

FORMULACIONES DE INSULINA Y MÉTODOS DE USO EN LACTANTES PREMATUROS

SOLICITUD RELACIONADA

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional de Estadounidense N° 63/173,442 presentada el 11 de abril de 2021, cuyo contenido se incorpora en la presente solicitud como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una formulación de insulina formulada para utilizarse en alimentación infantil. Las modalidades de la presente invención se refieren a métodos para preparar insulina y un alimento para bebés que los incluye y a métodos para utilizar el alimento para bebés que contiene insulina para prevenir o reducir la gravedad de trastornos infantiles prematuros tales como sepsis de aparición tardía o enterocolitis/colitis necrotizante.

Se conoce como nacimiento prematuro o pretérmino, cuando ocurre antes de la semana 37 del embarazo. Las últimas semanas en el útero son cruciales para un aumento de peso saludable y para el pleno desarrollo de varios órganos vitales.

La leche humana se reconoce como la alimentación óptima para todos los lactantes, incluyendo los prematuros, debido a sus beneficios comprobados para la salud de los lactantes.

La leche humana contiene una cantidad sustancial de hormonas y factores de crecimiento y los estudios han demostrado que algunas de dichas hormonas (por ejemplo, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina 1, IGF-1, factores de crecimiento epidérmico) poseen un efecto en el intestino delgado después de la administración oral.

Los estudios también han demostrado que la adición de insulina a las fórmulas para bebés prematuros da como resultado un mejor crecimiento y una maduración intestinal

acelerada [Shulman, RJ, 2002; Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition, 86(2), F131-F133].

Si bien las formulaciones de alimentos infantiles que contienen insulina se han descrito previamente, particularmente cuando los bebés nacen prematuramente, es posible que sus sistemas digestivos no estén completamente desarrollados y, como resultado, muchos de estos bebés prematuros experimentan dificultades y trastornos alimentarios que se relacionan directa o indirectamente con la desnutrición.

La sepsis de aparición tardía (LOS) es definida como la aparición de la sepsis después de las 72 h de vida, la cual es una de las principales causas de mortalidad en la unidad de cuidados intensivos neonatales. Las tasas de incidencia de LOS en recién nacidos prematuros varían entre el 20 y el 38% en los primeros 120 días de vida, y las tasas de mortalidad oscilan entre el 13 y el 19%.

La enterocolitis necrotizante (ECN) es una enfermedad que afecta principalmente al intestino de los bebés prematuros. La pared del intestino sufre invasión por bacterias, que causan infección local e inflamación que, en última instancia, pueden destruir la pared del intestino. Alrededor del 7% de los bebés prematuros desarrollan enterocolitis necrotizante y, entre los afectados alrededor del 25% muere.

Mientras se realiza en la práctica la presente invención, los presentes inventores han formulado una formulación de insulina que puede solubilizarse en un alimento para bebés (fórmula o leche materna) y han demostrado por primera vez que dicha formulación de alimento puede utilizarse para prevenir o reducir la gravedad de LOS y NEC.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

De conformidad con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar insulina para su uso en un alimento para bebés que comprende: solubilizar insulina en ácido clorhídrico para obtener insulina solubilizada; y diluir la insulina solubilizada con agua y ajustar el pH a 6.9-8.0.

De conformidad con modalidades de la presente invención, el método comprende además agregar ciclodextrina a la solución (b) para encapsular de ese modo la insulina en cavidades de ciclodextrina; y ajustar el pH a 6.9-8.0.

De conformidad con modalidades de la presente invención, el método comprende además combinar el resultado de (b) o (d) con una solución de cloruro de sodio y una solución de maltodextrina y ajustar el pH a 6.7-7.6.

De conformidad con modalidades de la presente invención, la composición se combina con una emulsión de nanogotitas de aceite en agua en la que las nanogotitas incluyen el ácido docosahexaenoico (DHA) y la coenzima Q10.

De conformidad con modalidades de la presente invención, el método comprende además filtrar el resultado de la combinación y liofilizar un filtrado para obtener un polvo amorfo con un pH de 6.0 a 7.6.

De conformidad con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir un alimento para bebés con insulina que comprende reconstituir el polvo amorfo descrito en la presente invención en el alimento para bebés.

De conformidad con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una formulación de insulina que comprende insulina, oligosacárido y cloruro de sodio en una proporción de 1:A:B (p:p:p respectivamente), en la que los rangos de A y B son 1000-100,000 y 10-50, respectivamente.

De conformidad con modalidades de la presente invención, la formulación de insulina tiene un pH de 6.0-7.6 cuando se reconstituye en agua desionizada o solución de cloruro de sodio al 0.9% a una concentración de 0.03 g/ml.

De conformidad con modalidades de la presente invención, la formulación de insulina comprende además ciclodextrina.

De conformidad con modalidades de la presente invención, la ciclodextrina está en una proporción de 10-1000 con respecto a la insulina.

De conformidad con modalidades de la presente invención, 1 gramo de la formulación de insulina incluye de 2 a 40 UI.

De conformidad con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un alimento para bebés que comprende la formulación de insulina.

De conformidad con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para prevenir la enterocolitis/colitis/enterocolitis necrotizante en un lactante prematuro que comprende administrar al lactante prematuro el alimento para lactantes.

De conformidad con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para reducir la prevalencia y gravedad de la enterocolitis/colitis/enterocolitis necrotizante en un lactante prematuro que comprende administrar al lactante prematuro el alimento para lactantes.

De conformidad con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para reducir la prevalencia de la sepsis de aparición tardía en un lactante prematuro que comprende administrar al lactante prematuro el alimento para lactantes.

De conformidad con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para reducir la inflamación en el sistema gastrointestinal en un bebé prematuro que comprende administrar al bebé prematuro el alimento para bebés.

De conformidad con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para reducir la prevalencia y gravedad de eventos adversos, eventos potencialmente mortales y complicaciones fatales en un bebé prematuro que comprende administrar al bebé prematuro el alimento para bebés.

De conformidad con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para reducir la permeabilidad del tracto gastrointestinal en un bebé prematuro que comprende administrar al bebé prematuro el alimento para bebés y medir la proporción de lactosa/lactulosa.

