

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 003 286**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/15** (2006.01)  
**A23L 33/10** (2006.01)  
**A23C 9/20** (2006.01)  
**A61K 31/525** (2006.01)  
**A61K 31/7004** (2006.01)  
**A61K 35/744** (2015.01)  
**A61K 35/745** (2015.01)  
**A61K 35/747** (2015.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2015** **E 20169772 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2024** **EP 3718418**

54 Título: **Vitamina B2 y mioinositol para el tratamiento y la prevención de la diabetes gestacional**

30 Prioridad:

**08.08.2014 EP 14180396**  
**08.08.2014 EP 14180401**  
**08.08.2014 EP 14180403**  
**05.06.2015 EP 15170911**  
**05.06.2015 EP 15170915**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.03.2025**

73 Titular/es:

**SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.00%)**  
**Avenue Nestlé 55**  
**1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**SILVA ZOLEZZI, IRMA;**  
**MACE, CATHERINE;**  
**GODFREY, KEITH MALCOLM;**  
**BAKER, PHILIP NEWTON y**  
**CHONG, YAP SENG**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 3 003 286 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Vitamina B2 y mioinositol para el tratamiento y la prevención de la diabetes gestacional

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición de nutrición materna que comprende mioinositol y vitamina B2. Dicha composición se ha diseñado específicamente para proporcionar una nutrición óptima a una mujer que desee la gestación, a una mujer gestante y/o a una mujer en período de lactancia. La presente invención también se refiere al uso de la vitamina B2, o de una composición que comprende vitamina B2, para tratar o prevenir la diabetes *mellitus* (o diabetes sacarina) gestacional y afecciones asociadas con esta en una gestante y/o en su descendencia.

Antecedentes de la invención

15 Las pruebas científicas acumuladas muestran que la nutrición temprana prenatal y postnatal, y otros factores ambientales, permiten programar la salud y el bienestar a largo plazo, y pueden tener impacto sobre el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas. Diversos estudios han demostrado que, los cambios en la ingesta alimenticia o la manipulación individual de macro y micronutrientes durante el período reproductor pueden tener un impacto en diversos procesos fisiológicos, tales como el crecimiento, el metabolismo, el apetito, la función cardiovascular, entre otros (Koletzko B et al (2011) Am J Nutr 94(s):2036-43S). Por lo tanto, el estado nutricional (reservas de nutrientes e ingesta alimenticia) de las mujeres antes y durante el embarazo es de relevancia para optimizar los resultados de la salud neonatal e infantil. Se considera que la nutrición materna afecta a la disponibilidad y al suministro de nutrientes al feto en desarrollo, que son necesarios para los procesos críticos del desarrollo. El estado nutricional de la mujer antes de la gestación también tiene un impacto sobre su salud y bienestar, así como sobre la salud, el crecimiento y el bienestar de su bebé. Por ejemplo, la deficiencia de micronutrientes tiene graves efectos y, frecuentemente, persistentes, en los tejidos y órganos fetales, incluso en ausencia de signos clínicos de su deficiencia en la madre (Ashworth CJ et al (2001) 122:527-35). La ingesta inadecuada de muchos micronutrientes es común entre las mujeres en edad reproductora que viven en entornos de escasos recursos (Torheim LE et al. (2010) J. Nutr. 140 2051S-58S). El estado nutricional de la mujer en período de lactancia después del parto también repercute en su salud y bienestar, así como en la salud, el crecimiento y el bienestar de su bebé.

