



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 130708

(13) C2

(51) МПК

A61K 38/28 (2006.01)

A23L 33/10 (2016.01)

A61K 38/22 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ  
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

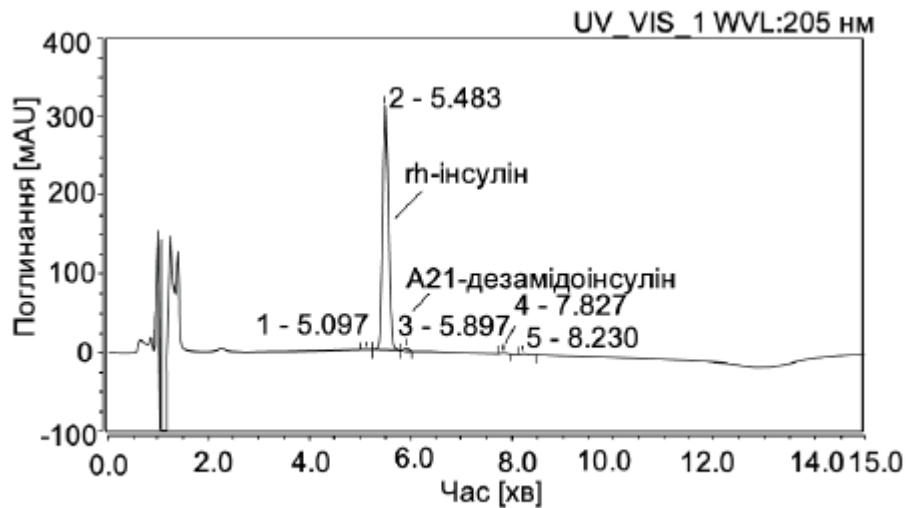
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(21) Номер заявки: <b>а 2023 05928</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>11.04.2022</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: <b>23.04.2026</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>63/173,442</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>11.04.2021</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>27.03.2024, Бюл.№ 13</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: <b>22.04.2026, Бюл.№ 16</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/IL2022/050371, 11.04.2022</b></p> | <p>(72) Винахідник(и):<br/><b>Ольшанські Міхаль (IL),<br/>Островські Елена (IL),<br/>Зельдіс Став (IL)</b></p> <p>(73) Володілець (володільці):<br/><b>ЕЛГАН ФАРМА ЛТД,</b><br/>New Generation Technologies NGT3 13 Wadi El-Haj<br/>Street 1603611 Nazareth Israel (IL)</p> <p>(74) Представник:<br/><b>Тимченко Дар'я Олександрівна</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:<br/>US 2021/0008171 A1, 14.01.2021<br/>WO 2020/240558 A1, 03.12.2020<br/>RU 2288000 C1, 27.11.2006<br/>WO 2020/012040 A1, 16.01.2020<br/>ANONYMOUS. Phosphate-buffered saline PBS.<br/>COLD SPRING HARBOR PROTOCOLS. 2006. P. 1<br/>HWANG M. et al. Use of Insulin Glargine in the<br/>Management of Neonatal Hyperglycemia in an<br/>ELBW Infant. PEDIATRICS. 01.04.2018. Vol. 141. P.<br/>s399 - s403<br/>BEARDSALL K. et al. A randomised controlled trial of<br/>early insulin therapy in very low birth weight infants.<br/>NATURE. BMC PEDIATRICS. 10.08.2007. P. 1-10<br/>OU JOCELYN et al. Nutrition in Necrotizing<br/>Enterocolitis and Following Intestinal Resection,<br/>NUTRIENTS. 18.02.2020. P. 1-16<br/>SHULMAN RJ et al. Effect of enteral administration<br/>of insulin on intestinal development and feeding<br/>tolerance in preterm infants: a pilot study.<br/>ARCHIVES OF DISEASE IN CHILDHOOD FETAL<br/>AND NEONATAL EDITION. 2002. P. 131-133<br/>MENARD D. et al. Insulin accelerates the<br/>development of intestinal brush border hydrolytic<br/>activities of suckling mice. DEVELOPMENTAL<br/>BIOLOGY. 15.07.1981. P. 150-155<br/>LEMAS DOMINICK J et al. Alterations in human milk<br/>leptin and insulin are associated with early changes<br/>in the infant intestinal microbiome. THE AMERICAN<br/>JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION. 08.03.2016.<br/>Vol. 103. No. 5. P. 1291-130<br/>KREZNAR JULIA H. et al. Host Genotype and Gut<br/>Microbiome Modulate Insulin Secretion and Diet-<br/>Induced Metabolic Phenotypes. CELL REPORTS.<br/>14.02.2017. P. 1739-1750<br/>CN 101045158 A, 03.10.2007<br/>EP 0308181 A1, 22.03.1989</p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**(54) ІНСУЛІНОВА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ХАРЧУВАННЯ ДІТЕЙ ГРУДНОГО ВІКУ ТА СПОСІБ ЇЇ ПРИГОТУВАННЯ**

(57) Реферат:

UA 130708 C2

Винахід стосується інсулінової композиції для харчування для дітей грудного віку, яка включає аморфний порошок інсуліну, який розчиняється у воді, причому зазначений аморфний порошок інсуліну включає інсулін, прикріплений до частинок мальтодекстрину у співвідношенні грам/грам (г/г) інсуліну і мальтодекстрину від 1:2500 до 1:10000, де 1 грам зазначеного аморфного порошку інсуліну включає від 0,2 до 40 МО інсуліну, і причому при відновленні в деіонізованій воді при концентрації 0,03 г аморфного порошку інсуліну на 1 мл води рН розчину, що утворюється, становить 6,0-7,6.



Фіг. 1

Споріднена заявка

Згідно з даною заявкою просимо встановити пріоритет відповідно до попередньої заявки на видачу патенту США № 63/173,442, поданої 11 квітня 2021 року, зміст якої повністю включений до даного документа за допомогою посилання.

5 Попередній рівень техніки даного винаходу

Даний винахід відноситься до композиції інсуліну, призначеної для використання у дитячому харчуванні. Варіанти здійснення даного винаходу відносяться до способів приготування інсуліну та дитячого харчування, що його містить, а також до способів застосування інсуліновмісного дитячого харчування для запобігання або зниження тяжкості таких захворювань недоношених

10 дітей, як сепсис із пізнім початком або некротизуючий ентероколіт/коліт/ентероколіт.

Пологи вважаються ранніми або передчасними, якщо вони відбуваються до 37-го тижня вагітності. Останні тижні внутрішньоутробного розвитку мають вирішальне значення для набору здорової ваги та повноцінного розвитку різних життєво важливих органів.

15 Грудне молоко визнано оптимальним харчуванням для всіх дітей, включаючи недоношених дітей, через його доведену користь для здоров'я дитини.

Людське молоко містить значну кількість гормонів і факторів росту, і дослідження показали, що деякі з цих гормонів (наприклад, інсулін, інсуліноподібний фактор росту 1, IGF-1, епідермальні фактори росту) після перорального введення впливають на тонкий кишечник.

20 Дослідження також показали, що додавання інсуліну до молочних сумішей для недоношених дітей призводить до покращення росту та прискорення розвитку кишечника [Shulman, R. J., 2002; Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition, 86(2), F131-F133].

Незважаючи на те, що інсуліновмісні склади дитячого харчування були описані раніше.

25 Коли діти народжуються передчасно, їхня травна система може бути не повністю сформована, і в результаті багато хто з цих недоношених дітей відчувають труднощі з годуванням і розлади, які прямо чи опосередковано пов'язані з недостатністю харчування.

Сепсис із пізнім початком (LOS), що визначається як сепсис, який розпочався після 72 годин життя, є основною причиною смертності у відділеннях інтенсивної терапії новонароджених. Частота захворюваності LOS у недоношених дітей варіюється від 20 до 38 % у перші 120 днів

30 життя, а рівень смертності знаходиться в інтервалі від 13 до 19 %.

Некротичний ентероколіт (NEC) - захворювання, що переважно вражає кишечник недоношених дітей. У стінку кишечника проникають бактерії, що призводять до місцевої інфекції та запалення, які зрештою можуть зруйнувати стінку кишечника. Некротизуючий ентероколіт розвивається приблизно у 7 % недоношених дітей, а серед хворих близько 25 % вмирають.

35 Здійснюючи даний винахід на практиці, автори даного винаходу розробили композицію інсуліну, яка може бути розчинена в дитячому харчуванні (молочній суміші або грудному молоці), і вперше показали, що такий склад харчування можна застосовувати для запобігання або зниження тяжкості LOS і NEC.

Стисле розкриття даного винаходу

40 Згідно з одним із аспектів даного винаходу, запропоновано спосіб приготування інсуліну для застосування в дитячому харчуванні, що включає: розчинення інсуліну в соляній кислоті з одержанням солюбілізованого інсуліну; розведення солюбілізованого інсуліну водою та доведення рН до 6,9-8,0.

45 Згідно з варіантами здійснення даного винаходу, спосіб додатково включає додавання циклодекстрину до розчину (b) для інкапсулювання таким чином інсуліну в порожнинах циклодекстрину; і доведення рН до 6,9-8,0.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу, спосіб додатково включає змішування одержаного розчину (b) або (d) із розчином натрію хлориду і розчином мальтодекстрину і доведення рН до 6,7-7,6.

50 Згідно з варіантами здійснення даного винаходу, композицію об'єднують із нанокрапельною емульсією масло-у-воді, де нанокраплі включають докозагексаєнову кислоту (DHA) і коензим Q10.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу, спосіб додатково включає фільтрацію результату змішування та ліофілізацію фільтрату з одержанням аморфного порошку з рН 6,0-7,6.

55 Згідно з іншим аспектом даного винаходу, запропоновано спосіб виробництва дитячого харчування з інсуліном, що включає розчинення у дитячому харчуванні аморфного порошку, описаного у даному документі.

60 Згідно з іншим аспектом даного винаходу, запропонована інсулінова композиція, що містить інсулін, олігосахарид і хлорид натрію у співвідношенні 1:A:B (мас.:мас.:мас., відповідно), де

діапазони А і В становлять 1000-100000 і 10-50, відповідно.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу, інсулінова композиція з концентрацією 0,03 г/мл при відновленні в деіонізованій воді або 0,9 % розчині хлориду натрію має рН 6,0-7,6.

5 Згідно з варіантами здійснення даного винаходу, інсулінова композиція додатково містить циклодекстрин.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу, циклодекстрин присутній у співвідношенні 10-1000 по відношенню до інсуліну.

