrent 0 til omtrent 4 mg/ml.
96. Insulinpreparat ifølge utførelsesform 88, som ytterligere omfatter m-cresol.
- 10 97. Insulinpreparat ifølge utførelsesform 96, der m-cresol er til stede i en mengde fra omtrent 0,5 til omtrent 4,0 mg/ml eller fra omtrent 0,6 til omtrent 4,0 mg/ml.
98. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der pH er nøytral til svakt basisk.
99. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der pH er fra 15 omtrent 7,0 til omtrent 8,0.
100. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der pH er omtrent 7,0.
101. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der pH er omtrent 7,1.
- 20 102. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der pH er omtrent 7,2.
103. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der pH er omtrent 7,3.
- 25 104. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der pH er omtrent 7,4.
105. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der pH er omtrent 7,5.
106. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der pH er omtrent 7,6.
- 30 107. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der pH er omtrent 7,7.
108. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der pH er omtrent 7,8.
- 35 109. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der pH er omtrent 7,9.

110. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene, der pH er omtrent 8,0.

111. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene til anvendelse i reduksjon av glukosenivået i blod hos pattedyr ved administrering til en pasient med behov for slik behandling av en terapeutisk aktiv dose med et insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene.

112. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene til anvendelse i behandlingen av diabetes mellitus i et individ som omfatter administrering av et insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene til et individ.

113. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene til anvendelse ifølge utførelsesformene 111 eller 112 for parenteral administrering.

114. Insulinpreparat ifølge enhver av de foregående utførelsesformene til anvendelse i behandlingen eller forebyggingen av hyperglykemi inkludert stressindusert hyperglykemi, type 2 diabetes, forstyrret glukosetoleranse, type 1 diabetes, og brannså, operasjonssår og andre sykdommer eller skader der en anabol effekt er nødvendig i behandlingen, hjerteinfarkt, slag, koronar hjertesykdom og andre kardiovaskulære forstyrrelser og behandling av kritisk syke diabetiske og ikke-diabetiske pasienter.

Oppfinnelsen blir ytterligere illustrert ved de følgende eksemplene som ikke er å anse som begrensende.

Eksempler

Eksempel 1

Fremstilling av farmasøytiske preparater

De farmasøytiske preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli formulert som en vandig løsning. Det vandige mediet er isotont, for eksempel med natriumklorid eller glyserol. Videre kan det vandige mediet inneholde sinkioner, for eksempel tilsatt som sinkacetat eller sinkklorid, buffere og conserveringsmidler. Arginin kan bli tilsatt som Arg, HCl. pH-verdien i preparatet blir justert til den ønskede verdien og kan ligge mellom omtrent 3 til omtrent 8,5, mellom omtrent 3 og omtrent 5 eller omtrent 6,5 og omtrent 7,5 avhengig av det isoelektriske punktet, pI, for insulinet det er snakk om.

Tabell 1. Sammensetning av insulinpreparater ifølge denne oppfinnelsen

	Insulin aspart (mM)	Zn (mM)	Fenol (mM)	m-cresol (mM)	NaCl (mM)	Fosfat (mM)	Tris (mM)	Glyserol (%vekt/vol)	Arginin, HCl (mM)	Nikotin- amid (mM)	Glut- amin- syre (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	580	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

5

- Kommersielt tilgjengelig NovoRapid®

Tabell 2. Sammensetning av ytterligere insulinpreparater ifølge denne oppfinnelsen

Preparat nr.	[Insulin aspart] mM	[Zn ²⁺] mM	[fenol] mM	[Arg] mM	[Gly] mM	[Glu] mM	[His] mM	[Nikotinamid] 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

5

Eksempel 2**Analyse av kjemisk stabilitet****Størrelsesekslusjonskromatografi**

- 10 Kvantitativ bestemmelse av protein med høy molekylvekt (HMWP) og monomert insulin aspart ble utført på Waters-insulin (300 x 7,8mm, part nr. wat 201549) med et elueringsmiddel inneholdende 2,5M eddiksyre, 4mM L-arginin og 20 %(v/v) acetonitril ved en strømningsrate på 1 ml/min og 40 °C. Deteksjon ble utført med en innstillbar absorbandsdetektor (Waters 486) ved 276nm. Injeksjonsvolum var 40µl og
- 15 en 600µM standard med humant insulin. HMWP og konsentrasjon i preparatene ble målt på hvert prøvetakingspunkt.