Ya se ha utilizado una gran variedad de nutrientes en composiciones para la administración materna y se han desarrollado diversas composiciones nutritivas para responder a las necesidades de la nutrición materna. Estas suelen contener mezclas de vitaminas y minerales. El papel protector del mioinositol en la embriopatía diabética se ha descrito, por ejemplo, en Baker L, Piddington R; J. Diab. Comp. 1993; 7: 204-212 (XP026277613). El uso de bacterias probióticas en la fabricación de complementos nutritivos o alimentos dietéticos, especiales para mujeres embarazadas, se ha propuesto, por ejemplo, en el documento US 2014/127166 A1. Sin embargo seguiría siendo útil centrarse específicamente en las deficiencias nutritivas de esta población específica seleccionando los nutrientes más útiles para estas mujeres, tal como para proporcionar composiciones adaptadas a las necesidades nutritivas de las mujeres en el período reproductor para optimizar la nutrición prenatal y postnatal de las madres, en beneficio de la madre y de su bebé. Los inventores también han descubierto que, sorprendentemente, la vitamina B2 puede usarse para mejorar la captación de glucosa en células de mamíferos, particularmente en miocitos (células musculares) de mamífero. En consecuencia, la administración de vitamina B2 a una mujer antes y/o durante la gestación, puede prevenir y/o tratar la DMG y/o prevenir una afección asociada a la DMG en una mujer gestante o en su descendencia. Los inventores también han descubierto que cuando a las ratonas db/db heterocigotas se les administra una dosis complementaria de vitamina B2 durante la gestación, tienen una menor concentración de glucosa en ayunas en comparación con las ratonas a las que no se les administra una dosis complementaria. Adicionalmente, los inventores han descubierto que las ratonas que reciben una administración de mioinositol junto con vitamina B2 complementaria tienen una concentración sorprendentemente baja de glucosa en ayunas durante la gestación y antes de la gestación.

Además, se descubrió que la complementación con B2 producía un aumento más bajo del % glucosa durante los 30 primeros minutos de la PTGO (prueba de tolerancia a la glucosa oral), y que cuando la B2 se combinaba con mioinositol, el aumento del % de glucosa era incluso más bajo.

Además de lo anterior, los inventores han descubierto que cuando a las ratonas db/db heterocigotas se les administra mioinositol junto con vitamina B2 complementaria durante la gestación, tienen un depósito de grasa retroperitoneal sorprendentemente más bajo.

Como se enseña en Athukorala C et al. BMC Pregnancy Childbirth, 2010, 10: 56; Ovesen P et al. Obstet Gynecol, 2011, 118: 305 y Aisling MM et al. 2009, Diabetes Care 32(7): 1308, existe una relación bien establecida entre el depósito de grasa corporal, la obesidad y la DMG en la gestación.

Durante la gestación se producen cambios hormonales en el cuerpo de una madre, que conducen al aumento de la insulinoresistencia y a una concentración plasmática de glucosa más alta. Estos cambios ayudan a garantizar la transferencia de nutrientes de la madre al feto, lo que ayuda, de ese modo, a garantizar su crecimiento y desarrollo óptimos. Normalmente, el aumento de la insulinoresistencia y las concentraciones plasmáticas de glucosa más altas

se contrarrestan por el aumento de la producción de insulina por parte de la madre. Sin embargo, algunas madres no son capaces de producir cantidades adecuadas de insulina para contrarrestar los cambios y esto puede producir Diabetes *Mellitus* Gestacional (en lo sucesivo, DMG) en dichas madres.

- 5 La DMG se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento durante la gestación (Metzger BE, Coustan DR (Eds.): Proceedings of the Fourth International Work-shop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. Diabetes Care 21(Suppl. 2):B1-B167, 1998).

10 La DMG es un trastorno de la gestación que puede aumentar el riesgo de que se produzcan diversas afecciones materno-fetales, entre las que se incluyen, macrosomía, traumatismo durante el parto, distocia de hombros, parto prematuro y parto por cesárea (en lo sucesivo, cesárea). Las madres que padecen DMG también tienen un mayor riesgo de desarrollar diabetes de tipo II inmediatamente después de la gestación y más tarde en su vida. Además, la descendencia de las madres que padecen DMG tiene un mayor riesgo de desarrollar tolerancia alterada a la glucosa y/o de padecer un exceso de peso/adiposidad y trastornos metabólicos asociados, por ejemplo, diabetes de tipo II y

15 obesidad.