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу, 1 грам інсулінової композиції включає 2-40 МО.

10 Згідно з іншим аспектом даного винаходу, запропоновано дитяче харчування, що містить інсулінову композицію.

Згідно з ще одним аспектом даного винаходу, запропоновано спосіб профілактики некротизуючого ентероколіту/коліту/ентероколіту у недоношеної дитини, що включає введення недоношеній дитині дитячого харчування.

15 Згідно з іншим аспектом даного винаходу, запропоновано спосіб зниження поширеності та тяжкості некротизуючого ентероколіту/коліту/ентероколіту у недоношеної дитини, що включає введення недоношеній дитині дитячого харчування.

20 Згідно з ще одним аспектом даного винаходу, запропоновано спосіб зниження поширеності сепсису із пізнім початком у недоношеної дитини, що включає введення недоношеній дитині дитячого харчування.

Згідно з іншим аспектом даного винаходу, запропоновано спосіб зниження запалення у шлунково-кишковому тракті у недоношеної дитини, що включає введення недоношеній дитині дитячого харчування.

25 Згідно з наступним аспектом даного винаходу, запропоновано спосіб зниження поширеності й тяжкості небажаних явищ, подій, що загрожують життю, і фатальних ускладнень у недоношеної дитини, що включає введення недоношеній дитині дитячого харчування.

Згідно з іншим аспектом даного винаходу, запропоновано спосіб зниження проникності шлунково-кишкового тракту у недоношеної дитини, що включає введення недоношеній дитині дитячого харчування і вимірювання співвідношення лактоза/лактолоза.

30 Згідно з ще одним аспектом даного винаходу, запропоновано спосіб прискорення швидкого дозрівання мікробіоти кишечника у недоношеної дитини, що включає введення недоношеній дитині дитячого харчування і вимірювання зниження кількості протеобактерій (*Proteobacteria*) і збільшення кількості фірмікутів (*Firmicutes*) і клостридій (*Clostridiaceae*).

Згідно з варіантами здійснення даного винаходу, дитяче харчування включає 0,01-4 МО/мл.

35 Згідно з іншим аспектом даного винаходу, запропоновано спосіб попередження пізнього початку сепсису у недоношеної дитини, що включає введення недоношеній дитині дитячого харчування.

40 Згідно з наступним аспектом даного винаходу, запропоновано спосіб скорочення часу до виписки недоношеної дитини з установи первинної медичної допомоги, що включає введення недоношеній дитині дитячого харчування, розкритого в даному документі.

45 Якщо не вказано інше, всі технічні та наукові терміни, що використовуються тут, мають те ж значення, яке зазвичай розуміється фахівцем у галузі техніки, до якої належить даний винахід. Відповідні способи та матеріали описані нижче, хоча у практиці або при тестуванні даного винаходу можуть бути використані способи і матеріали, які аналогічні або еквівалентні описаним у даному документі. У разі виникнення протиріч переважну силу матиме опис патенту, включаючи визначення. Також слід зазначити, що матеріали, способи і приклади носять виключно ілюстративний характер і не призначені для обмеження винаходу.

Стислий опис фігур

50 Винахід описано тут із посиланням на креслення, що додаються виключно як приклад. Тепер, наводячи посилання на докладні креслення, слід підкреслити, що деталі наведені лише як приклад і з метою ілюстративного обговорення переважних варіантів здійснення даного винаходу і представлені заради демонстрації того, що розглядається як найбільш корисний і легко зрозумілий опис принципів і концептуальних аспектів винаходу. У цьому відношенні не було зроблено жодних спроб показати структурні деталі винаходу докладніше, ніж це необхідно 55 для розуміння принципів винаходу; опис разом із кресленнями робить для фахівців у даній галузі техніки очевидним, як різні форми винаходу можуть бути втілені на практиці.

Фігури:

ФІГ. 1 являє собою типову хроматограму композицій I-IV даного винаходу.

ФІГ. 2 являє собою типову хроматограму композицій V-VI даного винаходу.

60 ФІГ. 3 являє собою типову хроматограму DHA і коензиму Q10 у композиціях IV-V даного

винаходу.

ФІГ. 4 ілюструє ймовірність відмови від парентерального харчування (PN) для групи (крива виживання Каплана-Мейєра).

5 ФІГ. 5 ілюструє середнє споживання PN на день на групу, демонструючи явну перевагу групи лікування, особливо для інсулінової композиції, що вводиться ентерально, в дозі 0,3 МО/кг/день порівняно із плацебо (показано як швидкість скорочення PN від загального споживання).

ФІГ. 6 ілюструє відсоток ентерального харчування від загального харчування на групу.

ФІГ. 7 ілюструє відповідність кривих кожній групі на Фіг. 6.

10 На ФІГ. 8 представлена мікрофотографія, що зроблена за допомогою скануючого електронного мікроскопа, на якій показана аморфна структура композицій I-IV даного винаходу.

На ФІГ. 9-10 наведені графіки, що показують результати термогравіметричного аналізу (TGA) і диференційної скануючої калориметрії (DSC) композицій I-IV даного винаходу.

На ФІГ. 11 представлені твердотільні ЯМР-спектри композицій I-IV даного винаходу.

15 Докладне розкриття даного винаходу

Даний винахід відноситься до композиції інсуліну, яка може застосовуватися у дитячому харчуванні. Зокрема, даний винахід може застосовуватися для запобігання або зменшення тяжкості таких захворювань недоношених дітей, як сепсис із пізнім початком або некротичний ентероколіт/коліт/ентероколіт.

20 Принципи і здійснення даного винаходу можна краще зрозуміти, звернувшись до креслень і описів, що їх супроводжують.

Перед тим, як переходити до докладних пояснень щонайменше одного варіанту здійснення винаходу, слід врахувати, що винахід не обмежений у його застосуванні деталями, викладеними в наступному описі або проілюстрованими Прикладами. Винахід допускає інші варіанти здійснення або може бути реалізований на практиці або здійснений різними способами. Крім того, слід розуміти, що фразеологія і термінологія, що використовуються тут, призначені для цілей опису і не повинні розглядатися як обмежуючі.

Інсуліновмісні продукти для дитячого харчування відомі у даній галузі техніки і були запропоновані для лікування мальабсорбції у недоношених дітей.

30 Проводячи експерименти з різними композиціями інсуліну, призначеними для використання в дитячому харчуванні, такому як материнське молоко або молочні суміші, автори даного винаходу спостерігали, що при розчиненні в дитячому харчуванні інсулін проявляє тенденцію до полімеризації та агрегації, таким чином доступність інсуліну в одержаній молочній суміші знижується. Хоча енергійне перемішування дитячого харчування частково може вирішити цю проблему, автори даного винаходу припустили, що це далеко не оптимальне рішення, і поставили завдання покращити розчинність інсуліну в дитячому харчуванні.

35 Таким чином, згідно з одним із аспектів даного винаходу, запропонована композиція інсуліну, яка легко розчиняється у дитячому харчуванні (наприклад, материнському молоці або молочній суміші) та демонструє стабільність (структурну та функціональну) у харчуванні без агрегації протягом тривалих періодів часу.

40 Дана композиція включає інсулін (наприклад, людський рекомбінантний), вуглевод (наприклад, олігосахарид, такий як мальтодекстрин) і хлорид натрію у співвідношенні 1:А:В (мас.:мас.:мас., відповідно), де діапазони А і В становлять 1000-100000 та 10-50, відповідно. Один грам інсулінової композиції може включати 2-40 МО. Інсулінова композиція може додатково включати циклодекстрин у співвідношенні 10-1000 по відношенню до інсуліну. Вуглеводи, такі як, наприклад, моносахариди (наприклад, глюкоза), дисахариди (наприклад, лактоза, мальтоза), олігосахариди (декстрини (наприклад, мальтодекстрин), циклодекстрини (наприклад, гідроксипропіл-бета-циклодекстрин (HPβCD)) і полісахариди використовуються в якості стабілізаторів, наповнювачів і кріопротекторів. У композицію також можуть бути додані

50 буферні агенти (наприклад, фосфати натрію або калію). Композицію можна комбінувати з наноемульсією масло-у-воді, що містить нанокраплі, які включають докозагексаєнову кислоту (DHA) і коензим Q10.

Композиція може перебувати у формі порошку і при відновленні в деіонізованій воді або 0,9 % розчині хлориду натрію може мати рН 6,0-7,6 при концентрації 0,03 г/мл.

55 Автори даного винаходу виявили, що попередня обробка інсуліну при рН 6,9-8,0, змішування з вуглеводом при рН 6,7-7,6 і ліофілізація призводять до одержання аморфного порошку інсуліну (Фігура 8), який легко розчинний у людському грудному молоці і, таким чином, долає вищезгадані проблеми попередніх складів інсуліну.

60 Дана інсулінова композиція являє собою аморфний порошок, в якому інсулін інкорпорований в аморфну структуру, що складається головним чином з наповнювача (наприклад,

мальтодекстрину). Вміст води у препараті може становити 6,5 % або нижче, осмолярність становить близько 110-120 мосм/кг при відновленні в деіонізованій воді при концентрації 0,1 г/мл, а рН становить 6,0-7,6 при відновленні в деіонізованій воді або 0,9 % розчину хлориду натрію при концентрації 0,03 г/мл. Типові криві термограм, що одержані за допомогою термогравіметричного аналізу (TGA) та диференційної скануючої калориметрії (DSC), показані на Фігурах 9-10. Твердотільний ЯМР-спектр композиції за даним винаходом наведений на Фігурі 11.

Як зазначено у даному документі, представлена інсулінова композиція може додаватися у вигляді порошку (або рідини) у дитяче харчування, наприклад, таке як грудне молоко. Людське молоко являє собою материнське грудне молоко або донорське грудне молоко, свіже і гомогенізоване.

Дана інсулінова композиція, коли вона перебуває у формі порошку, може бути розчинена у дитячому харчуванні до кінцевої концентрації інсуліну 0,1-8 МО/мл.

Дана композиція може бути упакована у вигляді порошку і може зберігатися протягом тривалих періодів часу (днів/місяців).

Упаковка може являти собою, наприклад, скляний флакон або алюмінієвий пакетик, який заповнений даною композицією у вигляді сухого порошку. Упаковка може включати 0,1-1,0 грам композиції у формі порошку, причому кожний грам містить 0,2-40 МО інсуліну. У незаповненому обсязі одиниці упаковки може перебувати повітря або інертний газ (наприклад, азот).