Reversfasekromatografi (UPLC)

- Bestemmelse av insulin aspart relaterte urenheter ble utført på et UPLC-system ved
- 20 å benytte en BEH RP C8 2,1 x 100mm kolonne, partikkelstørrelse på 1,7µm. Waters

part nr. 186002878, med en strømningsrate på 0,5 ml/min ved 40 °C, deteksjon ved 220nm. Eluering ble utført med en mobil fase bestående av følgende:

- A. 10 % (vekt/volum) acetonitril, 2,8 (vekt/vekt) natriumsulfat, 0,3 % (vekt/vekt) o-fosforsyre, pH 3,5.
- 5 B. 70 % (vekt/vol) acetonitril. Gradient: 0-11 min isokratisk med 73 %/27 % med A/B, 11-12 lineær endring til 52 %/48 % A/B, 13-15 min, lineær endring til 73 %/27 % med A/B, 15-20 min isokratisk gradient ved 73 %/27 % A/B.

10 Mengden av B28iso-aspartat, desamido og andre relaterte urenheter ble bestemt som absorbansareal målt i prosent av totalt absorbansareal bestemt etter eluering av preserveringsmidlene. RP-UPLC-fremgangsmåten er ekvivalent med den analytiske fremgangsmåten som benyttes til kvalitetskontroll av Novo Nordisk markedsførte insulin aspart farmasøytiske midler.

15 Tilsetning av arginin reduserer mengden av nedbrytningsprodukter som dannes, spesielt HMWP og des-amidoformer, økning av konsentrasjonen av arginin i området 10 til 50mM fører til ytterligere reduksjon av nedbrytning. Den fysiske stabiliteten målt som forsinkelsestid i ThT-analysen blir redusert ved tilsetning av arginin og blir redusert mer og mer når argininkonsentrasjonen øker. Den totale effekten av 50mM arginin er overlegen i forhold til 50mM glysin, 50mM

20 glutaminsyre eller 50mM histidin når det gjelder reduksjon av dannelsen av nedbrytningsprodukter, som vist i tabell 3 nedenfor.

Tabell 3. Fysiske og kjemiske stabilitetsdata for insulinpreparatene 1-9 i tabell 2 (eksempel 1)

Preparat nr.	Fysisk stabilitet, forsinkelse (min) i ThT-analyse	Kjemisk stabilitet			
		Innhold av nedbrytningsprodukt (%) målt som forskjell mellom innhold etter inkubering i 2 uker ved 37 °C og 4 °C			
		B28 IsoAsp	Des-amido-former	Andre relaterte urenheter	HMWP
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

Eksempel 3

Farmakokinetiske (PK)/Farmakodynamiske (PD) undersøkelser i LYD-grisemodell og plasmaanalyse

5

PK7PD-undersøkelser i grisemodell

PK/PD-undersøkelsene ble utført på tamme hunngriser, LYD-blandingsrase, med vekt mellom 55 og 110 kg. Grisene ble kateterisert i halsvenen gjennom en ørevene minst 2 dager før start av undersøkelsen. Det siste måltidet før start av undersøkelsen ble servert til dyrene omtrent 18 timer før injeksjonen av testpreparatet, og dyrene hadde fri tilgang på vann under hele fasteperioden og testperioden.

På tidspunkt 0 timer ble testpreparat gitt subkuttant på siden av nakken. En blodprøve ble tatt før dosering og ved regulære tidsintervaller etter dosering ble prøver tatt fra kateteret og samlet i 1,5 ml glassrør som var belagt på forhånd med heparin. Blodprøvene ble holdt i isvann inntil separasjon av plasma ved sentrifugering i 10 min, 3000 rpm ved 4 °C, noe som ble utført i løpet av de første 30 minuttene. Plasmaprøver ble lagret ved 4 °C i kort tid (2-3 timer) eller ved -18 °C for langtidslagring og ble analysert for glukose på YSI eller Konelab 30i og for insulin aspart konsentrasjon ved LOCI.

Luminescerende oksygenkanaliseringsimmunanalyse (LOCI) for kvantifisering av Insulin Aspart

Insulin Aspart LOCI er en monoklonalt antistoffbasert sandwich-immunanalyse og benytter nærheten for to bånd, de europium-belagte akseptorkulene og de streptavidinbelagte donorkulene. Akseptorkulene ble belagt med et spesifikt antistoff mot humant insulin og gjenkjenner Insulin Aspart i plasmaprøver. Et annet biotinyllert antistoff binder spesifikt til Insulin Aspart og sammen med de streptavidinbelagte kulene utgjør de sandwichene. Illuminering av kuler-aggregat-immunkomplekset frigjør oksygen fra donorkulene som kanaliseres inn i akseptorkulene og utløser kjemoluminiscens. Kjemoluminiscensen ble målt og mengden av lys generert er proporsjonal med konsentrasjonen av Insulin Aspart.