En consecuencia, existe la necesidad de descubrir formas de tratar y/o prevenir la DMG en mujeres gestantes.

#### Sumario de la invención

20 La invención se expone en las reivindicaciones. Como se ha indicado anteriormente, los presentes inventores han descubierto ahora que una composición para la administración materna, que comprende mioinositol junto con vitamina B2, es de utilidad particular para atender las necesidades nutritivas específicas de las mujeres que desean la gestación, de las mujeres gestantes y en período de lactancia y de su descendencia. Dicha composición es, por lo

25 tanto, un objeto de la presente invención. Otro objeto es el uso de dicha composición para tratar o prevenir la DMG en una gestante, por ejemplo, una mujer, una gata o una perra gestante. Como también se ha indicado anteriormente, se descubrió que la vitamina B2 puede usarse para mejorar la captación de glucosa en células de mamífero, que cuando a ratones db/db heterocigotos se les administra una vitamina B2 complementaria durante un período previo a la fecundación y durante la gestación, tienen una menor concentración de glucosa en ayunas en comparación con los

30 ratones a los que no se les administra una dosis complementaria, y por lo tanto, puede usarse para tratar o prevenir la DMG en una gestante, por ejemplo, una mujer, una gata o una perra gestante.

Como se ha indicado anteriormente, la DMG se asocia a diversas afecciones que afectan a la gestante y/o a su descendencia, p. ej., parto pretérmino y por cesárea, traumatismo durante el parto para la madre o el bebé, distocia

35 de hombros, macrosomía, excesiva concentración de glucemia de la descendencia, exceso de peso/adiposidad y trastornos metabólicos asociados, p. ej., diabetes de tipo II, esteatosis hepática (o enfermedad del hígado graso) y obesidad inmediatamente después del nacimiento y más tarde en la vida de la descendencia, y un mayor riesgo para la madre de tener o desarrollar diabetes de tipo 2 inmediatamente después del nacimiento y más tarde en la vida. En consecuencia, al tratar o prevenir la DMG, la vitamina B2 también puede usarse para tratar o prevenir estas afecciones

40 en estas gestantes o en su descendencia.

La vitamina B2 puede ser particularmente eficaz, en el tratamiento o la prevención de la DMG en una gestante y/o en su descendencia, cuando se usa junto con mioinositol (*cis*-1,2,3,5-*trans*-4,6-ciclohexanoheptol) y/o uno o más probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc. En particular, la vitamina B2 puede ser particularmente

45 eficaz cuando se usa junto con mioinositol, vitamina D o vitamina D y zinc.

La vitamina B2 y, opcionalmente, el mioinositol y/o uno o más probióticos y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc, pueden administrarse por vía enteral a un sujeto antes y/o durante la gestación y/o durante la lactancia.

50 La vitamina B2, y opcionalmente el mioinositol y/o uno o más probióticos y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc, pueden administrarse o emplearse en cualquier forma adecuada para su ingestión por un sujeto, por ejemplo, en forma de una composición nutritiva en polvo para reconstituirse, por ejemplo, en leche, zumo o agua; un producto alimenticio, una bebida, un complemento nutritivo, tal como un complemento nutritivo en polvo para espolvorear sobre los alimentos o disolver en un medio acuoso, por ejemplo, leche, zumo o agua, o un nutracéutico.

55 La vitamina B2, opcionalmente también junto con mioinositol y/o uno o más probióticos y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc, puede usarse en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento o la prevención de la DMG en una gestante.

60 La vitamina B2, opcionalmente también junto con mioinositol y/o uno o más probióticos y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc, puede proporcionarse junto con una etiqueta que indique las necesidades posológicas en un kit para su uso en el tratamiento o la prevención de la DMG en una gestante.

#### Dibujos

65 La Figura 1 es un gráfico que muestra el porcentaje de mujeres encuestadas en el ejemplo 3 que presentan

deficiencias de vitamina D, vitamina B12, vitamina B6, ácido fólico, hierro y zinc, respectivamente.