Упаковка може забезпечувати бар'єр для вологи і/або кисню зі швидкістю проникності водяної пари (MVTR) менше, ніж приблизно 0,1 г/м<sup>2</sup>/24 год. і швидкістю проникнення кисню крізь стінку оболонки (OTR) менше, ніж приблизно 0,1 см<sup>3</sup>/м<sup>2</sup>/24 год.

Коли композиція, що розглядається, упакована описаним тут чином, вона зберігає високу стабільність і може зберігатися протягом тривалих періодів часу, при цьому активність інсуліну знижується не більше, ніж приблизно на 1-10 %, при зберіганні за температури від приблизно 2 °C до приблизно 8 °C протягом періоду часу до 24 місяців. Крім того, вміст води в упакованій композиції зазвичай становить не більше, ніж приблизно 4,5-6,5 % за масою, при зберіганні за температури приблизно від 2 °C до приблизно 8 °C протягом 24 місяців.

Інсулінова композиція може бути відновлена у деіонізованій воді або 0,9 % розчині хлориду натрію, і одержаний розчин може бути доданий у дитяче харчування (у власне молоко матері, донорське грудне молоко, молочну суміш тощо), щоб одержати концентрацію інсуліну, описану вище для композиції у формі порошку.

Як описано у даному документі та продемонстровано в розділі "Приклади", даний склад інсуліну і дитяче харчування, що містить його, можуть застосовуватися для прискорення відлучення недоношених дітей від парентерального харчування і суттєвого зниження небажаних явищ загалом, а також певних станів, що являють інтерес, включаючи некротичний коліт (NEC) і сепсис із пізнім початком (LOS).

Таким чином, згідно з іншим аспектом даного винаходу, запропоновано спосіб запобігання або зниження ризику і тяжкості LOS у суб'єкта, який має в цьому потребу, такого як недоношена дитина. Спосіб здійснюється шляхом введення суб'єкту, який має в цьому потребу, терапевтично ефективної кількості дитячого харчування, змішаного з лікарським засобом за даним винаходом. Таке введення може бути пероральним або через зонд годування.

Таким чином, згідно з ще одним аспектом даного винаходу, запропоновано спосіб запобігання або зниження ризику і тяжкості NEC у суб'єкта, що має в цьому потребу, такого як недоношена дитина. Спосіб здійснюється шляхом введення суб'єкту, який має в цьому потребу, терапевтично ефективної кількості дитячого харчування, змішаного з лікарським засобом за даним винаходом. Таке введення може бути пероральним або через зонд годування.

Термін "терапевтично ефективна кількість" означає дозу активного інгредієнта або харчування, що містить активний інгредієнт, який забезпечить терапевтичний ефект, для якого призначений активний інгредієнт.

У контексті даного винаходу фраза "суб'єкт, що має в цьому потребу" відноситься до дитини людини. Дитина людини може бути будь-якого віку (наприклад, доношена або недоношена дитина) або будь-якої статі. Суб'єктом, що має потребу, може бути недоношена дитина, що народилася на терміні вагітності від 24 до 37 тижнів, або доношена дитина із низькою масою тіла при народженні, або дитина із затримкою внутрішньоутробного розвитку (IUGR), або дитина із низькою для гестаційного віку масою тіла.

Відповідно до типової схеми введення, визначеної авторами даного винаходу, препарат може вводитися шляхом безперервного ентерального введення або болюсного прийому з використанням 0,1-1 г порошку, змішаного з 1-3 мл дитячого харчування, розділеного, наприклад, на 1-12 пероральних прийомів на день.

Як описано у наступному розділі "Приклади", запропонована схема призводила до меншої кількості випадків NEC у групі, яка отримувала дозу 0,3 МО/кг/день порівняно із плацебо; некротичний ентероколіт (стадія 2 або 3 за Беллом) виник у 7 дітей (6 %) у групі низьких доз, у 4 дітей (5 %) у групі високих доз та у 10 дітей (10 %) у групі плацебо. При спостереженні за найбільш ослабленою популяцією (групи гестаційного віку 26-28 тижнів) різниця ще більш виражена: NEC спостерігалися у 4,3 % суб'єктів у групі лікування порівняно з 19,6 % у групі плацебо. Між групами спостерігалася суттєва різниця у відсотку дітей, які перенесли інфекції (включаючи сепсис та інші інфекції). При спостереженні за всією досліджуваною популяцією загальна захворюваність становила 30 % у групі з дозою 0,06 МО/кг/день, 34,7 % у групі з дозою 0,3 МО/кг/день і 42,9 % у групі плацебо.

Одночасна оцінка кишкової проникності й активності лактази за допомогою тесту на абсорбцію цукру (SAT), що виконана в іншому дослідженні з використанням представленої схеми введення, показала тенденцію до зниження кишкової проникності (що вказує на швидке дозрівання шлунково-кишкового тракту) і вищої активності лактази у групах лікування.

Ефективність даного дослідження також ілюструється часом до виписки (додому або до установи вторинної допомоги), як наочно показують результати, що наведені в Прикладі 4. Як показано у цьому прикладі, скорочення часу до виписки з установи первинної допомоги недоношеним дітям становить щонайменше 5 % порівняно з нелікованою недоношеною дитиною (контроль). Це означає, що виписка відбудеться як мінімум на 5 днів раніше за очікуваний строк.

Інше дослідження було проведено з метою оцінити ефективність ентерального введення 2 доз інсуліну порівняно з плацебо щодо різних відмінностей у мікробіоті кишечника. Це дослідження продемонструвало значні відмінності у мікробіоті шлунково-кишкового тракту між групами лікування і групою плацебо. Наприкінці лікування група з високою дозою інсуліну показала меншу мікробну різноманітність, ніж група плацебо ( $p=0,0192$ ). Інсулін збільшує філум фірмікутів (Firmicutes) і зменшує філум протеобактерій. Ентеральне введення інсуліну призводило до зниження кількості протеобактерій і збільшення кількості фірмікутів і клостридій (Clostridiaceae). Ці результати показують, що запропонована композиція і схема лікування сприяють швидкому дозріванню мікробіоти кишечника. Зниження кількості протеобактерій і збільшення кількості фірмікутів, що одержане в цьому дослідженні, це зміни, які раніше спостерігалися у дітей із низьким ризиком розвитку NEC.

Термін "приблизно", що використовується тут, означає  $\pm 10$  %.

Додаткові цілі, переваги та нові особливості даного винаходу стануть очевидними для звичайного фахівця у даній галузі техніки після вивчення наведених далі прикладів, які не призначені для обмеження винаходу.

#### Приклади

Тепер звернемося до наведених нижче прикладів, які разом із наведеним вище описом ілюструють винахід необмежуючим чином.

#### Приклад 1. Композиції інсуліну та дитячого харчування

Були приготовлені інсулінові композиції та протестована їх ефективність (у складі дитячого харчування) при лікуванні недоношених дітей.

#### Композиція I

Інсулін як активний інгредієнт, хлорид натрію як солюбілізуєчий агент й олігосахарид як наповнювач і стабілізатор (наприклад, мальтодекстрин). Готовий продукт являє собою ліофілізований порошок, що упакований у скляні флакони. Концентрація відновленого розчину регулюється об'ємом розріджувача.

Таблиця 1

| Інгредієнт                                   | Вміст на одиницю дози (флакон) |
|----------------------------------------------|--------------------------------|
| Рекомбінантний людський інсулін (rh-інсулін) | 0,04-0,05мг (1-1,5 МО)         |
| Мальтодекстрин                               | 100-500 мг                     |
| Хлорид натрію                                | 1,0-2,0 мг                     |

#### Матеріали і методи

Розчин rh-інсуліну, 24,5 МО/мл, готували наступним чином: 13 мг інсуліну розчиняли в 1 мл 0,1 н. соляної кислоти, розбавляли до 15 мл водою і доводили рН до 7,6 за допомогою 0,1 н. гідроксиду натрію.

#### Складання композиції:

Сорок грамів мальтодекстрину розчиняли у 100 мл води і доводили рН одержаного розчину

до 7,2. До цієї суміші додавали 2 мл 6 % розчину хлориду натрію і 4 мл розчину інсуліну, доводили рН до 7,0.

Одержану суміш фільтрували крізь 0,22 мкм PES-мембрану, розливали по скляних флаконах (об'єм заповнення 1,7 мл) і ліофілізували.

5 Кожний флакон із ліофілізованим порошком містив 1,25 МО rh-інсуліну, 510 мг мальтодекстрину та 1,5 мг хлориду натрію.

Композиція II

10 Інсулін як активний інгредієнт, циклодекстрин як інкапсулюючий агент (наприклад, гідроксипропіл-бета-циклодекстрин), хлорид натрію як солюбілізуючий агент й олігосахарид як наповнювач і стабілізатор (наприклад, мальтодекстрин). Готовий продукт являє собою ліофілізований порошок, що упакований у скляні флакони. Концентрація відновленого розчину регулюється об'ємом розріджувача.

Таблиця 2

| Інгредієнт                                   | Вміст на одиницю дози (флакон) |
|----------------------------------------------|--------------------------------|
| Рекомбінантний людський інсулін (rh-інсулін) | 0,04-0,05мг (1-1,5 МО)         |
| Гідроксипропіл-бета-циклодекстрин            | 2,0 мг                         |
| Мальтодекстрин                               | 100 мг                         |
| Хлорид натрію                                | 1,0 мг                         |

15 Матеріали і методи

Розчин rh-інсуліну, 62 МО/мл, готували наступним чином: 85,6 мг інсуліну розчиняли в 5 мл 0,1 н. соляної кислоти, розбавляли 30 мл води і доводили рН до 7,2 за допомогою 0,1 н. гідроксиду натрію.

Складання композиції:

20 Двісті грамів мальтодекстрину розчиняли у 600 г води та рН одержаного розчину доводили до 7,3. До цієї суміші додавали 2 г хлориду натрію, попередньо розчиненого в 60 мл води, і розчин інсуліну, рН доводили до 7,0 і додавали додаткову порцію води для доведення загального об'єму до 1 л.

25 Одержану суміш фільтрували крізь 0,22 мкм PES-мембрану, розливали по скляних флаконах (об'єм заповнення 0,5 мл) і ліофілізували.

Кожний флакон із ліофілізованим порошком містив 1,2 МО rh-інсуліну, 100 мг мальтодекстрину та 1,0 мг хлориду натрію.