De conformidad con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para aumentar la maduración rápida del microbiota intestinal en un bebé prematuro que comprende administrar al bebé prematuro el alimento para bebés y medir una reducción de Proteobacterias y un aumento de Firmicutes y Clostridiaceae.

De conformidad con modalidades de la presente invención, el alimento para bebés incluye 0.01-4 UI/ml.

De conformidad con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para prevenir la sepsis de aparición tardía en un lactante prematuro que comprende administrar al lactante prematuro el alimento para lactantes.

De conformidad con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para reducir el tiempo de alta de la atención primaria de un bebé prematuro que comprende administrar al bebé prematuro el alimento para bebés descrito en la presente invención.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente invención tienen el mismo significado que entiende de forma común un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque en la práctica o prueba de la presente invención se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la descripción de la patente, incluidas las definiciones. Asimismo, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DIVERSAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

La invención de interés se describe sólo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos detallados, se enfatiza que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y para fines de discusión ilustrativa de las modalidades preferidas de la presente invención únicamente, y son presentados con la finalidad de proporcionar lo que se cree es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. Por lo anterior, no se hace ningún

intento de mostrar los detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención, la descripción presentada con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo las diversas formas de la invención pueden materializarse en la práctica.

En las figuras:

La figura. 1 es un cromatograma típico de las formulaciones I-IV de la presente invención.

La figura. 2 es un cromatograma típico de las formulaciones V-VI de la presente invención.

La figura. 3 es un cromatograma típico de DHA y coenzima Q10 en las formulaciones IV-V de la presente invención.

La Figura 4 ilustra la probabilidad de destete de la nutrición parenteral (NP) por grupo (curva de supervivencia de Kaplan-Meier).

La Figura 5 ilustra la ingesta promedio de PN por día por grupo, presentando un claro beneficio del grupo de tratamiento, especialmente para la formulación de insulina enteral a 0.3 UI/kg/día en comparación con placebo (que se muestra como la tasa de reducción de PN de la ingesta total).

La figura 6 ilustra el porcentaje de nutrición enteral sobre la nutrición total por grupo.

La figura 7 ilustra las trayectorias por grupo de la Figura 6.

La figura 8 es una micrografía electrónica de barrido que muestra la estructura amorfa de las formulaciones I-IV de la presente invención.

Las figuras 9-10 son gráficos que muestran análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) de formulaciones I-IV. de la presente invención.

Las figuras 11 es un espectro de RMN en estado sólido de la formulación I-IV de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención es una formulación de insulina que puede utilizarse en un alimento para bebés. Específicamente, la presente invención se puede usar para prevenir o reducir la gravedad de trastornos infantiles prematuros tales como sepsis de aparición tardía o enterocolitis/colitis/enterocolitis necrotizante.

Los principios y el funcionamiento de la presente invención se pueden entender mejor con referencia a los dibujos y las descripciones adjuntas.

Antes de explicar en detalle al menos una modalidad de la invención debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles establecidos en la siguiente descripción o ejemplificados por los ejemplos. La invención es susceptible de otras modalidades o de practicarse o llevarse a cabo de diversas maneras. Asimismo, debe entenderse que la fraseología y terminología empleadas en la presente invención tienen fines de descripción y no deben considerarse limitantes.

Los alimentos para lactantes que contienen insulina son conocidos en la técnica y se han sugerido para el tratamiento de la malabsorción en lactantes prematuros.

Mientras realizaban experimentos con diversas formulaciones de insulina destinadas a uso en alimentos infantiles tales como leche materna o fórmulas, los presentes inventores han observado que cuando se solubiliza en alimentos infantiles, la insulina muestra tendencia a polimerizarse y aglomerarse, reduciendo así la disponibilidad de insulina en el producto resultante en la fórmula de alimentación. Si bien la mezcla vigorosa del alimento para bebés puede resolver parcialmente dicho problema, los presentes inventores postularon que esta es una solución que no es óptima y se propusieron mejorar la solubilidad de la insulina en los alimentos para bebés.

Por lo anterior, se conformidad con un aspecto de la presente invención, se proporciona una formulación de insulina que se disuelve fácilmente en un alimento para bebés (por ejemplo, leche materna o fórmula) y muestra estabilidad (estructural y funcional) en el alimento sin aglomeración durante períodos de tiempo prolongados.

La presente preparación incluye insulina (por ejemplo, recombinante humana), un carbohidrato (por ejemplo, oligosacárido tal como maltodextrina) y cloruro de sodio en una proporción de 1:A:B (p:p:p respectivamente), en donde los rangos de A y B son 1,000-100,000 y 10-50, respectivamente. Un gramo de formulación de insulina puede incluir de 2 a 40 UI. La formulación de insulina puede incluir además ciclodextrina en una proporción de 10-1000 con respecto a la insulina. Con los estabilizadores, cargas y crioprotectores se utilizan hidratos de carbono como, por ejemplo, monosacáridos (por ejemplo, glucosa), disacáridos (por ejemplo, lactosa, maltosa), oligosacáridos (dextrinas (por ejemplo,

maltodextrina), ciclodextrinas (por ejemplo, hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HPbCD) y polisacáridos. También se pueden añadir a la composición agentes tampón (por ejemplo, sales de fosfato de sodio o potasio).

La formulación se puede combinar con una nanoemulsión de aceite en agua que tiene nanogotitas que incluyen ácido docosahexaenoico (DHA) y coenzima Q10.

La formulación puede estar en forma de polvo y cuando se reconstituye en agua desionizada o solución de cloruro de sodio al 0.9% a una concentración de 0.03 g/ml puede presentar un pH de 6.0-7.6.

Los presentes inventores han descubierto que el tratamiento previo de insulina a pH 6.9-8.0, la combinación con un carbohidrato a pH 6.7-7.6 y la liofilización, da como resultado un polvo de insulina amorfa (Figura 8) que es libremente soluble en la leche materna humana y, por lo tanto, supera los problemas antes mencionados en limitaciones de las formulaciones de insulina de la técnica anterior.