La Figura 2A muestra la correlación entre los niveles bajos de vitamina B2 en madres durante la gestación y la masa de grasa a los 6 años de edad de sus descendientes.

La Figura 2B muestra la correlación entre los niveles bajos de vitamina B2 las madres durante la gestación y la masa de grasa a los 4 años de edad de sus descendientes.

La Figura 3 son gráficos que ilustran el efecto de la vitamina B2, en ausencia de insulina, en la captación de glucosa en miocitos L6 diferenciados después de incubarlos durante 2 y 4 horas.

La Figura 4 es un gráfico que ilustra el efecto de una combinación de vitamina B2 y 1,25-dihidroxitamina D3, en ausencia de insulina, en la captación de glucosa en miocitos L6 diferenciados después de incubarlos durante 2 y 4 horas.

La Figura 5 es un gráfico que ilustra el efecto de la combinación de vitamina B2 y 1,25-dihidroxitamina D3 y zinc, en ausencia de insulina, en la captación de glucosa en miocitos L6 diferenciados después de incubarlos durante 2 horas.

La Figura 6 es un gráfico que ilustra el nivel de glucemia en ayunas de ratones que reciben una administración de mioinositol, vitamina B2 o una combinación de estos, al final del día gestacional (día 18,5 de la gestación).

La Figura 7 es un gráfico que ilustra el peso del panículo adiposo retroperitoneal de ratones que reciben una administración de mioinositol, vitamina B2 o una combinación de estos, al final del día gestacional (día 18,5 de la gestación).

La Figura 8 es un gráfico que ilustra la diferencia en la respuesta a la PTGO entre ratonas de TN (tipo natural) y heterocigotas *Lepr<sup>db/+</sup>* a las 4 semanas de vida

La Figura 9 es un gráfico que ilustra el aumento porcentual (%) de glucosa desde el nivel de glucemia en ayunas en ratones que reciben una administración de mioinositol, vitamina B2 o una combinación de estos, durante la gestación (día 16,5 de la gestación).

La Figura 10 es un gráfico que ilustra el efecto de la vitamina B2 en la captación de glucosa en ausencia de insulina en miocitos L6 diferenciados insulinoresistentes después de incubarlos durante un periodo de tiempo corto (2 horas) y largo (24 horas).

La Figura 11 es un gráfico que ilustra el efecto de una combinación de mioinositol y probióticos sobre el % de la masa grasa delta de ratas Goto Kakizaki después de 10 semanas.

La Figura 12 es un gráfico que ilustra el efecto de una combinación de mioinositol y probióticos en la relación de ganancia de grasa con ganancia de peso en ratas Goto Kakizaki después de 10 semanas.

La Figura 13 es un gráfico que ilustra el efecto de una combinación de mioinositol y probióticos en la cantidad de insulina en el páncreas el día 19,5 de la gestación en ratas Goto Kakizaki.

La Figura 14 es un gráfico que ilustra el efecto de una combinación de mioinositol y probióticos en el ABC del aumento de insulina el día 16,5 de la gestación en ratas Goto Kakizaki.

La Figura 15 es un gráfico que ilustra el efecto de mioinositol y vitamina B2 en la ganancia de peso durante la gestación en ratonas *Lepr<sup>db/+</sup>*.

La Figura 16 es un gráfico que ilustra el efecto de mioinositol y vitamina B2 en las concentraciones de leptina en plasma en ayunas en ratonas el día 18,5 de la gestación.

#### Descripción detallada

Los presentes inventores han investigado las necesidades específicas de las mujeres que desean la gestación, de las mujeres gestantes y de las mujeres en período de lactancia para identificar los nutrientes más útiles para esta población específica. Basándose en los estudios han diseñado una composición optimizada que comprende mioinositol y vitamina B2 para atender específicamente las necesidades más acuciantes de esta población específica.