Композиція III

30 Розчин rh-інсуліну, 243 МО/мл, готували наступним чином: 84,4 мг інсуліну розчиняли в 1 мл 0,1 н. соляної кислоти, розбавляли до 10 мл водою і доводили рН до 8,1 за допомогою 0,1 н. гідроксиду натрію.

Складання композиції:

35 Тридцять грамів мальтодекстрину розчиняли у 60 мл води і доводили рН одержаного розчину до 7,1. До цієї суміші додавали 2,7 мл 7,5 % розчину хлориду натрію і 1 мл розчину інсуліну, доводили рН до 7,3 і додавали додаткову порцію води для доведення загальної маси до 100 г.

Одержану суміш фільтрували крізь 0,22 мкм PES-мембрану, розливали по скляних флаконах (об'єм заповнення 0,5 мл) і ліофілізували.

40 Кожний флакон із ліофілізованим порошком містив 1,4 МО rh-інсуліну, 172 мг мальтодекстрину та 1,2 мг хлориду натрію.

Композиція IV

45 У цьому прикладі описується композиція, що одержана у промисловому масштабі з 9 кг рідкої суміші (0,9 кг ліофілізованого порошку). Інсулін як активний інгредієнт, хлорид натрію як солюбілізуючий агент й олігосахарид як наповнювач і стабілізатор (наприклад, мальтодекстрин). Готовий продукт являє собою ліофілізований порошок, що упакований у скляні флакони. Концентрація відновленого розчину регулюється об'ємом розріджувача.

Таблиця 3

| Інгредієнт                                   | Вміст на одиницю дози (флакон) |
|----------------------------------------------|--------------------------------|
| Рекомбінантний людський інсулін (rh-інсулін) | 0,035 мг (1 МО)                |
| Мальтодекстрин                               | 99 мг                          |
| Хлорид натрію                                | 1 мг                           |
| Загальна вага                                | 100 мг                         |

## Матеріали і методи

Розчин rh-інсуліну, 33 МО/мл, готували наступним чином: 0,39 г інсуліну розчиняли у 20 г 0,1 н. соляної кислоти, розбавляли 300 г води для ін'єкцій і потім нейтралізували 20 г 0,1 н. гідроксиду натрію. рН доводили до 7,2 з допомогою 0,1 н. гідроксиду натрію.

## Складання композиції:

856 грамів мальтодекстрину та 8,6 грамів хлориду натрію розчиняли в 6854 грамах води і доводили рН одержаного розчину до 7,2. До цієї суміші додавали розчин інсуліну, масу одержаної композиції доводили до 9,0 кг, а рН доводили до 7,0.

Одержану суміш фільтрували крізь 0,22 мкм PES-мембрану, розливали по скляних флаконах (об'єм заповнення 1 г) і ліофілізували.

Кожний флакон із ліофілізованим порошком містив 1 МО rh-інсуліну, 99 мг мальтодекстрину та 1 мг хлориду натрію.

Аналітичні характеристики одержаного сухого порошку: вміст інсуліну (інсулін + дезамідоінсулін A21) - 1,13 МО/флакон, вміст дезамідоінсуліну A21 становить 0,5 % (розрахований, виходячи з відсотка площі), сумарний вміст інших споріднених сполук становить 0,1 % (розрахований, виходячи з відсотка площі), відносне стандартне відхилення для вмісту інсуліну на флакон (однорідність) становить 0,9 %, вміст води 0,8 %, рН=6,7, час відновлення порошку у воді - менше 5 хвилин.

## Композиція V

Ця композиція була приготовлена шляхом одержання емульсії DHA і коензиму Q10 з використанням методу заміщення розчинника, додавання rh-інсуліну та кріопротектора (наприклад, декстринів, циклодекстринів), фільтрації та ліофілізації.

Таблиця 4

| Інгредієнт                                         | Вміст на одиницю дози (флакон) |
|----------------------------------------------------|--------------------------------|
| Рекомбінантний людський інсулін (rh-інсулін)       | 0,04 мг (1,2 МО)               |
| Цис-4,7,10,13,16,19-докозагексаснова кислота (DHA) | 2,5 мг                         |
| Коензим Q10 (CoQ10)                                | 1,1 мг                         |
| Тілоксапол                                         | 0,5 мг                         |
| Ліпоїд Е 80                                        | 0,5 мг                         |
| Полівініловий спирт (PVA)                          | 0,5 мг                         |
| Мальтодекстрин                                     | 33мг                           |
| Гідроксид натрію*                                  | -                              |
| Соляна кислота*                                    | -                              |

\*Гідроксид натрію або соляна кислота використовуються для коригування значення рН і не враховуються у сумарній масі.

## Матеріали і методи

Розчин rh-інсуліну, 40 МО/мл, готували наступним чином: 27,5 мг інсуліну розчиняли в 2 мл 0,1 н. соляної кислоти, розбавляли 18 мл води і доводили рН до 7,2 за допомогою 0,1 н. гідроксиду натрію.

Наноемульсію масло-у-воді (із середнім розміром крапель 120 нм) готували наступним чином: 690 мг коензиму Q10, 1533 мг етилового ефіру DHA, 300 мг тілоксаполу і 300 мг ліпоїду Е80 розчиняли у 56 мл етанолу. Суміш додавали по краплях через 21G голку до 300 мл 0,1 % водного розчину PVA, безперервно перемішуючи при 350 об/хв за кімнатної температури. Одержану емульсію перемішували ще 10 хвилин, розбавляли 0,1 % розчином PVA і видаляли органічні розчинники за допомогою тангенціальної потокової фільтрації з використанням мембрани Hydrosart, MWCO 30000.

Десять грамів мальтодекстрину розчиняли в 160 мл одержаної емульсії і потім змішували із розчином інсуліну. Об'єм кінцевої суміші доводили до 300 мл, а рН доводили до 6,9. Емульсію фільтрували через 0,22 мкм PES-мембрану, розливали по скляних флаконах (об'єм заповнення 1 мл/флакон) і ліофілізували. Кожний флакон містив 1,2 МО rh-інсуліну, 2,5 мг DHA та 1,1 мг коензиму Q10. Середній розмір краплинних частинок відновленого порошку становить 295 нм.

## Композиція VI

Етапи приготування композиції ідентичні таким для композиції V.

Таблиця 5

| Інгредієнт                                         | Вміст на одиницю дози (флакон) |
|----------------------------------------------------|--------------------------------|
| Рекомбінантний людський інсулін (rh-інсулін)       | 0,04 мг (1,2 МО)               |
| Цис-4,7,10,13,16,19-докозагексаєнова кислота (DHA) | 2,3 мг                         |
| Коензим Q10 (CoQ10)                                | 1,1 мг                         |
| Тілоксапол                                         | 0,5 мг                         |
| Ліпоїд Е 80                                        | 0,5 мг                         |
| Полівініловий спирт (PVA)                          | 0,5 мг                         |
| Гідроксипропілбета-циклодекстрин                   | 30 мг                          |
| Гідроксид натрію*                                  | -                              |
| Соляна кислота*                                    | -                              |

\*Гідроксид натрію або соляна кислота використовуються для коригування значення рН і не враховуються у сумарній масі.

#### Матеріали і методи

Розчин rh-інсуліну, 40 МО/мл, готували наступним чином: 27,2 мг інсуліну розчиняли в 2 мл 0,1 н. соляної кислоти, розбавляли 18 мл води і доводили рН до 7,2 за допомогою 0,1 н. гідроксиду натрію.

Наноемульсію масло-у-воді (із середнім розміром крапель 120 нм) готували так само, як це описано для композиції IV.

Десять грамів гідроксипропілбета-циклодекстрину розчиняли в 160 мл одержаної емульсії і потім змішували із розчином інсуліну. Об'єм кінцевої суміші доводили до 327 мл, а рН доводили до 6,9. Емульсію фільтрували через 0,22 мкм PES-мембрану, розливали по скляних флаконах (об'єм заповнення 1 мл/флакон) і ліофілізували. Кожний флакон містить 1,2 МО rh-інсуліну, 2,5 мг DHA та 1,1 мг коензиму Q10. Середній розмір краплинних частинок відновленого порошку становив 143 нм.

#### Приклад 2. Тестування композицій I-IV

Вміст rh-інсуліну визначали методом звернено-фазової вискоефективної рідинної хроматографії на колонці Hypersil Gold-C18 (3×50 мм, 3 мкм) із градієнтною елюцією рухомої фази, що складається з водної та органічної фаз (ацетонітрил), підкислених 0,1 % трифтороцтовою кислотою (TFA). Швидкість потоку - 0,3 мл/хв, УФ-поглинання визначали при 205 нм. Типова хроматограма композицій I-IV представлена на фігурі 1.

#### Тестування композицій V-VI

Вміст rh-інсуліну, DHA і коензиму Q10 визначали методом звернено-фазової вискоефективної рідинної хроматографії на колонці Hypersil Gold-C18 (3 × 50 мм, 3 мкм) із градієнтною елюцією рухомої фази, що складається з водної та органічної фаз (суміш ацетонітрил:метанол:2-пропанол у співвідношенні 75:15:10), підкислених 0,1 % трифтороцтовою кислотою (TFA). Швидкість потоку - 0,6 мл/хв, УФ-поглинання визначали при 205 нм для інсуліну і при 214 нм для DHA і коензиму Q10. Типова хроматограма композицій V-VI показана на фігурі 2. Типова хроматограма визначення DHA і коензиму Q10 у композиціях V-VI показана на фігурі 3.

#### Приклад 3. Розчинність у дитячому харчуванні

Дослідження було розроблено для оцінки розчинності представленої композиції при діапазоні значень рН людського грудного молока. Три сухі зразки, що містять мальтодекстрин, хлорид натрію та інсулін (1 МО), готували наступним чином.

Зразок 1 являє собою кристалічний термічно висушений порошок, що приготовлений шляхом розпилення розчину мальтодекстрину, хлориду натрію та інсуліну на тверді частинки мальтодекстрину і подальшого сушіння за 35 °С. Висушений порошок змішували з мальтодекстрином у співвідношенні 1:3, кінцевий рН був 6,3.

Зразок 2 являє собою один із варіантів даної композиції, що представлений у вигляді аморфного порошку з рН 7,0, приготовленого, як описано в Прикладі 1, композиції I-III.