La presente formulación de insulina es un polvo amorfo en el que la insulina se incorpora en una estructura amorfa compuesta principalmente por una carga (por ejemplo, maltodextrina). El contenido de agua de la preparación puede ser del 6.5 % o menos, la osmolaridad es de aproximadamente 110-120 mosm/kg cuando se reconstituye en agua desionizada a una concentración de 0.1 g/ml y el pH es de 6.0-7.6 cuando se reconstituye en agua desionizada o 0.9 % de solución de cloruro de sodio a una concentración de 0.03 g/ml. En las Figuras 9-10 se muestran curvas de termograma típicas, obtenidas mediante análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). En la Figura 11 se proporciona el espectro de RMN en estado sólido de una formulación de la presente invención.

Como se menciona en la presente invención, la presente formulación de insulina se puede añadir en forma de polvo (o líquido) a un alimento infantil tal como, por ejemplo, leche humana.

La leche humana será leche materna o leche materna de donante fresca y homogeneizada.

Cuando está en forma de polvo, la presente formulación de insulina se puede reconstituir en un alimento para bebés hasta una concentración final de insulina de 0.1 a 8 UI/ml.

La presente formulación se puede envasar en forma de polvo y almacenar durante períodos de tiempo prolongados (días/meses).

El envase puede ser, por ejemplo, un vial de vidrio o una bolsita de aluminio llena con una forma seca de la presente formulación. El paquete puede incluir de 0.1 a 1.0 gramos de una forma en polvo de la formulación y cada gramo incluye de 0.2 a 40 UI de insulina. El espacio superior de la unidad de envasado puede ser aire o gas inerte (por ejemplo, nitrógeno).

El paquete puede proporcionar una barrera contra la humedad y/o el oxígeno con una tasa de transmisión de vapor de humedad (MVTR) de menos de aproximadamente $0.1 \text{ g/m}^2/24 \text{ h}$ y una tasa de transmisión de oxígeno (OTR) de menos de aproximadamente $0.1 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}$.

Cuando se envasa como se describe en la presente invención, la presente formulación es altamente estable y se puede almacenar durante períodos prolongados con una disminución de la actividad de la insulina en no más de aproximadamente 1-10 %, cuando se almacena entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C durante hasta 24 meses. Asimismo, el contenido de agua de la formulación envasada normalmente no es superior a aproximadamente 4.5-6.5 % en peso cuando se almacena entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C durante 24 meses.

La formulación de insulina se puede reconstituir en agua desionizada o solución de cloruro de sodio al 0.9 % y la solución resultante se puede agregar a un alimento infantil (leche propia de la madre, leche materna de donante, fórmula, etc.) para proporcionar la concentración de insulina descrita anteriormente para la formulación en polvo. formulación.

Como se describe en la presente invención y se demuestra en la sección de ejemplos, la presente formulación de insulina y el alimento que la contiene se pueden utilizar

para acelerar el destete de la nutrición parenteral en bebés prematuros y para reducir sustancialmente los eventos adversos en general, así como condiciones específicas de interés. incluyendo colitis necrotizante (ECN) y sepsis de aparición tardía (LOS).

Por lo tanto, de conformidad con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para prevenir o reducir el riesgo y la gravedad de LOS en un sujeto que lo necesita, tal como un bebé prematuro. El método se lleva a cabo administrando una cantidad terapéuticamente eficaz del alimento infantil mezclado con el fármaco de la presente invención al sujeto que lo necesita. Dicha administración puede ser oral o mediante sonda de alimentación.

Por tanto, de conformidad con otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para prevenir o reducir el riesgo y la gravedad de la ECN en un sujeto que lo necesita, tal como un bebé prematuro. El método se lleva a cabo administrando una cantidad terapéuticamente eficaz del alimento infantil mezclado con el fármaco de la presente invención al sujeto que lo necesita. Dicha administración puede ser oral o mediante sonda de alimentación.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" denota una dosis de un ingrediente activo o un alimento que comprende el ingrediente activo que proporcionará el efecto terapéutico para el cual está indicado el ingrediente activo.

Tal como se utiliza en la presente invención, la frase "sujeto que lo necesita" se refiere a un bebé humano. El bebé humano puede tener cualquier edad (por ejemplo, un bebé a término o prematuro) o de cualquier sexo. El sujeto necesitado puede ser un bebé prematuro nacido con una edad gestacional de 24 a 37 semanas o un bebé a término con bajo peso al nacer o un bebé con restricción de crecimiento intrauterino (RCIU) o un bebé pequeño para la edad gestacional.

Un régimen de dosis típico establecido por los presentes inventores se puede administrar mediante administración enteral continua o ingesta en bolo usando 0.1-1 g de polvo mezclado en 1-3 ml de alimento para bebés dividido en 1-12 administraciones orales al día, por ejemplo.

Como se describe en la sección de ejemplos, el presente régimen dio lugar a menos casos de ECN en el grupo de dosis de 0.3 UI/kg/día en comparación con el placebo; La enterocolitis necrotizante (estadio de Bell 2 o 3) se produjo en 7 lactantes (6%) en el grupo de dosis baja, 4 lactantes (5%) en el grupo de dosis alta y 10 lactantes (10%) en el grupo de placebo. Cuando se observa la población más frágil (estratos de edad gestacional de 26 a 28 semanas), la diferencia es aún más pronunciada: el 4.3% de los sujetos en el grupo de tratamiento tenían ECN frente al 19.6% en el grupo de placebo. Asimismo, existe una diferencia significativa entre los grupos en el porcentaje de lactantes que experimentaron infecciones (incluidas sepsis y otras infecciones).

Al observar a toda la población del estudio, la incidencia general fue del 30% en el grupo de dosis de 0.06 UI/kg/día, del 34.7% en el grupo de dosis de 0.3 UI/kg/día y del 42.9% en el grupo de Placebo.

Una evaluación simultánea de la permeabilidad intestinal y la actividad de la lactasa mediante la prueba de absorción de azúcar (SAT) realizada en otro estudio utilizando el presente régimen mostró una tendencia hacia una menor permeabilidad intestinal (lo que indica una rápida maduración del GI) y una mayor actividad de la lactasa en los grupos de tratamiento.

La eficacia del presente estudio también se demuestra por el tiempo hasta el alta (al domicilio o al sitio secundario) como lo demuestran los resultados mostrados en el Ejemplo 4. Como se muestra en el mismo, una reducción del tiempo hasta el alta de la atención primaria de un bebé prematuro es de al menos un 5% en comparación con un bebé prematuro no tratado (control). Lo anterior se traduce en un alta que se produce al menos 5 días antes de lo esperado.