La composición de la invención es una composición para administración materna que comprende mioinositol y vitamina B2, y que comprende vitamina B6, vitamina B12, vitamina D, *Bifidobacterium lactis* BB12 depositada como CNCM I-3446, y *Lactobacillus rhamnosus* GG disponible con el número de depósito CGMCC 1.3724.

La presente invención también se refiere a un kit de partes que comprende los ingredientes de la composición de la invención, que comprende al menos dos composiciones separadas físicamente que comprenden, cada una de ellas, uno de los ingredientes de la composición de la invención, caracterizado por que al menos una de las composiciones separadas físicamente comprende mioinositol y al menos una de las composiciones separadas físicamente comprende vitamina B2.

El inositol o ciclohexan-1,2,3,4,5,6-hexol es un poliol existente bajo nueve formas estereoisómeras dependiendo de la orientación espacial de sus seis grupos hidroxilo. El mioinositol o *cis*-1,2,3,5-*trans* 4,6-ciclohexanoheptol, es la forma isomérica predominante del inositol. El mioinositol es un compuesto presente en las células animales y vegetales y juega un papel importante en varios procesos celulares, como la base estructural de mensajeros secundarios en las células eucariotas, particularmente, como trifosfatos de inositol (IP3), lípidos de fosfatidilinositol fosfato (PIP2/PIP3) y glucanos de inositol. Se ha demostrado que el mioinositol participa en una variedad de procesos biológicos tales como el crecimiento y la supervivencia celular, el desarrollo y la función de los nervios periféricos, la osteogénesis, el metabolismo energético y la reproducción (Croze *et al.* (2013) *Biochimie* 95:1811-1827). El mioinositol se encuentra como forma libre, fosfoinosítidos y ácido fítico, en frutas y verduras frescas, y en todos los alimentos que contienen semillas (frijoles, cereales y nueces) (Clements RS y Darnell B. *Am J Clin Nutr* (1980) 33:1954-1967). El mioinositol puede liberarse del ácido fítico en el intestino gracias a las enzimas fitasas que se encuentran en las plantas, en los microorganismos y en los tejidos animales (Schlemmer U *et al.* *Mol Nutr Food Res* (2009) 53:S330-S375). Estas enzimas son capaces de liberar inositol libre, ortofosfato, y productos intermedios que incluyen las formas mono-, di-, tri-, tetra- y penta-fosfato de inositol. Gran parte del hexafosfato de inositol ingerido se hidroliza a inositol.

El término mioinositol como se usa en el presente documento, se refiere a mioinositol (*cis*-1,2,3,5-*trans*-4,6-ciclohexanoheptol) y/o a un metabolito de este.

El término metabolito, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia producida y/o formada por el cuerpo de un sujeto a partir de un compuesto particular después de su administración, por ejemplo, por ingestión. Incluye formas activas y catabolitos de un compuesto.

En la invención puede utilizarse cualquier fuente de mioinositol adecuada para la ingestión por parte de la gestante.

Un metabolito de mioinositol puede seleccionarse del grupo que consiste en D-quiro-inositol, L-quiro-inositol y una combinación de los anteriores. Particularmente, el metabolito es D-quiro-inositol.

Debido a su importante papel fisiológico y, particularmente, debido a su capacidad para promover el crecimiento celular, el mioinositol es de particular interés para las mujeres que desean la gestación y para las mujeres gestantes y en período de lactancia. Sin embargo, el estudio de la ingesta alimenticia llevado a cabo por los inventores y detallado en el Ejemplo 4, ha demostrado que las mujeres gestantes no suelen tomar suficiente cantidad del tipo de alimentos en los que se encuentra el mioinositol, sobre todo frutas y verduras. Los presentes inventores han descubierto que esto es especialmente beneficioso para las mujeres que desean la gestación, las mujeres gestantes y para las mujeres en período de lactancia recibir complementación de mioinositol.