Зразок 3 являє собою фізичну суміш сухих інгредієнтів (мальтодекстрин, хлорид натрію та інсулін), перемішаних всуху без будь-якої попередньої обробки.

Певну кількість кожної композиції (еквівалентну 1 МО інсуліну) відновлювали у 1,8 мл 0,1 М фосфатного буфера при рН 6,3, 6,7 та 7,2 і досліджували візуально.

Результати показують, що Зразок 2 (представлена композиція) легко розчиняється у грудному молоці при широкому діапазоні рН (6,3-7,2), у результаті чого утворюється прозорий

розчин, порівнянний з контрольним буфером. Зразок 1 (термічно висушена композиція) і Зразок 3 (фізична суміш сухих інгредієнтів, без попередньої обробки) були частково розчинні при тестованому діапазоні рН, що призводило до утворення непрозорого розчину.

Профіль розчинення тестованих зразків оцінювали за допомогою ВЕРХ у наступних середовищах: 0,01 н. HCl, двічі деіонізована вода та 0,1 М фосфатний буфер при рН 6,3 та 7,4.

Для кожного зразка розраховували відсоток розчинення у воді й у фосфатному буфері відносно кількості інсуліну, визначеного в 0,01 н. HCl. Одержані результати розчинення (наведена нижче Таблиця 6) показують, що представлена композиція добре розчинна в діапазоні рН, властивому молочній суміші.

Таблиця 6

| Середовище для розчинення     | % розчинення інсуліну       |                                                 |                                                                      |
|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
|                               | Зразок 1 (термічне сушіння) | Зразок 2 представлена композиція (ліофілізація) | Зразок 3 (фізична суміш сухих інгредієнтів, без попередньої обробки) |
| 0,01 н. HCl                   | 100,0 %                     | 100,0 %                                         | 100 %                                                                |
| Двічі деіонізована вода       | 84,0 %                      | 93,1 %                                          | 68,1 %                                                               |
| 0,1 М фосфатний буфер, рН 6,3 | 78,9 %                      | 93,3 %                                          | 81,8 %                                                               |
| 0,1 М фосфатний буфер, рН 7,4 | 84,3 %                      | 93,6 %                                          | 95,0 %                                                               |

Крім того, зразки 1 та 2 були відновлені у коров'ячому молоці (рН 6,89, жирність 3 %). Результати відповідали спостереженням, зробленим у тесті відновлення у буфері. Зразок 1 частково розчинявся в молоці, у результаті чого утворювалися видимі згустки, які можуть прилипати або блокувати проходження відновленого лікарського засобу через назогастральний зонд. Зразок 2 повністю розчинявся в молоці, у результаті чого виходила гомогенна суміш.

Приклад 4. Дослідження ефективності у недоношених дітей

Дослідження було розроблено для оцінки ефективності та безпеки ентерально введеної композиції rh-інсуліну у недоношених дітей. Після процедур скринінгу підходящі діти, що народжені у період від 26 до 32 тижнів вагітності та вагою при народженні не менше 500 г, були випадково розподілені в 1 із 3 груп лікування у співвідношенні 1:1:1.

Лікування починали у постнатальному віці щонайменше через 6 годин і через 120 годин включно після народження. Період лікування дітей, яких годували виключно рідним материнським молоком (ОММ), розпочинався протягом перших 72 годин після народження.

Період лікування визначали починаючи з першого дня введення дози (День 1) до 28 дня або до виписки з установи первинної медичної допомоги, якщо це відбувалося до 28 дня.

Композицію, що тестується, вводили у дозі 0,3 МО/кг/день протягом 28 днів. Перед введенням порошок розчиняли переважно у людському грудному молоці, донорському грудному молоці, фізіологічному розчині або половинному фізіологічному розчині.

Одержані результати

Діти були виписані або додому, або у вторинне відділення з установи первинної медичної допомоги. При аналізі часу до виписки оцінювали два аналізи: 1) аналіз виписки з установи первинної медичної допомоги (окремо порівнювали суб'єктів, переведених до установи вторинної допомоги, та суб'єктів, виписаних додому); та 2) виписку додому (з установи первинної чи вторинної медичної допомоги).

Час виписки з установи первинної медичної допомоги

Дітей виписували з установи первинної медичної допомоги або додому, або в установу вторинної медичної допомоги, переважно залежно від регіону. Кожна дитина займала одне місце для аналізу в аналізі ІТТ, при цьому порівнювалися всі групи та рівні. В обох групах лікування час до виписки був значно коротшим у порівнянні з плацебо, демонструючи швидший час досягнення стабільного стану здоров'я.

Середня кількість днів до виписки з лікарні (додому або до установи вторинної медичної допомоги) була найменша у групі, що отримувала композицію інсуліну, що містить 0,3 МО/кг [медіана = 42,0 дня,  $P=0,055$ ], за яким йшла група, що отримувала композицію інсуліну, що містить 0,0406 МО/кг [медіана = 43,0 дня,  $p=0,04^*$ ] порівняно з плацебо [медіана = 49,5 днів].

Час до виписки в установу вторинної медичної допомоги

Деякі лікарні переводять дітей у вторинні відділення після того, як діти стабілізуються і виходять зі стану, що безпосередньо загрожує життю. Дітей виписують у вторинні відділення, а

через кілька тижнів - додому. У ході дослідження суб'єкти групи, що отримувала композицію інсуліну, яка містить 0,3 МО/кг, були виписані у вторинні відділення раніше, ніж пацієнти з групи плацебо, на що вказують медіанні значення і відмінність від плацебо (Таблиця 7 нижче).

Таблиця 7

Число днів до виписки з установи первинної медичної допомоги у вторинні установи залежно від гестаційного віку - вся вибірка, що аналізується

| Група відповідно до гестаційного віку | Статистика              | Лікування                                                     |                                                             |                |
|---------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------|
|                                       |                         | rh-інсулінова композиція, ентерально, 0,06 МО/кг/день (N=108) | rh-інсулінова композиція, ентерально, 0,3 МО/кг/день (N=94) | Плацебо (N=98) |
| 26-28 тижнів                          | n                       | 14                                                            | 16                                                          | 14             |
|                                       | Медіана                 | 34,0                                                          | 31,5                                                        | 39,0           |
|                                       | Відмінність від плацебо | 3,5                                                           | 5,3                                                         | -              |
| 29-32 тижні                           | n                       | 8                                                             | 5                                                           | 12             |
|                                       | Медіана                 | 22,0                                                          | 11,0                                                        | 23,0           |
|                                       | Відмінність від плацебо | -2,3                                                          | 9,0                                                         | -              |

5

Час до виписки додому

В іншому типі проведеного аналізу оцінювали час до виписки додому для всіх дітей, незалежно від того, чи відбувалася ця виписка безпосередньо з установи первинної медичної допомоги або установи вторинної медичної допомоги. Цей аналіз показав аналогічну тенденцію до скорочення часу до виписки, однак показав набагато більшу варіабельність порівняно з основним аналізом "виписка з установи первинної медичної допомоги".

10

У порівнянні з плацебо лікування композицією інсуліну, що містить 0,06 МО/кг, призводило до значного скорочення днів до виписки додому [медіана = 48,0 днів проти медіани = 60,0 днів у групі плацебо,  $P=0,025^*$ ]. Лікування композицією інсуліну, що містить 0,3 МО/кг, призводило до медіани 55,0 днів [ $p=0,27$  порівняно з плацебо] до виписки додому.

15

При спільному аналізі обох груп лікування виписка з групи лікування відбувалася раніше [медіана = 52 дні,  $p=0,046^*$ ], ніж у групі плацебо [медіана = 60 днів].

Час припинення парентерального харчування (PN)

Статистично значуща різниця в часі до припинення парентерального харчування (PN) спостерігалася в групі, яка отримувала молочну суміш із добавкою інсуліну в концентрації 0,3 МО/кг/день, порівняно з групою плацебо (6 проти 8 днів,  $p=0,0096^{**}$ ).

20

При оцінці часу до припинення PN за віковими групами, час до припинення PN у старшій популяції (29-32 тижні) також був коротшим у групі 0,3 МО/кг/день (4 дні проти 6 днів). Результати підсумовані в Таблицях 8-10 нижче і графічно представлені на фігурі 4, де показана ймовірність припинення PN для групи (крива виживання Каплана-Мейєра).

25

Таблиця 8

| Сумарний аналіз числа днів до припинення PN - вся вибірка, що аналізується |            |                                                               |                                                             |                |
|----------------------------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------|
| Група відповідно до гестаційного віку                                      | Статистика | rh-інсулінова композиція, ентерально, 0,06 МО/кг/день (N=108) | rh-інсулінова композиція, ентерально, 0,3 МО/кг/день (N=94) | Плацебо (N=98) |
| Всі                                                                        | n (%)      | 107                                                           | 92                                                          | 97             |
|                                                                            | Медіана    | 7.0                                                           | 6.0                                                         | 8.0            |

Таблиця 9

| Сумарний аналіз числа днів до припинення PN - вся вибірка, що аналізується |                                                                                          |                                                  |
|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Група відповідно до гестаційного віку                                      | Порівняння лікування                                                                     | Стратифікований критерій Ван Елтерена р-значення |
| Всі                                                                        | rh-інсулінова композиція, ентерально, 0,06 МО/кг/день (N=107) порівняно з плацебо (N=97) | 0,48                                             |
|                                                                            | rh-інсулінова композиція, ентерально, 0,3 МО/кг/день (N=92) порівняно з плацебо (N=97)   | 0,0096**                                         |

Примітка: фактор стратифікації - група відповідно до гестаційного віку (26-28 тижнів, 29-32 тижні)

Таблиця 10

| Сумарний аналіз числа днів до припинення PN відповідно до гестаційного віку - вся вибірка, що аналізується |            |                                                              |                                                            |                |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------|
| Група відповідно до гестаційного віку                                                                      | Статистика | rh-інсулінова композиція, ентерально 0,06 МО/кг/день (N=108) | rh-інсулінова композиція, ентерально 0,3 МО/кг/день (N=94) | Плацебо (N=98) |
| 26-28 тижнів                                                                                               | n          | 48                                                           | 59                                                         | 51             |
|                                                                                                            | Медіана    | 9,0                                                          | 9,0                                                        | 9,0            |
| 29-32 тижні                                                                                                | n          | 59                                                           | 47                                                         | 46             |
|                                                                                                            | Медіана    | 6.0                                                          | 4.0                                                        | 6.0            |

5 Іншою важливою кінцевою точкою для цього дослідження є відсоток PN у загальному харчуванні дитини, а також поступове зниження відсотка PN з плином часу.