Sammenlignet med det markedsførte produktet NovoRapi® er den initiale plasmaglukosesenkningsraten raskere for preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse (figur 3 og 4). Sammenlignet med NovoRapid® er den initiale absorpsjonsraten for insulinkomponenten i preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse likeledes markant raskere (figur 5).

Eksempel 4

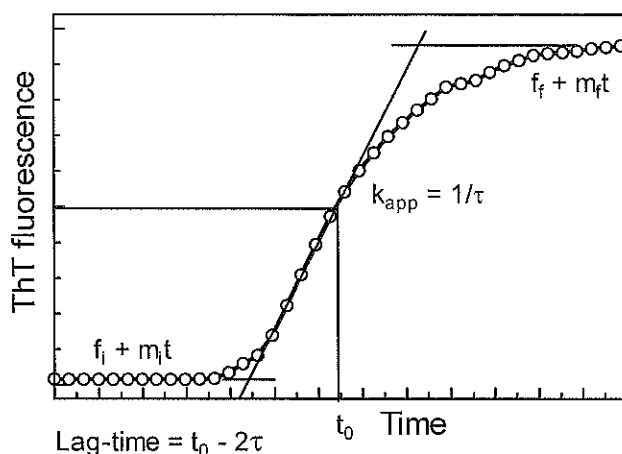
10 Generell introduksjon av ThT-fibrillasjonsanalyse for undersøkelsen av fysisk stabilitet av proteinformuleringer

Lav fysisk stabilitet for et peptid kan føre til amyloid fibrilldannelse, noe som observeres som velordnede, trådliknende makromolekylære strukturer i prøven som til slutt fører til geldannelse. Dette har tradisjonelt blitt målt ved visuell inspeksjon av prøven. Denne typen måling er likevel svært subjektiv og avhengig av observatøren. Derfor er anvendelsen av et lite molekyl som indikatorprobe mer fordelaktig. Thioflavin T (ThT) er en slik probe og har en distinkt fluorescenssignatur når det binder til fibriller [Naiki et al. (1989) Anal. Biochem. 177, 244-249, LeVine (1999) Methods. Enzymol. 309, 274-284]. Tidsforløpet for fibrilldannelse kan bli beskrevet med en sigmoid kurve med det følgende uttrykket [Nielsen et al. (2001) Biochemistry 40, 6036-6046]:

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

Ligning (1)

Her er F ThT-fluorescensen ved tidspunkt t. Konstanten t_0 er tiden det tar å nå 50 % av maksimal fluorescens. De to viktige parameterne som beskriver fibrilldannelse er forsinkelsen beregnet med $t_0 - 2\tau$ og den tilsynelatende ratekonstanten $k_{app} = 1/\tau$.



Dannelse av et delvis foldet intermediat av peptidet er foreslått som en generell igangsettende mekanisme for fibrillering. Få av disse intermediatene går sammen for å danne et templat på hvilket ytterligere intermediater kan samles og fibrilleringen fortsette. Forsinkelsen tilsvarer intervallet i hvilket den kritiske massen for kjerner blir bygget opp og den tilsynelatende ratekonstanten er raten som fibrillen selv dannes ved.

Klargjøring av prøver

Prøver ble klargjort på nytt før hver analyse. Hver prøvesammensetning er beskrevet i hvert eksempel. pH i prøven ble justert til den ønskede verdien ved å benytte passende mengder med konsentrert NaOH og HClO₄ eller HCl. Thioflavin T ble tilsatt prøvene fra en stock-løsning i H₂O til sluttkonsentrasjon på 1 µM.

Prøvevolumer på 200 µl ble plassert i en 96 brønners mikrotiterplate (Packard Opti-Plate™, hvit polystyren). Vanligvis ble fire eller åtte like prøver (tilsvarende én testbetingelse) plassert i én kolonne med brønner. Platen ble forseglet med Scotch Pad (Qiagen).

Inkubering og fluorescensmåling

Inkubering ved gitt temperatur, risting og måling av ThT-fluorescensemisjon ble utført i en Fluoroskan Ascent FL fluorescensplateavleser eller Varioskan-plateavleser (Thermo Labsystems). Temperaturen ble justert til 37 °C. Den orbitale risting ble justert til 960 rpm med en amplitude på 1mm i alle representerte data. Fluorescensmåling ble utført ved å benytte eksitasjon gjennom et filter på 444 nm og måling av emisjon gjennom et filter på 485 nm.