Se realizó otro estudio destinado a evaluar la eficacia de 2 dosis de administración de insulina enteral en comparación con placebo con respecto a las diferencias tempranas en el microbiota intestinal. Dicho estudio mostró diferencias significativas en la microbiota gastrointestinal entre los grupos de tratamiento y placebo. Al final del tratamiento, las dosis altas de insulina mostraron menos diversidad microbiana que el placebo ($p=0.0192$). La insulina aumenta el filo Firmicutes y disminuye el filo Proteobacteria. La administración de insulina enteral tuvo una reducción de Proteobacterias y un aumento de Firmicutes y Clostridiaceae. Dichos resultados indican que la presente formulación y régimen facilitan la

rápida maduración del microbiota intestinal. La disminución de Proteobacterias y el aumento de Firmicutes obtenidos en este estudio son los cambios observados previamente en bebés de bajo riesgo de ECN.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "aproximadamente" se refiere al $\pm 10\%$.

Objetivos, ventajas y características novedosas adicionales de la presente invención resultarán evidentes para un experto en la técnica tras examinar los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos.

EJEMPLOS

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de forma no limitativa.

EJEMPLO 1

Formulaciones de insulina y alimentos infantiles.

Se prepararon y probaron formulaciones de insulina (en un alimento para bebés) para determinar su eficacia en el tratamiento de bebés prematuros.

Formulación I

Insulina como ingrediente activo, cloruro de sodio como agente solubilizante y oligosacárido como relleno y estabilizador (por ejemplo, maltodextrina). El producto terminado es un polvo liofilizado envasado en viales de vidrio. La concentración de la solución reconstituida está regulada por el volumen del diluyente.

tabla 1

Ingrediente	Contenido por unidad de dosis (vial)

Insulina humana recombinante (insulina rh)	0.04-0.05 mg (1-1.5 UI)
maltodextrina	100-500 mg
Cloruro de sodio	1.0-2.0 mg

Materiales y métodos

Se preparó una solución de insulina rh, 24.5 UI/ml, de la siguiente manera: se solubilizaron 13 mg de insulina en 1 ml de ácido clorhídrico 0.1 N, se diluyeron hasta 15 ml con agua y el pH se ajustó a 7.6 con hidróxido de sodio 0.1 N.

Composición de formulación:

Se disolvieron cuarenta gramos de maltodextrina en 100 ml de agua y el pH de la solución obtenida se ajustó a 7.2. Se añadieron 2 ml de solución de cloruro sódico al 6 % y 4 ml de solución de insulina a la mezcla de formulación y el pH se ajustó a 7.0.

La masa resultante se filtró por medio de una membrana de PES de 0.22 μ m, se introdujeron en viales de vidrio (volumen de llenado de 1.7 ml) y se liofilizaron.

Cada vial con polvo liofilizado contenía 1.25 UI de insulina rh, 510 mg de maltodextrina y 1.5 mg de cloruro de sodio.

Formulación II

Insulina como ingrediente activo, ciclodextrina como agente incapsulante (por ejemplo Hidroxipropil Beta-Ciclodextrina), cloruro de sodio como agente solubilizante y oligosacárido como relleno y estabilizador (por ejemplo Maltodextrina). El producto terminado es un polvo liofilizado envasado en viales de vidrio. La concentración de la solución reconstituida está regulada por el volumen del diluyente.

Tabla 2

Ingrediente	Contenido por unidad de dosis (vial)
-------------	---

Insulina humana recombinante (insulina rh)	0.04-0.05 mg (1-1.5 UI)
Hidroxipropil beta-ciclodextrina	2,0 mg
maltodextrina	100 mg
Cloruro de sodio	1.0 mg

Materiales y métodos

Se preparó una solución de insulina rh, 62 UI/ml, de la siguiente manera: se solubilizaron 85.6 mg de insulina en 5 ml de ácido clorhídrico 0.1 N, se diluyeron con 30 ml de agua y el pH se ajustó a 7.2 con hidróxido de sodio 0.1 N.

Composición de formulación:

Se disolvieron doscientos gramos de maltodextrina en 600 g de agua y el pH de la solución obtenida se ajustó a 7.3. Se añadieron 2 g de cloruro de sodio, predisoluidos en 60 ml de agua, y solución de insulina a la mezcla de formulación, se ajustó el pH a 7.0 y se añadió una porción adicional de agua para completar el volumen total a 1 litro.

La masa resultante se filtró a través de una membrana de PES de 0.22 μ m, se introdujeron en viales de vidrio (volumen de llenado de 0.5 ml) y se liofilizaron.

Cada vial con polvo liofilizado contenía 1.2 UI de insulina rh, 100 mg de maltodextrina y 1.0 mg de cloruro de sodio.

Formulación III

Se preparó una solución de insulina rh, 243 UI/ml, de la siguiente manera: se solubilizaron 84.4 mg de insulina en 1 ml de ácido clorhídrico 0.1 N, se diluyeron hasta 10 ml con agua y el pH se ajustó a 8.1 con hidróxido de sodio 0.1 N.

Composición de formulación:

Se disolvieron treinta gramos de maltodextrina en 60 ml de agua y el pH de la solución obtenida se ajustó a 7.1. Se añadieron 2.7 ml de solución de cloruro sódico al 7.5 % y 1 ml de solución de insulina a la mezcla de formulación, se ajustó el pH a 7.3 y se añadió una porción adicional de agua para completar el peso a granel a 100 g.

La masa resultante se filtró por medio de una membrana de PES de 0.22 μm , se introdujeron en viales de vidrio (volumen de llenado de 0.5 ml) y se liofilizaron.

Cada vial con polvo liofilizado contenía 1.4 UI de insulina rh, 172 mg de maltodextrina y 1.2 mg de cloruro de sodio.

Formulación IV

El presente ejemplo describe la formulación producida a escala comercial de 9 kg del líquido a granel (0.9 kg del polvo liofilizado). Insulina como ingrediente activo, cloruro de sodio como agente solubilizante y oligosacárido como relleno y estabilizador (por ejemplo, maltodextrina). El producto terminado es un polvo liofilizado envasado en viales de vidrio. La concentración de la solución reconstituida está regulada por el volumen del diluyente.