На Фігурі 5 показано середнє споживання PN в день на групу, що демонструє явну перевагу групи лікування, особливо композиції rh-інсуліну, що вводиться ентерально, в дозі 0,3 МО/кг/день порівняно із плацебо у швидкості зниження PN від загального споживання.

10 На фігурі 6 представлений відсоток ентерального харчування від загального харчування за групами, а на фігурі 7 представлені криві за групами.

Приклад 5. Дослідження недоношених дітей відносно NEC та LOS

Досліджувана популяція також спостерігалася на предмет небажаних явищ, таких як некротичний коліт (NEC) і сепсис із пізнім початком (LOS).

Некротичний коліт (NEC)

15 Між групами спостерігалася суттєва різниця у відсотку дітей, у яких виникала NEC. При спостереженні за усією досліджуваною популяцією загальна захворюваність становила 6,3 % у групі з дозою 0,06 МО/кг/день, 4,3 % у групі з дозою 0,3 МО/кг/день і 10,2 % у групі плацебо, що виражається у 60 % зниженні випадків NEC у групі з дозою 0,3 МЕ/кг/день порівняно з плацебо.

20 При спостереженні за молодшою досліджуваною популяцією (гестаційний вік 26-28 тижнів), у якій NEC більш поширений, відмінності стають ще очевиднішими: 12,2 % у групі з дозою 0,06 МО/кг/день, 4,3 % у групі з дозою 0,3 МО/кг/день і 19,6 % у групі плацебо, що виражається майже у 60 % зниженні випадків NEC у групі з дозою 0,3 МЕ/кг/день порівняно з плацебо.

25 Був проведений статистичний аналіз з використанням непараметричного методу Краскела-Уолліса, в якому порівнювалися як захворюваність, так і тяжкість NEC, і він показав статистично достовірну різницю у групі з гестаційним віком 26-28 тижнів ( $p=0,077$ ). Результати цього дослідження представлені в Таблицях 11 та 12 нижче.

Таблиця 11

| Розподіл захворюваності NEC за ступенем тяжкості у групі для всієї популяції |       |       |       |       |       |             |
|------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| Рівень СТСАЕ* для NEC                                                        | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | Загальний % |
| Композиція rh-інсуліну, ентерально, 0,06 МО/кг/день (N=110)                  |       |       |       |       |       |             |
| Число випадків                                                               | 0     | 3     | 1     | 1     | 2     | 7           |
| %                                                                            | 0,0 % | 2,7 % | 0,9 % | 0,9 % | 1,8 % | 6,3 %       |
| Композиція rh-інсуліну, ентерально, 0,3 МО/кг/день (N=95)                    |       |       |       |       |       |             |
| Число випадків                                                               | 0     | 0     | 2     | 1     | 1     | 4           |
| %                                                                            | 0,0 % | 0,0 % | 2,1 % | 1,1 % | 1,1 % | 4,3 %       |
| Плацебо (N=98)                                                               |       |       |       |       |       |             |
| Число випадків                                                               | 0     | 1     | 3     | 2     | 4     | 10          |
| %                                                                            | 0,0 % | 1,0 % | 3,1 % | 2,0 % | 4,1 % | 10,2 %      |

\* Загальні термінологічні критерії оцінки небажаних явищ

Таблиця 12

Розподіл захворюваності NEC за ступенем тяжкості у групі (гестаційний вік 26-28 тижнів)

| Рівень СТСАЕ* для NEC                                      | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | Загальний % |
|------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| Композиція rh-інсуліну, ентерально, 0,06 МО/кг/день (N=49) |       |       |       |       |       |             |
| Кількість випадків                                         | 0     | 3     | 0     | 1     | 2     | 6           |
| %                                                          | 0,0 % | 6,1 % | 0,0 % | 2,0 % | 4,0 % | 12,2 %      |
| Композиція rh-інсуліну, ентерально, 0,3 МО/кг/день (N=46)  |       |       |       |       |       |             |
| Кількість випадків                                         | 0     | 0     | 0     | 1     | 1     | 2           |
| %                                                          | 0,0 % | 0,0 % | 0,0 % | 2,1 % | 2,1 % | 4,3 %       |
| Плацебо (N=51)                                             |       |       |       |       |       |             |
| Кількість випадків                                         | 0     | 1     | 3     | 2     | 4     | 10          |
| %                                                          | 0,0 % | 1,9 % | 5,8 % | 3,9 % | 7,8 % | 19,6 %      |

5 Розраховували комбінацію несприятливих результатів, що включає виникнення однієї з інфекцій, NEC і смерті, та проводили порівняння між групами, результати показані у наведеній нижче Таблиці.

Таблиця 13

| Категорія                                          | Композиція rh-інсуліну, ентерально, 0,06 МО/кг/день (N=110) | Композиція rh-інсуліну, ентерально, 0,3 МО/кг/день (N=95) | Плацебо (N=98) |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------|
| Всього суб'єктів з інфекціями, n (%)               | 33 (30,0)                                                   | 33 (34,7)                                                 | 42 (42,9)      |
| Всього суб'єктів із NEC, n (%)                     | 7 (6,4)                                                     | 4 (4,2)                                                   | 9 (9,2)        |
| Всього суб'єктів зі смертельним результатом, n (%) | 5 (4,5)                                                     | 1 (1,1)                                                   | 4 (4,1)        |
| Всього суб'єктів із будь-якою подією, n (%)        | 38 (34,5)                                                   | 34 (35,8)                                                 | 49 (50,0)      |

10 Було виявлено, що у групах лікування відсоток суб'єктів, у яких виникало одне із зазначених небажаних явищ, що становлять інтерес, був значно нижчим. При використанні композиції rh-

- інсуліну, що вводиться ентерально, цей показник становив 34,5 % у групі з дозою 0,06 МО/кг/день; 35,8 % у групі з дозою 0,3 МО/кг/день і 50 % у групі плацебо. При виконанні парного порівняння часток, були одержані значення  $p=0,034$  при порівнянні композиції гн-інсуліну, що вводиться ентерально, з дозою 0,06 МО/кг/день і плацебо, і значення  $p=0,065$  при порівнянні композиції гн-інсуліну, що вводиться ентерально, з дозою 0,3 МО/кг/день порівняно з плацебо (див. наведену нижче Таблицю 14).

Таблиця 14

## Результат аналізу безпеки композицій - парне порівняння часток

| Група відповідно до гестаційного віку | Порівняння                                                                             | Незалежний критерій хі-квадрат, оцінка р-значення |
|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Всі                                   | Композиція гн-інсуліну, ентерально, 0,06 МО/кг/день (N=110) порівняно з плацебо (N=98) | 0,034*                                            |
|                                       | Композиція гн-інсуліну, ентерально, 0,3 МО/кг/день (N=95) порівняно з плацебо (N=98)   | 0,065                                             |

## Сепсис із пізнім початком (LOS)

- Між групами спостерігалася суттєва різниця у відсотку дітей, які перенесли інфекції (включаючи сепсис та інші інфекції). При спостереженні за досліджуваною популяцією загальна захворюваність становила 30 % у групі з дозою 0,06 МО/кг/день, 34,7 % у групі з дозою 0,3 МО/кг/день і 42,9 % у групі плацебо.

- Зокрема, при оцінці частоти сепсису, підтвердженого клінічно або за допомогою аналізу на бактеріальний посів, у групах лікування спостерігалися нижчі показники порівняно з групою плацебо. Захворюваність становила 12 % у групі з дозою 0,06 МО/кг/день, 11 % у групі з дозою 0,3 МО/кг/день і 15 % у групі плацебо (майже 30 % зниження захворюваності на сепсис із пізнім початком).

- Слід брати до уваги, що деякі ознаки винаходу, які для ясності описані в контексті різних варіантів здійснення винаходу, також можуть бути скомбіновані в одному варіанті здійснення винаходу. І навпаки, різні ознаки винаходу, які для стислості описані в контексті одного варіанту здійснення винаходу, також можуть бути представлені окремо або у будь-якій підходящій комбінації.

- Хоча винахід був описаний на прикладі його конкретних варіантів здійснення, зрозуміло, що фахівцям у даній галузі техніки будуть очевидні багато його альтернатив, модифікацій і варіантів. Відповідно, передбачається, що винахід охоплює всі такі альтернативи, модифікації та варіанти, які знаходяться в рамках сутності та широкого обсягу прикладеної формули винаходу.

- Заявник має на увазі, що всі публікації, патенти та заявки на патенти, що згадані в цьому описі, повністю включені в опис за допомогою посилання, якби кожна окрема публікація, патент або заявка на патент при посиланні на них були спеціально й індивідуально зазначені, як включені за допомогою посилання. Крім того, цитування або ідентифікація будь-якого посилання в цій заявці не повинні бути витлумачені як визнання того, що таке посилання стосується попереднього рівня техніки даного винаходу. У тій мірі, в якій використовуються заголовки розділів, вони не повинні бути витлумачені як обов'язково обмежуючі. Крім того, будь-який пріоритетний документ(и) цієї заявки включений(і) до даного документа за допомогою посилання у всій своїй повноті.

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Інсулінова композиція для харчування для дітей грудного віку, яка включає аморфний порошок інсуліну, який розчиняється у воді, причому зазначений аморфний порошок інсуліну включає інсулін, прикріплений до частинок мальтодекстрину у співвідношенні грам/грам (г/г) інсуліну і мальтодекстрину від 1:2500 до 1:10000, де 1 грам зазначеного аморфного порошку інсуліну включає від 0,2 до 40 МО інсуліну, і причому при відновленні в деіонізованій воді при

концентрації 0,03 г аморфного порошку інсуліну на 1 мл води рН розчину, що утворюється, становить 6,0-7,6.

2. Композиція за п. 1, яка додатково включає хлорид натрію у співвідношенні г/г хлориду натрію і декстрину від 1:100 до 1:250 і співвідношенні хлориду натрію і інсуліну від 1:20 до 1:50.

5 3. Композиція за п. 1, в якій зазначений інсулін ізольований всередині порожнин зазначених частинок мальтодекстрину.