Hver kjøring ble satt i gang ved inkubering av platen ved analysetemperaturen i 10 minutter. Platen ble målt hvert tjuende minutt i en ønsket tidsperiode. Mellom hver måling ble platen ristet og varmet opp som beskrevet.

Datahåndtering

Målepunktene ble lagret i Microsoft Excel-format for videre prosessering og kurvetegning og tilpasning ble utført ved å benytte GraphPad Prism.

- 5 Bakgrunnsemisjonen fra ThT i fravær av fibriller var neglisjerbar. Datapunktene er typisk et gjennomsnitt av fire eller åtte prøver og er vist med standardavviksfeilstolper. Kun data oppnådd i det samme eksperimentet (dvs., prøver på samme plate) er presentert i den samme grafen for å sikre et relativt målt på fibrillering mellom eksperimenter.
- 10 Datasettet kan bli tilpasset ligning (1). Fordi fulle sigmoide kurver ikke alltid blir oppnådd i løpet av målingstiden så ble likevel forsinkelser her visuelt bestemt fra ThT-fluorescenskurven som tidspunktet der ThT-fluorescensen er forskjellig fra bakgrunnsnivået.
- 15 **Måling av utgangs- og sluttkonsentrasjoner**
- Peptidkonsentrasjonen i hver av de testede formuleringene ble målt både før benyttelse i ThT-fibrilleringanalysen («utgangs-») og etter fullstendig ThT-fibrillering («etter ThT-analyse»). Konsentrasjoner ble bestemt ved revers-HPLC-fremgangsmåter ved å benytte pramlintidstandard som en referanse. Før måling etter
- 20 komplettering ble 150 µl samlet fra hver av de like prøvene og overført til et Eppendorfrør. Disse ble sentrifugert ved 30000 g i 40 minutter. Supernatantene ble filtrert gjennom et filter på 0,22 µm før påsetting på HPLC-systemet.

PATENTKRAV

1. Insulinpreparat, omfattende:
 - en insulinforbindelse,
 - en nikotinforbindelse
 - 5 - arginin og
 - en fosfatbuffer.
2. Insulinpreparat ifølge krav 1, der insulinforbindelsen er humant insulin eller en insulinanalog.
- 10 3. Insulinpreparat ifølge hvilket som helst av de foregående krav, der insulinforbindelsen er humant B28Asp-insulin.
- 15 4. Insulinpreparat ifølge hvilket som helst av de foregående krav, der insulinforbindelsen er humant B28LysB29Pro-insulin.
5. Insulinpreparat ifølge hvilket som helst av de foregående krav, der insulinforbindelsen er humant B3LysB29Glu-insulin.
- 20 6. Insulinpreparat ifølge hvilket som helst av de foregående krav, der insulinforbindelsen foreligger i mengden på omtrent 0,2 mM til omtrent 2,0 mM.
- 25 7. Insulinpreparat ifølge hvilket som helst av de foregående krav, der insulinforbindelsen foreligger i mengden på omtrent 0,3 mM til omtrent 1,2 mM.
- 30 8. Insulinpreparat ifølge hvilket som helst av de foregående krav, der nikotinforbindelsen er valgt fra gruppen som består av nikotinamid, nikotinsyre, niacin, niacinamid og vitamin B3 og/eller salter derav og/eller en hvilken som helst kombinasjon derav.
- 35 9. Insulinpreparat ifølge hvilket som helst av de foregående krav, som omfatter omtrent 1 mM til omtrent 150 mM med nikotinforbindelsen.
10. Insulinpreparat ifølge hvilket som helst av de foregående krav, som omfatter omtrent 1 mM til omtrent 85 mM arginin.