Tabla 3

Ingrediente	Contenido por unidad de dosis (vial)
Insulina humana recombinante (insulina rh)	0.035 mg (1 UI)
maltodextrina	99 mg
Cloruro de sodio	1 mg
Peso total	100 mg

Materiales y métodos

Se preparó una solución de insulina rh, 33 UI/ml, de la siguiente manera: se solubilizaron 0.39 g de insulina en 20 g de ácido clorhídrico 0.1 N, se diluyeron con 300 g de agua para inyección y luego se neutralizaron con 20 g de hidróxido de sodio 0.1 N. El pH se ajustó a 7.2 con hidróxido de sodio 0.1 N.

Composición de formulación:

Se disolvieron 856 gramos de maltodextrina y 8.6 gramos de cloruro de sodio en 6854 gramos de agua y el pH de la solución obtenida se ajustó a 7.2. La solución de insulina se añadió a la mezcla de composición, el peso de la formulación resultante se ajustó hasta 9.0 kg y el pH se ajustó a 7.0.

La masa resultante se filtró a través de una membrana de PES de 0.22 μ m, se introdujeron en viales de vidrio (volumen de llenado 1 g) y se liofilizaron.

Cada vial con polvo liofilizado contenía 1 UI de insulina rh, 99 mg de maltodextrina y 1 mg de cloruro de sodio.

Las características analíticas del polvo seco obtenido son:

el contenido de insulina (insulina + insulina desamido A21) es 1.13 UI/vial, el contenido de insulina desamido A21 es 0.5 % (por porcentaje de área), el contenido de otras sustancias relacionadas totales es 0.1 % (por porcentaje de área), la desviación estándar relativa del contenido de insulina por vial (uniformidad) es del 0.9 %, el contenido de agua es del 0.8 %, el pH es de 6.7 y el tiempo de reconstitución del polvo en agua es inferior a 5 minutos.

Formulación V

Esta formulación se produjo formando una emulsión de DHA y coenzima Q10 usando un método de desplazamiento de solvente, agregando insulina rh y crioprotector (por ejemplo, dextrinas, ciclodextrinas), filtrando y liofilizando.

Tabla 4

Ingrediente	Contenido por unidad de dosis (vial)
Insulina humana recombinante (insulina rh)	0.04 mg (1.2 UI)

Ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (DHA)	2.5 mg
Coenzima Q10 (CoQ10)	1.1 mg
tiloxapol	0.5 mg
Lipoide E 80	0.5 mg
Alcohol polivinílico (PVA)	0.5 mg
maltodextrina	33mg
Hidróxido de sodio*	-
Ácido clorhídrico*	-

*El hidróxido de sodio o el ácido clorhídrico se utilizan para ajustar el valor del pH y no se incluyen en la suma.

Materiales y métodos

Se preparó una solución de insulina rh, 40 UI/ml, de la siguiente manera: se solubilizaron 27.5 mg de insulina en 2 ml de ácido clorhídrico 0.1 N, se diluyeron con 18 ml de agua y el pH se ajustó a 7.2 con hidróxido de sodio 0.1 N.

Se preparó una nanoemulsión de aceite en agua (tamaño promedio de gota de 120 nm) de la siguiente manera: se disolvieron 690 mg de coenzima Q10, 1533 mg de éster etílico de DHA, 300 mg de tiloxapol y 300 mg de lipoide E80 en 56 ml de etanol. La mezcla se añadió gota a gota a través de una aguja 21G a 300 ml de una solución acuosa de PVA al 0.1 % mezclada continuamente a 350 RPM a temperatura ambiente. La emulsión resultante se mezcló durante 10 minutos más, se diluyó con una solución de PVA al 0.1 % y los disolventes orgánicos se eliminaron mediante filtración de flujo tangencial usando Hydrosart, membrana MWCO 30.000.

Se disolvieron diez gramos de maltodextrina en 160 ml de la emulsión obtenida y luego se mezclaron con solución de insulina. El volumen de la masa final se completó hasta 300 ml y el pH se ajustó a 6.9. La emulsión se filtró por medio de una membrana de PES de 0.22 μ m, se llenó en viales de vidrio (volumen de llenado 1 ml/vial) y se liofilizó. Cada vial contiene 1.2 UI de insulina rh, 2.5 mg de DHA y 1.1 mg de coenzima Q10. El tamaño medio de las partículas de gotitas en el polvo reconstituido es de 295 nm.

Formulación VI

Los pasos de formulación son idénticos a los de la formulación V.

Tabla 5

Ingrediente	Contenido por unidad de dosis (vial)
Insulina humana recombinante (insulina rh)	0.04 mg (1.2 UI)
Ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosaheptaenoico (DHA)	2.3 mg
Coenzima Q10 (CoQ10)	1.1 mg
tiloxapol	0.5 mg
Lipoide E 80	0.5 mg
Alcohol polivinílico (PVA)	0.5 mg
Hidroxipropil beta ciclodextrina	30 mg
Hidróxido de sodio*	-
Ácido clorhídrico*	-

*El hidróxido de sodio o el ácido clorhídrico se utilizan para ajustar el valor del pH y no se incluyen en la suma.

Materiales y métodos

Se preparó una solución de insulina rh, 40 UI/ml, de la siguiente manera: se solubilizaron 27,2 mg de insulina en 2 ml de ácido clorhídrico 0.1 N, se diluyeron con 18 ml de agua y el pH se ajustó a 7.2 con hidróxido de sodio 0.1 N.

Se preparó una nanoemulsión de aceite en agua (tamaño promedio de gota de 120 nm) como se describe para la formulación IV.

Se disolvieron diez gramos de hidroxipropil beta ciclodextrina en 160 ml de la emulsión obtenida y luego se mezclaron con solución de insulina. El volumen de la masa final se completó hasta 327 ml y el pH se ajustó a 6.9. La emulsión se filtró a través de una membrana de PES de 0.22 μ m, se llenó en viales de vidrio (volumen de llenado 1 ml/vial) y

se liofilizó. Cada vial contiene 1.2 UI de insulina rh, 2.5 mg de DHA y 1.1 mg de coenzima Q10. El tamaño medio de las partículas de gotitas en el polvo reconstituido es de 143 nm.