4. Спосіб приготування аморфного порошку інсуліну, який розчиняється у воді, що включає:

(а) розчинення інсуліну в соляній кислоті з одержанням солюбілізованого інсуліну;

(b) розведення зазначеного солюбілізованого інсуліну водою та доведення рН до 6,9-8,0;

10 (c) розчинення частинок мальтодекстрину у воді та доведення рН до 7,0-7,5,

(d) додавання розчину інсуліну стадії (b) до розчину декстрину стадії (c) для ізолювання зазначеного інсуліну в порожнинах молекул зазначеного мальтодекстрину;

(e) доведення рН розчину стадії (d) до 6,9-8,0, та

(f) ліофілізація розчину стадії (e) з одержанням аморфного порошку інсуліну.

15 5. Спосіб за п. 4, який додатково включає змішування результату стадії (b) або (e) з розчином хлориду натрію і розчином мальтодекстрину при рН 6,7-7,5 і доведення зазначеного рН до 6,7-7,6.

20 6. Спосіб за п. 5, який додатково включає фільтрацію результату зазначеного змішування та ліофілізацію фільтрату з одержанням аморфного порошку інсуліну з рН 6,0-7,6 при відновленні в деіонізованій воді при концентрації 0,03 г аморфного порошку інсуліну на 1 мл води.

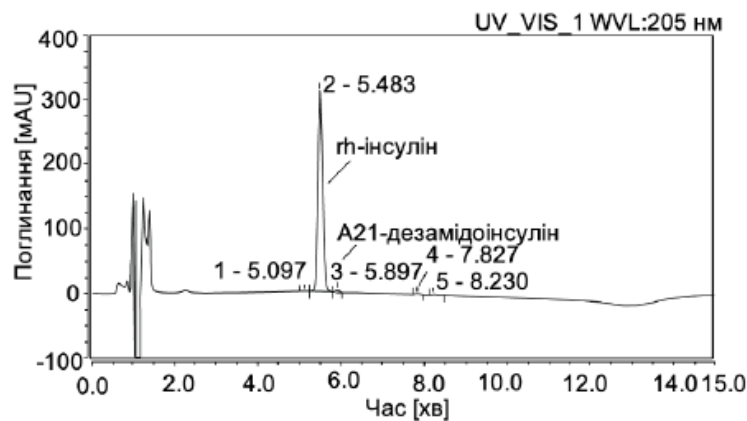


Fig. 1

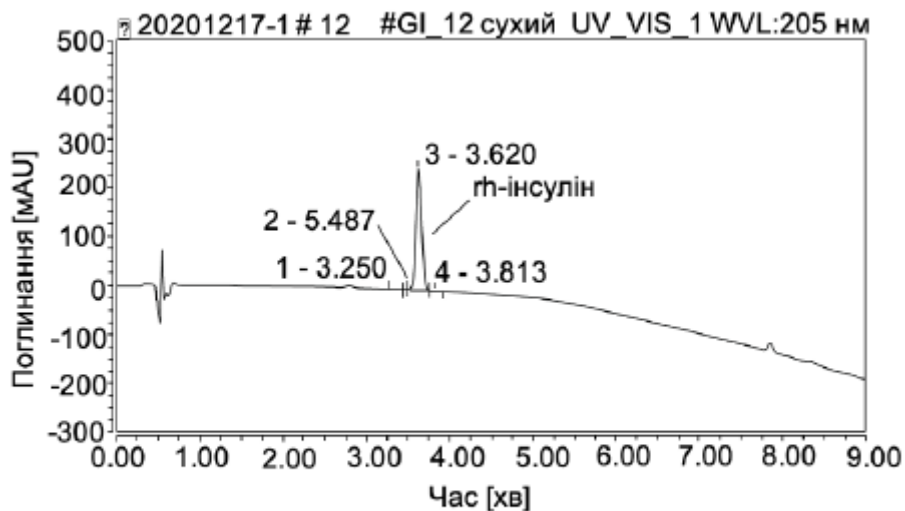
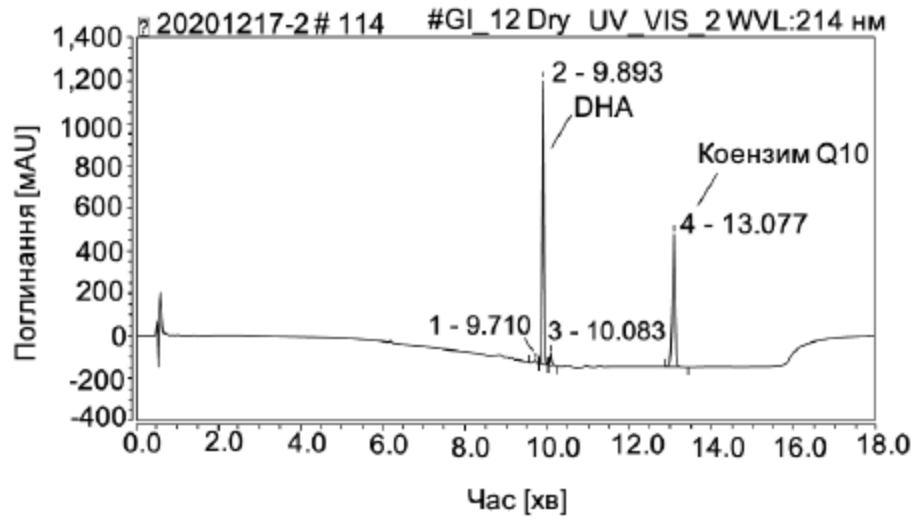
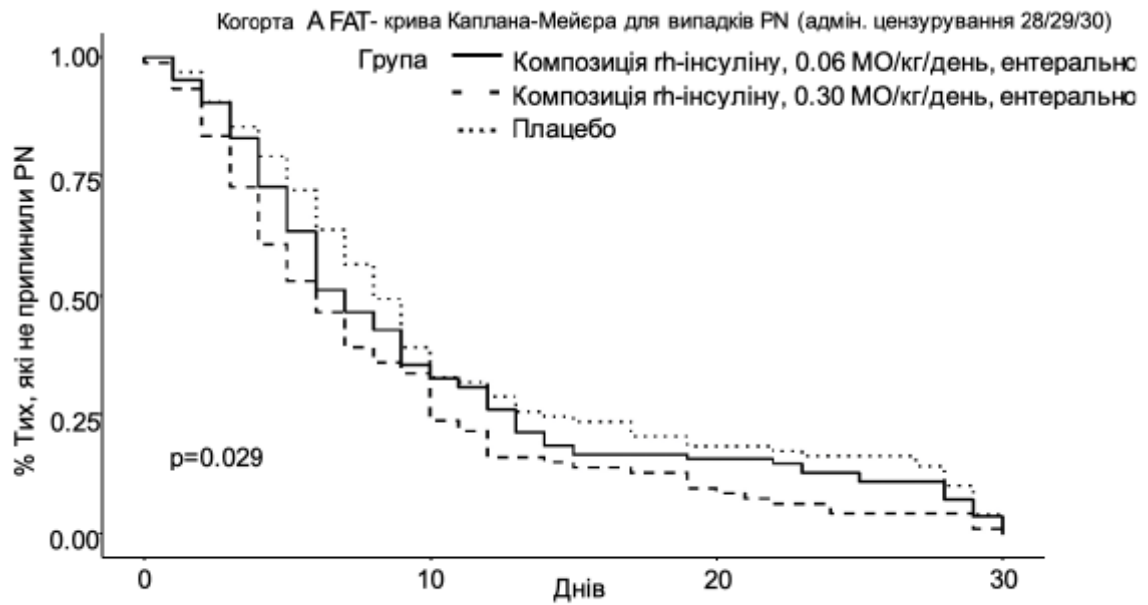