11. Insulinpreparat ifølge hvilket som helst av de foregående krav, som ytterligere omfatter glutaminsyre.
- 5 12. Insulinpreparat ifølge hvilket som helst av de foregående krav, som ytterligere omfatter et metallion, konserveringsmiddel, isotonisitetsmiddel, stabilisator og detergent.
- 10 13. Insulinpreparat ifølge hvilket som helst av de foregående krav, der fosfatbufferen er valgt fra natriumdihydrogenfosfat, dinatriumhydrogenfosfat eller natriumfosfat.
- 15 14. Insulinpreparat ifølge hvilket som helst av de foregående krav til anvendelse for reduksjon av blodsukkernivåene i pattedyr ved å gi en terapeutisk virksom dose av insulinpreparatet til en pasient med behov for en slik behandling.
- 15 15. Insulinpreparat ifølge hvilket som helst av de foregående krav til anvendelse i behandlingen av diabetes mellitus hos et individ, omfattende administrering av insulinpreparatet til et individ.
- 20 16. Insulinpreparat ifølge hvilket som helst av de foregående krav til anvendelse i behandlingen eller forebyggingen av en hvilken som helst av: hyperglykemi, diabetes type 2, minsket glukosetoleranse, diabetes type 1, sykdommer eller lidelser der det er en anabolsk effekt er nødvendig i behandlingen, kardiovaskulære forstyrrelser og behandling av kritisk syke pasienter.
- 25 17. Insulinpreparat til anvendelse ifølge krav 16, der insulinpreparatet i anvendelsen til behandlingen eller forebyggingen er passende for en hvilken som helst av de følgende: stressindusert hyperglykemi, forbrenninger, operasjonssår, hjerteinfarkt, slag, koronar hjertesykdom og behandling av kritisk syke diabetikere og ikke-diabetikere.
- 30

SAMMENDRAG

Insulinpreparater som omfatter en insulinforbindelse eller en blanding av to eller flere insulinforbindelser, en nikotinforbindelse og en aminosyre.