EJEMPLO 2

Pruebas de formulaciones I-IV

El contenido de insulina rh se determinó mediante el método de cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa en una columna Hypersil Gold-C18 (3x50 mm, 3 µm) y elución en gradiente con una fase móvil compuesta de fases acuosa y orgánica (acetonitrilo) acidificada con trifluoroacético al 0.1%. ácido (TFA). Caudal: 0.3 ml/min, detección UV a 205 nm. En la Figura 1 se muestra un cromatograma típico de las formulaciones I-IV.

Pruebas de formulaciones V-VI.

El contenido de insulina rh, DHA y Coenzima Q10 se determinó mediante el método de cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa en columna Hypersil Gold-C18 (3x50 mm, 3 µm) y elución en gradiente con una fase móvil compuesta de fases acuosa y orgánica (mezcla de acetonitrilo: metanol : 2-propanol 75:15:10) acidificado con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1%. Caudal: 0.6 ml/min, detección UV a 205 nm para insulina y 214 nm para DHA y coenzima Q10. En la Figura 2 se muestra un cromatograma típico de las formulaciones V-VI. En la Figura 3 se muestra un cromatograma típico de la determinación de DHA y coenzima Q10 en las formulaciones V-VI.

EJEMPLO 3

Solubilidad del alimento infantil

Se diseñó un estudio para evaluar la solubilidad de la presente formulación en un rango de pH de la leche materna humana. Se prepararon tres muestras secas que contenían maltodextrina, cloruro de sodio e insulina (1 UI) de la siguiente manera.

La muestra 1 es un polvo cristalino secado térmicamente, preparado pulverizando una solución de maltodextrina, cloruro de sodio e insulina sobre partículas sólidas de

maltodextrina y posterior secado a 35°C. El polvo seco se mezcló 1:3 con maltodextrina, el pH final fue 6.3.

La muestra 2 es una variante de la presente formulación, presentada como un polvo amorfo, a pH 7.0, preparada como se describe en el Ejemplo 1, Formulaciones I-III.

La muestra 3 es una mezcla física de ingredientes secos (maltodextrina, cloruro de sodio e insulina), mezclados en seco sin ningún tratamiento previo.

Se reconstituyó una cierta cantidad de cada formulación (equivalente a 1 UI de insulina) en 1.8 ml de tampón fosfato 0.1 M a pH 6.3, 6.7 y 7.2 y se examinó visualmente.

Los resultados muestran que la Muestra 2 (la presente formulación) se disuelve libremente en el amplio rango de pH de la leche materna (6.3-7.2), lo que da como resultado una solución transparente comparable al tampón de referencia. La Muestra 1 (formulación seca térmicamente) y la Muestra 3 (mezcla física de ingredientes secos, sin tratamiento previo) fueron parcialmente solubles en el rango de pH probado, lo que dio como resultado una solución turbia.

El perfil de disolución de las muestras de prueba se evaluó mediante HPLC en los siguientes medios:

HCl 0.01 N, agua doblemente desionizada y tampón fosfato 0.1 M a pH 6.3 y 7.4.

Para cada muestra, se calculó el porcentaje de disolución en agua y tampón fosfato con respecto a la cantidad de insulina determinada en HCl 0.01 N. Los resultados de disolución obtenidos (Tabla 6 a continuación) indican que la presente composición es altamente soluble en el rango de pH de la fórmula infantil.

Tabla 6

	% Disolución de la insulina		
	Muestra 1 (secado térmico)	Muestra 2- presente formulación (liofilización)	Muestra 3 (mezcla física de ingredientes secos, sin
Medio de disolución			

			tratamiento previo)
HCl 0.01N	100.0%	100.0%	100%
Agua doblemente desionizada	84.0%	93.1%	68.1%
Tampón de fosfato 0.1 M, pH 6.3	78.9%	93.3%	81.8%
Tampón de fosfato 0.1 M, pH 7.4	84.3%	93.6%	95.0%

Además, las muestras 1 y 2 se reconstituyeron en leche de vaca (pH 6.89, contenido de grasa 3%). Los resultados fueron consistentes con las observaciones de la prueba de recuperación del tampón. La muestra 1 se reconstituye parcialmente en leche, lo que da como resultado coágulos visibles que pueden adherirse o bloquear el paso del fármaco reconstituido a través de la sonda nasogástrica. La muestra 2 se reconstituye completamente en leche, dando como resultado una mezcla homogénea.

EJEMPLO 4

Estudio sobre bebés prematuros: eficacia

Se diseñó un estudio para evaluar la eficacia y seguridad de una formulación enteral de insulina rh en bebés prematuros. Siguiendo los procedimientos de detección, los bebés elegibles nacidos entre 26 y 32 semanas de embarazo y que pesaran al menos 500 g al nacer debían ser asignados aleatoriamente a 1 de los 3 grupos de tratamiento en una proporción de 1:1:1.

El tratamiento comenzó a la edad posnatal de al menos 6 horas hasta las 120 horas posteriores al nacimiento inclusive. El período de tratamiento para los lactantes alimentados únicamente con leche materna (OMM) comenzó dentro de las primeras 72 horas posteriores al nacimiento.

El período de tratamiento se definió como el primer día de administración (día 1) durante un máximo de 28 días o hasta el alta del hospital primario, si antes del día 28.

La formulación probada se administró a 0.3 UI/kg/día durante un máximo de 28 días. Antes de la administración, el polvo se reconstituyó principalmente en leche materna humana, leche materna de donante, solución salina o media solución salina.

Resultados

Los bebés fueron dados de alta a su domicilio o al sitio secundario desde el hospital primario. Al analizar el tiempo hasta el alta, se presentan dos análisis: 1) análisis del alta del hospital de reclutamiento primario (comparaciones separadas de sujetos transferidos al hospital secundario y sujetos dados de alta a casa); y 2) alta al domicilio (ya sea desde el hospital primario o secundario).

Tiempo hasta el alta del hospital primario

Los bebés fueron dados de alta del hospital primario a su domicilio o a un hospital secundario, dependiendo principalmente de la región. Cada bebé en el análisis ITT tenía un destino de análisis, mediante el cual se compararon cada brazo y estrato. Ambos brazos de tratamiento tuvieron un tiempo significativamente más corto hasta el alta en comparación con el placebo, lo que demuestra un tiempo más rápido para lograr un bienestar estable.