La vitamina B2 es beneficiosa tanto para la madre como para la descendencia cuando se administra a mujeres gestantes. Particularmente, los presentes inventores han identificado recientemente el efecto de la administración materna de vitamina B2 para la prevención de aumento de la adiposidad, el sobrepeso o la obesidad en la descendencia (solicitud de patente no publicada EP 14161190,5 y el Ejemplo 5 de la presente solicitud). Los presentes inventores ahora han llevado a cabo un estudio detallado en el Ejemplo 4, que demostró que una elevada proporción de mujeres gestantes no ingirieron una cantidad suficiente de vitamina B2 en su dieta normal. Por lo tanto, es de especial interés complementar la dieta de las mujeres gestantes con esta vitamina.

La expresión vitamina B2, como se usa en el presente documento, se refiere a la vitamina B2 y/o a un metabolito de esta.

Puede usarse cualquier fuente de vitamina B2 adecuada para la ingestión en la gestante. En particular, la vitamina B2 puede ser riboflavina, por ejemplo, riboflavina comercializada con la marca Riboflavina Universal.

Un metabolito de la vitamina B2 puede seleccionarse del grupo que consiste en mononucleótido de flavina (en lo sucesivo FMN), dinucleótido de flavina y adenina (en lo sucesivo FAD), y sales de estos, por ejemplo, sal de sodio de riboflavina-5'-fosfato.

El mioinositol se proporciona preferentemente en una cantidad de 0,2 a 5 g, preferentemente de 1,5 a 5 g, con mayor preferencia de 2 a 5 g, con la máxima preferencia de 2 a 4 g por dosis diaria. La vitamina B2 se proporciona preferentemente en una cantidad de 0,14 a 14 mg por dosis diaria.

En una realización preferida, la composición de la invención comprende además al menos una vitamina adicional seleccionada de vitamina D, vitamina B6, vitamina B12 y sus mezclas. Preferentemente, la composición comprende vitamina D, vitamina B6 y vitamina B12.

La expresión vitamina B12, como se usa en el presente documento, se refiere a la vitamina B12 y/o a un metabolito de esta.

La expresión vitamina B6, como se usa en el presente documento, se refiere a la vitamina B6 y/o a un metabolito de esta.

La expresión vitamina D, como se usa en el presente documento, se refiere a la vitamina D, a un precursor de esta, y/o a un metabolito de esta.

La expresión precursor, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia administrada, por ejemplo, ingerida por un sujeto y que utiliza el cuerpo de dicho sujeto para producir y/o formar un compuesto particular.

Particularmente, la vitamina B6 puede ser clorhidrato de piridoxina, y/o un metabolito de la vitamina B6 seleccionado del grupo que consiste en piridoxal 5'-fosfato (en lo sucesivo PLP).

Particularmente, la vitamina B12 puede ser cianocobalamina, y/o un metabolito de la vitamina B12 seleccionado del grupo que consiste en hidroxicobalamina, metilcobalamina, adenosilcobalamina, y una combinación de estos.

Particularmente, la vitamina D puede ser vitamina D2, vitamina D3 o una combinación de estas, un precursor de la vitamina D seleccionado del grupo que consiste en 7-dehidrocolecalfiferol, un metabolito de la vitamina D seleccionado del grupo que consiste en 25-hidroxivitamina D3, 1,25-dihidroxivitamina D3, 25-hidroxivitamina D2, 1,25-dihidroxivitamina D2, y una combinación de las anteriores.

Con mayor preferencia, la vitamina D es la vitamina D3, un metabolito de la vitamina D seleccionado del grupo que consiste en 25-hidroxivitamina D3, 1,25-dihidroxivitamina, y la combinación de cualquiera de las anteriores. Aún con mayor preferencia, la vitamina D3 es colecalfiferol.

Si está presente, la vitamina B6 se proporciona preferentemente en una cantidad de 0,19 a 19 mg por dosis diaria. Si está presente, la vitamina B12 se proporciona preferentemente en una cantidad de 0,26 a 26 µg por dosis diaria. Si está presente, la vitamina D se proporciona preferentemente en una cantidad de 1,5 a 100 µg por dosis diaria.