1/3

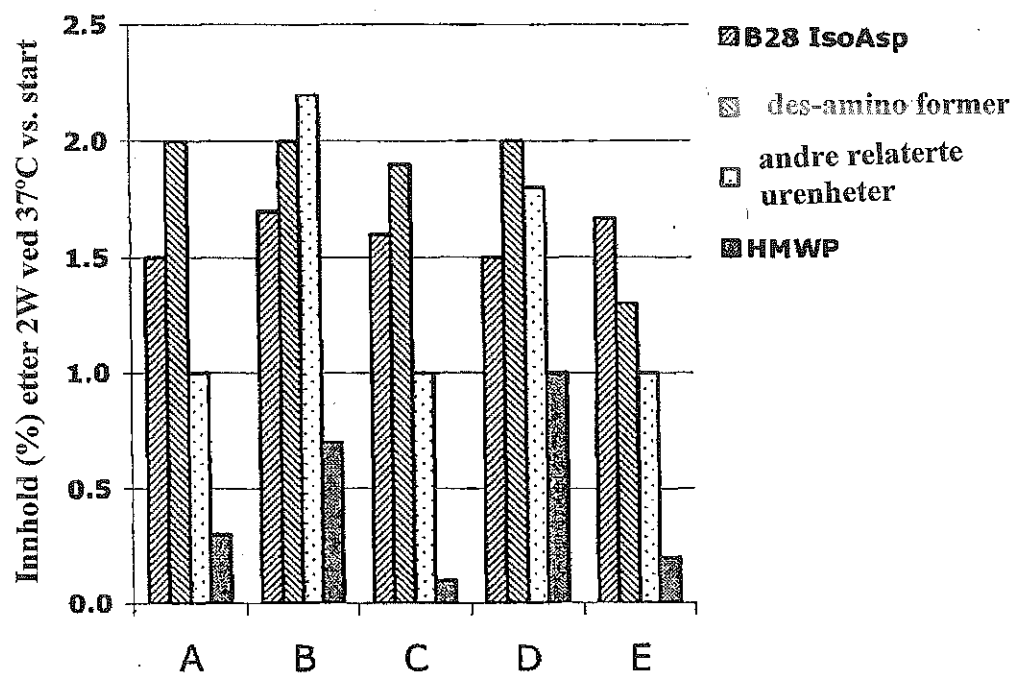


Fig. 1/5

2/3

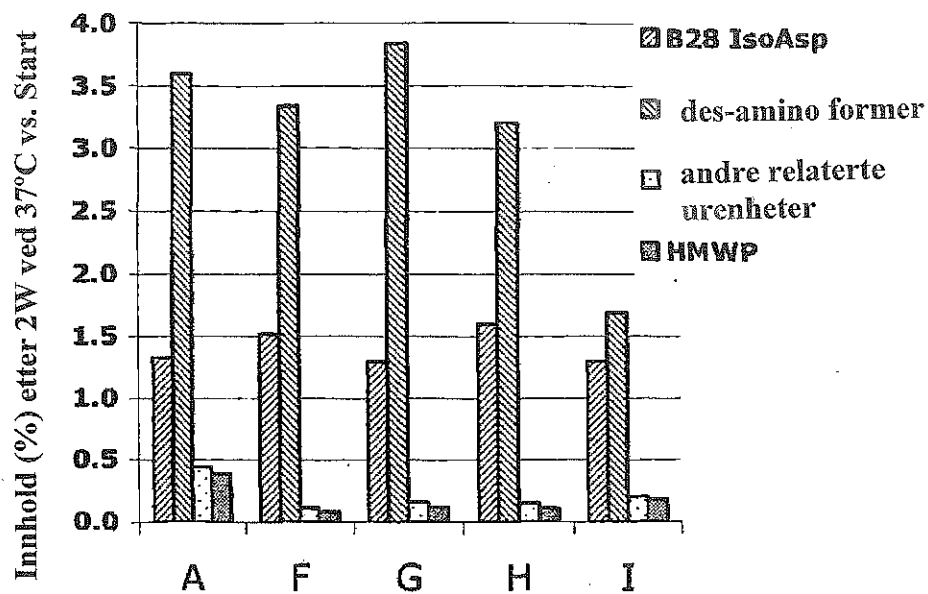


Fig. 2/5

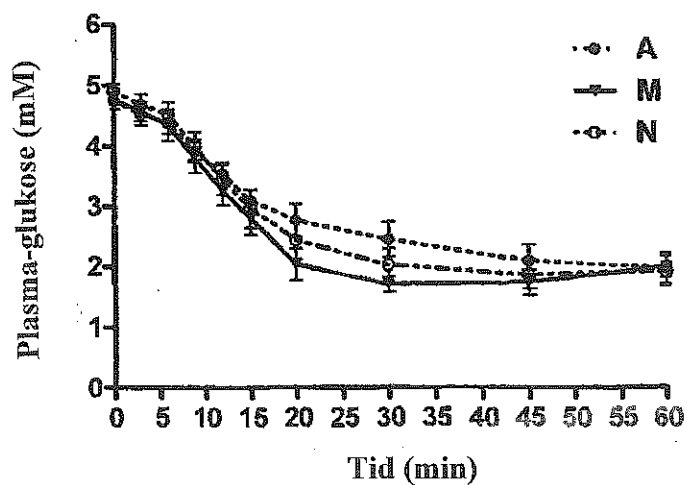


Fig. 3/5

3/3

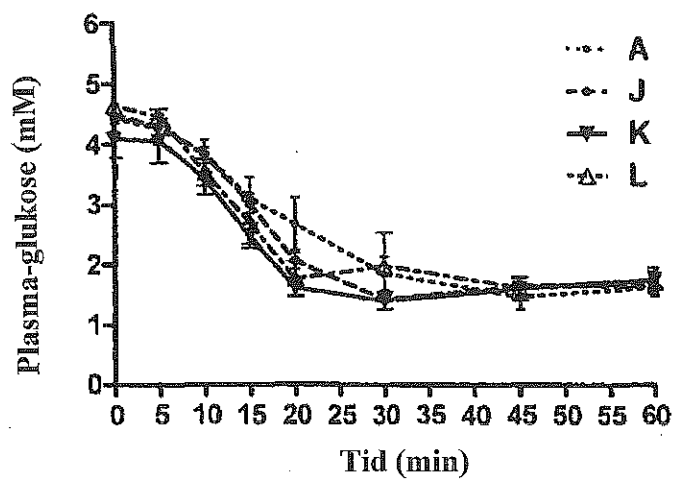


Fig. 4/5

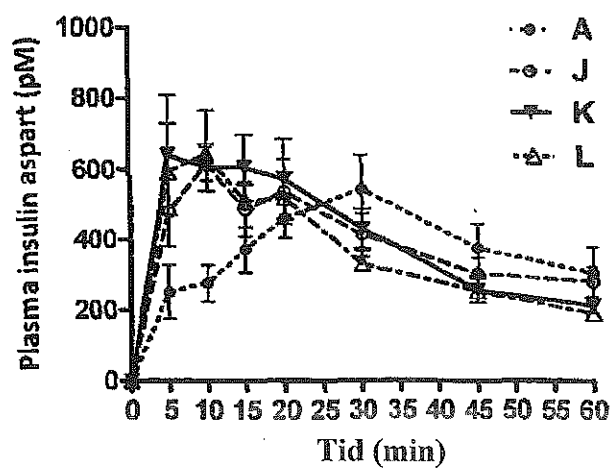


Fig. 5/5