La mediana del número de días hasta el alta hospitalaria (al domicilio o al hospital secundario) fue más baja en el grupo de formulación de insulina que comprendía 0.3 UI/kg [mediana = 42.0 días, $P = 0.055$], seguido por la formulación de insulina que comprendía 0.0406 UI/kg grupo [mediana=43.0 días, $p=0.04^*$] en comparación con placebo [mediana= 49.5 días].

Tiempo para el alta a un sitio secundario

Algunos hospitales dan de alta a los bebés a sitios secundarios después de que se estabilizan y ya no se encuentran en una condición que ponga en peligro su vida. Los bebés son dados de alta a sitios secundarios y, varias semanas después, a casa. En el ensayo, los sujetos del grupo de formulación de insulina que comprendía 0.3 UI/kg fueron dados de alta antes que los pacientes del grupo de placebo a un sitio secundario, como lo indican las medianas y la diferencia con respecto al placebo (Tabla 7 a continuación).

Tabla 7: Número de días hasta el alta del hospital primario a un sitio secundario por edad de gestación: conjunto de análisis completo

Grupo de edad de gestación	Estadística	Tratamiento		
		Formulación enteral de insulina rh 0.06 UI/kg/día (N=108)	Formulación enteral de insulina rh 0.3 UI/kg/día (N=94)	Placebo (N=98)
26 - 28 semanas	norte	14	dieciséis	14
	Mediana	34.0	31.5	39.0
	Diferencia con placebo	3.5	5.3	-
29 - 32 semanas	Norte	8	5	12
	Mediana	22.0	11.0	23.0
	Diferencia con placebo	-2.3	9.0	-

Hora de darle el alta a casa

Otro tipo de análisis realizado evaluó el tiempo hasta el alta a casa de todos los bebés, independientemente de si el alta fue directamente del hospital primario o siguió un sitio/unidad secundaria. Dicho análisis mostró una tendencia similar en la reducción del tiempo hasta el alta; sin embargo, mostró una variabilidad mucho mayor en comparación con el análisis principal "alta del hospital primario".

En relación con el placebo, el tratamiento con una formulación de insulina que comprende $0.06 \pm \text{UI/kg}$ dio como resultado significativamente menos días hasta el alta a domicilio [mediana = 48.0 días frente a mediana = 60.0 días en placebo, $P = 0.025^*$]. El tratamiento con una formulación de insulina que comprende 0.3 UI/Kg resultó en una mediana de 55.0 días hasta el alta a domicilio [$p=0.27$ versus placebo].

Al analizar ambos brazos de tratamiento juntos, el alta de los grupos de tratamiento fue más temprana [mediana=52 días, $p=0.046^*$] en comparación con el placebo [mediana=60 días].

Hora de suspender la NP

Se observó una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo transcurrido hasta el retiro de la nutrición parenteral (NP) en el grupo alimentado con un alimento suplementado con insulina en una concentración de 0.3 UI/kg/día en comparación con el grupo placebo (6 frente a 8 días, $p=0.0096^{**}$).

Al evaluar el tiempo hasta la interrupción de la NP por grupo de edad de gestación, en la población de mayor edad (29 a 32 semanas), el tiempo hasta la interrupción de la NP también fue más corto en el grupo de 0.3 UI/kg/día (4 frente a 6 días). Los resultados se resumen en las Tablas 8 a 10 a continuación y se presentan gráficamente en la Figura 4, que muestra la probabilidad de interrupción de la NP por grupo (curva de supervivencia de Kaplan-Meier).

Tabla 8: Resumen del análisis del número de días hasta la interrupción de la NP: conjunto de análisis completo				
Grupo de edad de gestación	Estadísticas	Formulación enteral de insulina rh 0.06 UI/kg/día (N=108)	Formulación enteral de insulina rh 0.3 UI/kg/día (N=94)	Placebo (N=98)
Todo	norte (%)	107	92	97
	Mediana	7.0	6.0	8.0

Tabla 9: Resumen del análisis del número de días hasta la interrupción de la NP: conjunto de análisis completo		
Grupo de edad de gestación	Comparación de tratamientos	Valor p de la prueba estratificada de Van Elteren
Todo	Formulación enteral de insulina rh 0.06 UI/kg/día (N = 107) frente a placebo (N= 97)	0.48
	Formulación enteral de insulina rh 0.3 UI/kg/día (N = 92) frente a placebo (N = 97)	0.0096**
Nota: factor de estratificación: grupo de edad de gestación (26-28 semanas, 29-32 semanas)		

Tabla 10: Resumen del análisis del número de días hasta el destete de la NP por edad de gestación: conjunto de análisis completo				
Grupo de edad de gestación	Estadísticas	Formulación enteral de insulina rh 0.06 UI/kg/día (N=108)	Formulación enteral de insulina rh 0.3 UI/kg/día (N=94)	Placebo (N=98)
26-28 semanas	norte	48	59	51
	Mediana	9.0	9.0	9.0
29 - 32 semanas	norte	59	47	46
	Mediana	6.0	4.0	6.0

Otro criterio de valoración importante para este estudio es el porcentaje de PN de la ingesta total del lactante, así como la reducción gradual del porcentaje de ingesta de PN a lo largo del tiempo.

La Figura 5 muestra la ingesta promedio de NP por día por grupo, presentando un claro beneficio del grupo de tratamiento, especialmente la formulación enteral de insulina rh 0.3 UI/kg/día en comparación con el placebo en la tasa de reducción de NP de la ingesta total.

La Figura 6 presenta el porcentaje de nutrición enteral sobre la nutrición total por grupo, mientras que la Figura 7 presenta las Trayectorias por grupo.

EJEMPLO 5

Estudio de bebés prematuros: NEC y LOS

También se observó la población de estudio para detectar eventos adversos como colitis necrotizante (ECN) y sepsis de aparición tardía (LOS).

Colitis Necrosante (ECN)

Hubo una diferencia significativa entre los grupos en el porcentaje de bebés que experimentaron ECN. Al observar a toda la población del estudio, la incidencia general fue del 6.3 % en el grupo de dosis de 0.06 UI/kg/día , del 4.3 % en el grupo de dosis de 0.3 UI/kg/día y del 10.2 % en el grupo de placebo, lo que resultó en un 60 % menos de casos de ECN en los 0,3UI/kg/día grupo de dosis en comparación con placebo.