Con mayor preferencia, la composición de la invención comprende 1,8 mg de vitamina B2, 2,6 mg de vitamina B6, 5,2 µg de vitamina B12 y 10 µg de vitamina D por dosis diaria.

En el estudio detallado en el Ejemplo 3, los presentes inventores han demostrado, sorprendentemente, que las mujeres gestantes tenían, a menudo, deficiencias en lo que respecta a las vitaminas B6, B12 y D en comparación con otros nutrientes. Por lo tanto, es de particular interés complementar la dieta de las mujeres gestantes con estas vitaminas para compensar particularmente estas deficiencias que se producen frecuentemente.

El estudio del Ejemplo 3 también aporta pruebas sobre las deficiencias de zinc comunes en al menos determinadas poblaciones de mujeres gestantes, aunque en menor medida que las vitaminas B2, B12, B6 y D. Por lo tanto, es, además, particularmente ventajoso complementar la dieta de mujeres gestantes con zinc. Por tanto, en una realización preferida, la composición de la invención también comprende zinc. Con mayor preferencia, el zinc está presente en una cantidad de 1,1 a 40 mg por dosis diaria.

Puede usarse cualquier fuente o forma de zinc adecuada para la ingestión por parte la gestante. Particularmente, el zinc puede ser una sal de zinc tal como cloruro de zinc, picolinato de zinc, sulfato de zinc, óxido de zinc, acetato de zinc, carbonato de zinc, y combinaciones de los anteriores.

Más particularmente, el zinc es cloruro de zinc.

En otra realización preferida, la composición comprende, además, probióticos, ya que se ha observado que mejoran la función de barrera intestinal y ayudan a los nutrientes a atravesar el intestino (Cani PD *et al.* (2009) Gut 58:1091-1103). La combinación de mioinositol y vitamina B2 con probióticos mejora por tanto la absorción de estos nutrientes y de otros nutrientes que pueden estar presentes en la composición.

El término probiótico, como se usa en el presente documento, se refiere a bacterias probióticas vivas, bacterias probióticas no replicantes, bacterias probióticas muertas, bacterias probióticas no viables, fragmentos de bacterias probióticas tales como ADN, metabolitos de las bacterias probióticas, compuestos citoplasmáticos de las bacterias probióticas, materiales de la pared celular de bacterias probióticas, sobrenadantes del cultivo de las bacterias probióticas, y combinaciones de cualquiera de los anteriores.

Particularmente, el probiótico son bacterias probióticas vivas, bacterias probióticas no replicantes, bacterias probióticas muertas, bacterias probióticas no viables, y cualquier combinación de estas. Más particularmente, el probiótico son bacterias probióticas vivas.

Preferentemente, los probióticos comprenden una combinación de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. La cepa de *Lactobacillus* más preferida es la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* depositada por Nestlé R&D centre Shanghai Ltd (13 Qiao Nan, Cao An Road, Jiading District, Shanghai 201812, P.R. China) en el Centro General de Colecciones de Cultivos Microbiológicos de China (CGMCC) y disponible con el número de depósito CGMCC 1,3724. La cepa de *Bifidobacterium* más preferida es la cepa BB12 de *Bifidobacterium lactis* depositada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) como CNCM I-3446. Preferentemente, los probióticos comprenden una mezcla de la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* disponible con el número de depósito CGMCC 1,3724 y de la cepa BB12 de *Bifidobacterium lactis* depositada como CNCM I-3446. Con mayor preferencia, los probióticos consisten en una mezcla de la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* disponible con el número de depósito CGMCC 1,3724 y de la cepa BB12 de *Bifidobacterium lactis* depositada como CNCM I-3446. En una realización preferida, el probiótico se proporciona en una cantidad de  $10^5$  a  $10^{12}$  unidades formadoras de colonias (ufc) por dosis diaria, con mayor preferencia de  $10^7$  a  $10^{11}$  ufc por dosis diaria.