Fig. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

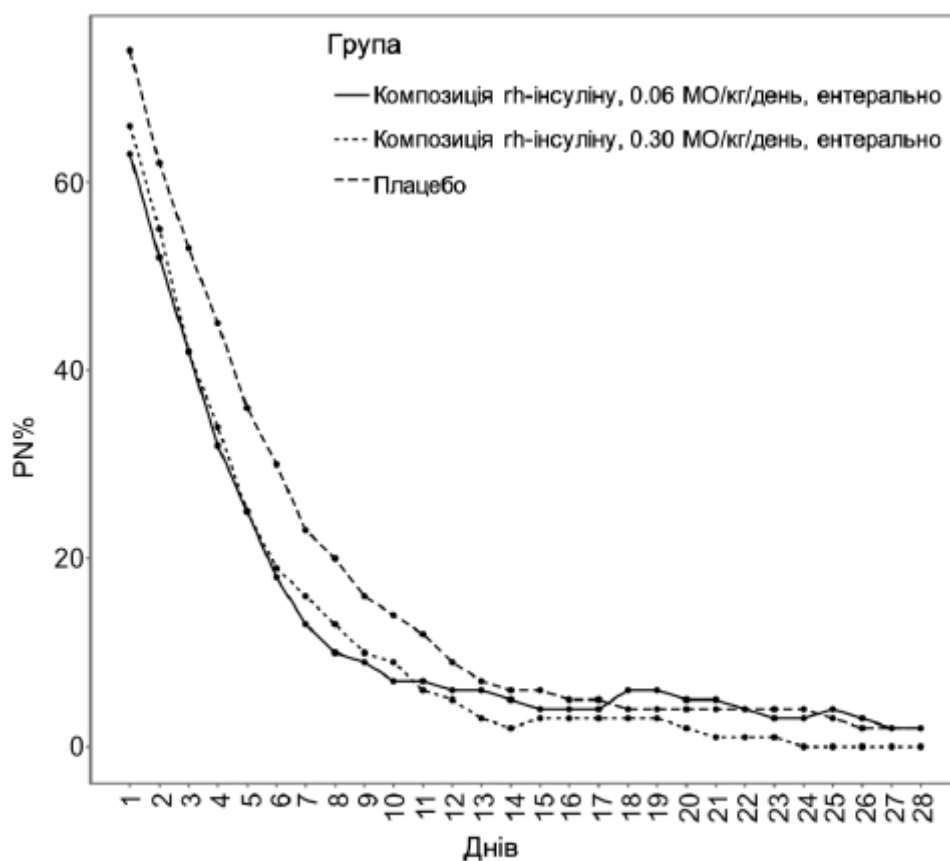


Fig. 5

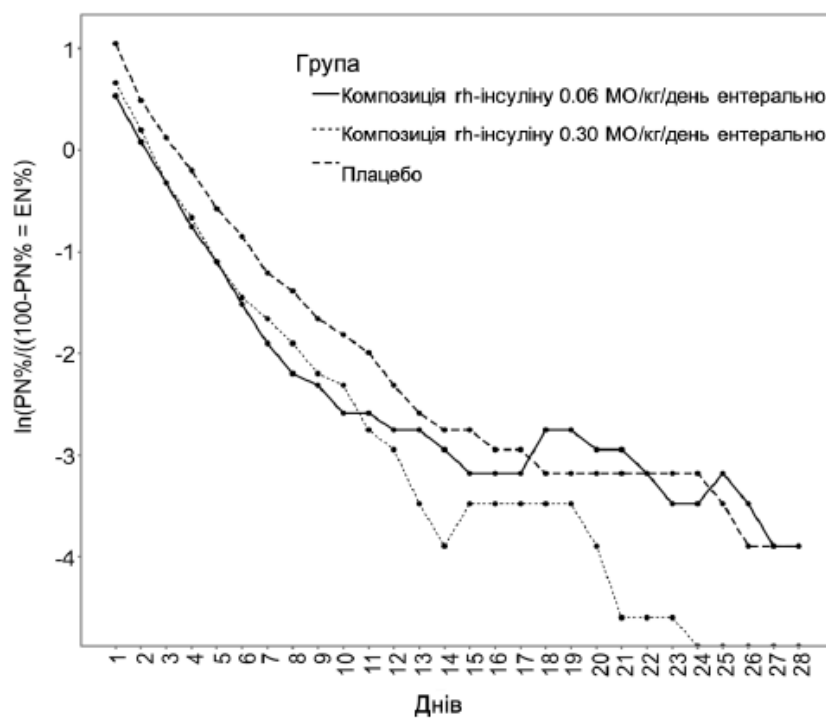


Fig. 6

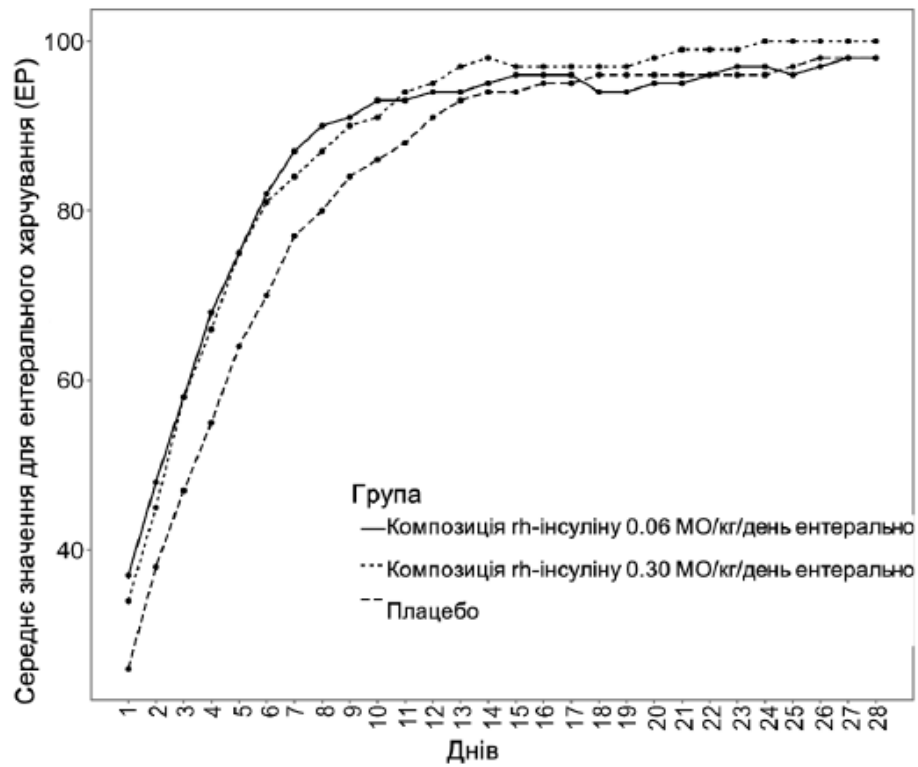


Fig. 7

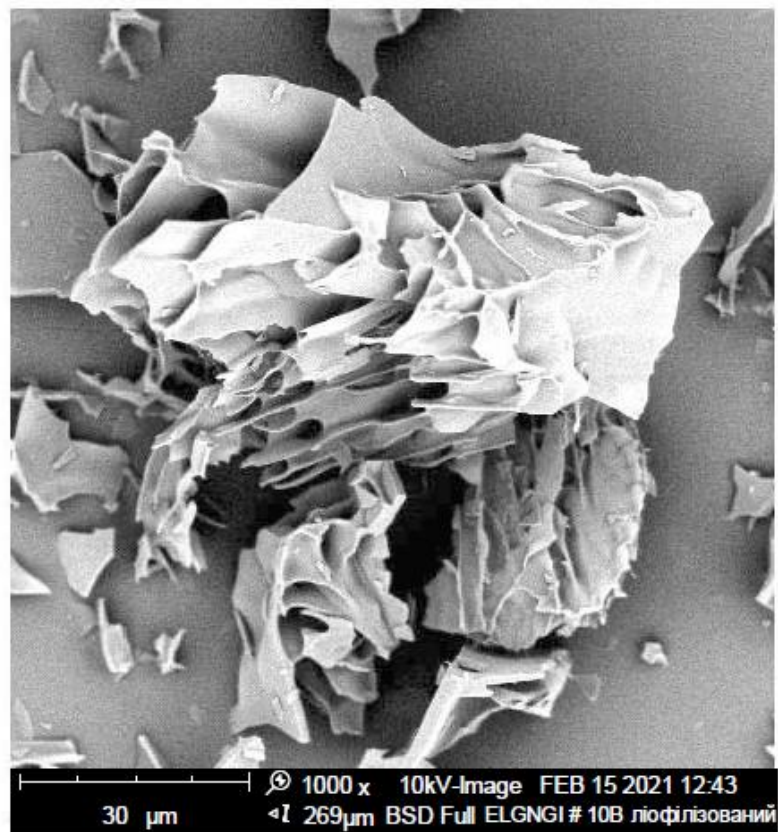
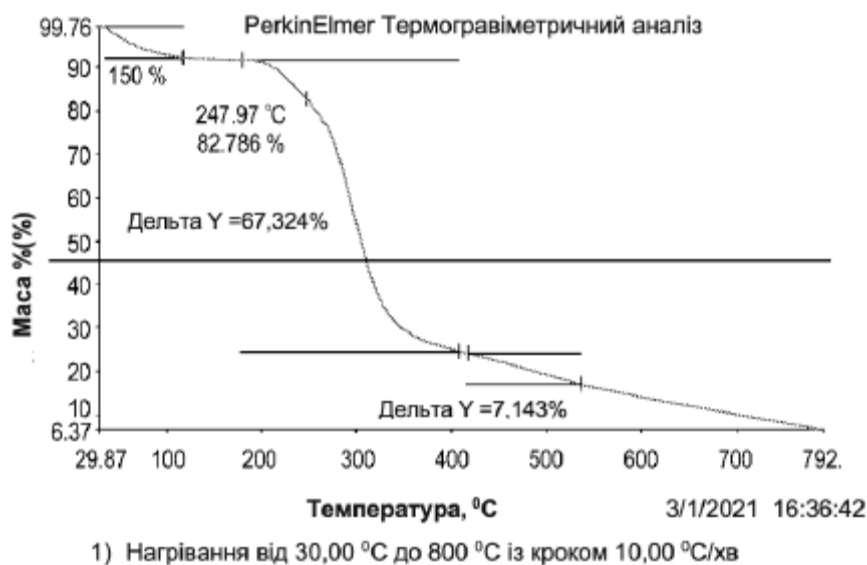


Fig. 8



Фіг. 9

Крива диференційної скануючої калориметрії



Фіг. 10

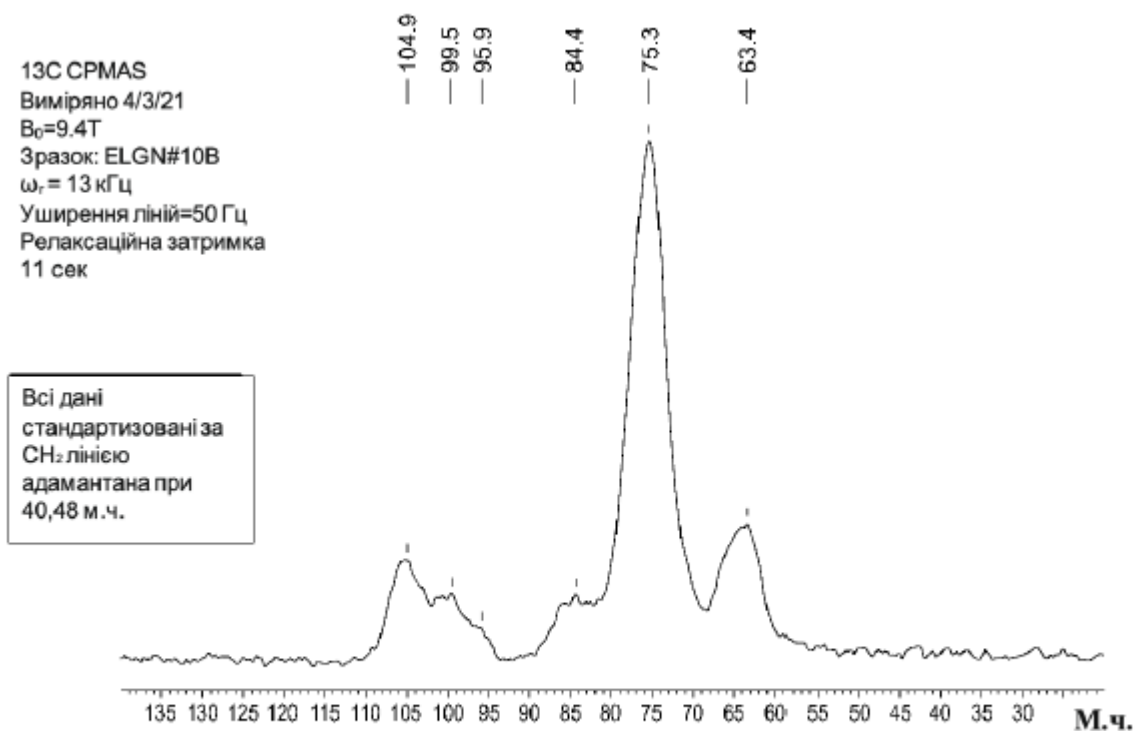


Fig. 11