Al observar la población de estudio más joven (26-28 semanas de edad gestacional), donde la ECN es más prevalente, las diferencias se vuelven aún más evidentes: 12.2 % en el grupo de dosis de 0.06 UI/kg/día , 4.3 % en el grupo de dosis de 0.3 UI/kg/día y 19.6 % en el grupo de placebo, lo que resultó en casi un 80 % menos de casos de ECN en el grupo de dosis de 0.3 UI/kg/día en comparación con el grupo de placebo.

Se realizó un análisis estadístico que comparó tanto la incidencia como la gravedad de la ECN, utilizando un método no paramétrico de Kruskal-Wallis, y mostró una diferencia estadística significativa en el grupo de 26-28 GA ($p=0.077$). Los resultados de este estudio se presentan en las Tablas 11 y 12 a continuación.

Tabla 11 - Distribución de incidencia de ECN x gravedad por grupo en toda la población

Grado NEC CTCAE	1	2	3	4	5	Total %
RH ENTERAL - FORMULACIÓN DE INSULINA 0.06 UI/kg/día (N=110)						
Número de casos	0	3	1	1	2	7
%	0.0%	2.7%	0.9%	0.9%	1.8%	6.3%

RH ENTERAL - FORMULACIÓN DE INSULINA 0.3 UI/kg/día (N=95)						
Número de casos	0	0	2	1	1	4
%	0.0%	0.0%	2.1%	1.1%	1.1%	4.3%
Placebo (N=98)						
Número de casos	0	1	3	2	4	10
%	0.0%	1.0%	3.1%	2.0%	4.1%	10.2%

Tabla 12 - Distribución de incidencia de ECN X gravedad por grupo (26-28 semanas GA)

Grado NEC CTCAE	1	2	3	4	5	Total %
RH ENTERAL - FORMULACIÓN DE INSULINA 0.06 UI/kg/día (N=49)						
Número de casos	0	3	0	1	2	6
%	0.0%	6.1%	0.0%	2,0%	4,0%	12.2%
RH ENTERAL - FORMULACIÓN DE INSULINA 0.3 UI/kg/día (N=46)						
Número de casos	0	0	0	1	1	2
%	0.0%	0.0%	0.0%	2.1%	2.1%	4.3%
Placebo (N=51)						
Número de casos	0	1	3	2	4	10
%	0.0%	1.9%	5.8%	3.9%	7.8%	19.6%

Se calcularon y compararon entre grupos los malos resultados compuestos de aparición de una de las infecciones, ECN y muerte y se muestran en la Tabla 13 a continuación .

Tabla 13

Categoría	Formulación enteral de insulina rh 0.06 UI/kg/día (N=110)	Formulación enteral de insulina rh 0.3 UI/kg/día (N=95)	Placebo (N=98)
Total de sujetos con infecciones n (%)	33 (30.0)	33 (34.7)	42 (42.9)
Total de sujetos con ECN n (%)	7 (6.4)	4 (4.2)	9 (9.2)
Total de sujetos experimentaron la muerte n (%)	5 (4.5)	1 (1.1)	4 (4.1)
Total sujetos con algún evento n (%)	38 (34.5)	34 (35.8)	49 (50.0)

Se encontró que los grupos de tratamiento tenían un porcentaje significativamente menor de sujetos que experimentaron uno de estos eventos adversos de interés. Las tasas fueron del 34.5 % en la formulación de insulina Rh enteral. grupo de dosis de 0.06 UI/kg/día , 35.8 % en el grupo de dosis de formulación de insulina Rh enteral de 0.3 UI/kg/día y 50 % en el grupo de placebo. Al realizar una comparación por pares de proporciones: diferencia entre formulación de insulina Rh enteral 0.06UI/kg/día a Placebo $p=0.034$, diferencia entre formulación de insulina Rh enteral 0.3 UI/kg/día frente a placebo $p=0.065$ (ver Tabla 14 a continuación).

<i>Tabla 14 - Resumen del análisis - comparación por pares de proporciones del compuesto de seguridad</i>		
Grupo de edad de gestación	Comparación	Prueba de independencia chi-cuadrado Valor de p de prueba-
Todo	RH ENTERAL: FORMULACIÓN DE INSULINA 0.06 UI/kg/día (N =110) frente a placebo (N=98)	0.034*
	RH ENTERAL: FORMULACIÓN DE INSULINA 0.3 UI/kg/día (N =95) frente a placebo (N=98)	0.065

Sepsis de aparición tardía (LOS)

Existió una diferencia significativa entre los grupos en el porcentaje de lactantes que experimentaron infecciones (incluidas sepsis y otras infecciones). Al observar a toda la

población del estudio, la incidencia general fue del 30% en el grupo de dosis de 0.06 UI/kg/día , del 34.7% en el grupo de dosis de 0.3 UI/kg/día y del 42.9% en el grupo de Placebo.

Específicamente, al medir la tasa de sepsis comprobada clínica o mediante cultivo, los grupos de tratamiento tuvieron tasas más bajas en comparación con el placebo. La incidencia fue del 12% en el grupo de dosis de 0.06 UI/kg/día , del 11 % en el grupo de dosis de 0.3 UI/kg/día y del 15 % en el grupo de placebo (reducción de casi un 30 % en la incidencia de sepsis de aparición tardía).

Se aprecia que ciertas características de la invención, que, para mayor claridad, se describen en el contexto de modalidades separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única modalidad. Por el contrario, diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una única modalidad, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

Aunque la invención se ha descrito junto con modalidades específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Consecuentemente, se pretende abarcar todas las alternativas, modificaciones y variaciones que caigan dentro del espíritu y amplio alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Es la intención del solicitante que todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente a las que se hace referencia en esta especificación se incorporen en su totalidad mediante referencia a la especificación, como si cada publicación, patente o solicitud de patente individual fuera específica e individualmente. cuando se hace referencia, se indica que se incorporará aquí como referencia. Asimismo, la cita o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no se interpretará como una admisión de que dicha referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención. En la medida en que se utilicen títulos de sección, no deben interpretarse como necesariamente limitativos. Asimismo, cualquier documento de prioridad de la presente solicitud se incorpora como referencia en su totalidad.