También pueden añadirse otras vitaminas y minerales. Por ejemplo, pueden añadirse vitaminas y minerales conforme a las recomendaciones de organismos gubernamentales tales como la USRDA. Por ejemplo, la composición puede contener uno o más de los siguientes micronutrientes, calcio, magnesio, fósforo, hierro, zinc, cobre, yodo, selenio, vitamina A o equivalente de actividad de retinol (RAE), por ejemplo en forma de  $\beta$  caroteno o una mezcla de carotenoides, vitamina C, vitamina B1, niacina, ácido fólico, biotina, vitamina E. Preferentemente, la composición puede contener uno o más de los siguientes micronutrientes en las siguientes cantidades: de 100 a 2500 mg de calcio, de 35 a 350 mg de magnesio, de 70 a 3500 mg de fósforo, de 2,7 a 45 mg de hierro, de 0,1 a 10 mg de cobre, de 22 a 1,100  $\mu$ g de yodo, de 6 a 400  $\mu$ g de selenio, de 77 a 3000  $\mu$ g de vitamina A o equivalente de actividad de retinol (RAE, *retinol activity equivalent*), por ejemplo en forma de  $\beta$  caroteno o una mezcla de carotenoides, de 8,5 a 850 mg de Vitamina C, de 0,14 a 14 mg de Vitamina B1, de 1,8 a 35 mg de niacina, de 60 a 1000  $\mu$ g de ácido fólico, de 3 a 300  $\mu$ g de biotina, de 1,9 a 109  $\mu$ g de Vitamina E.

Ventajosamente, la composición de la invención también puede comprender al menos un aceite seleccionado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, tales como ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA), en cualquier cantidad adecuada como conoce el experto en la materia, por ejemplo, en una cantidad de 100 a 500 mg por dosis diaria, con mayor preferencia entre 200 y 400 mg por dosis diaria.

Sin embargo, a pesar de lo anterior, una ingesta elevada de grasa y/o la complementación materna con PUFA durante la gestación, se ha relacionado con un mayor riesgo de aumentar la adiposidad en la descendencia. Por consiguiente, en una realización particular, la composición de la invención no comprende un ácido graso poliinsaturado de cadena larga y/o grasas animales y/o grasas vegetales.

En otra realización particular la composición de la invención no comprende un oligosacárido.

Cualquiera de los nutrientes mencionados en el presente documento puede usarse en cualquier cantidad que sea eficaz para alcanzar el objetivo de la presente invención. Los expertos en la materia podrán determinar las dosis adecuadas. Por lo general, la dosis dependerá de la edad, estatura y estado de salud de la madre, de su estilo de vida, así como de su patrimonio genético.

Por lo general, en la presente solicitud, las cantidades se definen como cantidades por dosis diaria. Por tanto, la cantidad de nutriente puede seleccionarse en cada composición en función de si se va a consumir una vez al día o con mayor o menor frecuencia.

Los nutrientes pueden proporcionarse como una formulación de liberación sostenida. De esta manera, el nutriente puede consumirse con menos frecuencia, mientras que el organismo sigue recibiendo una cantidad suficiente de dicho nutriente.

La composición de la presente invención se destina a la administración materna. Esto significa que la composición es para administrarla a una mujer que desee la gestación, a una mujer gestante y/o a una mujer en período de lactancia. Preferentemente, es para administrarla a una mujer que desee la gestación y/o a una mujer gestante, con mayor preferencia a una mujer gestante.

Preferentemente, la composición de la invención se administra a una mujer que desee la gestación, por ejemplo durante al menos 1, 2, 3 o 4 meses anteriores a la gestación o gestación deseada. Cuando la composición es para administrarla a una mujer gestante o en período de lactancia, la composición se administra preferentemente durante al menos 4, preferentemente al menos 8, con mayor preferencia al menos 12, con mayor preferencia al menos 16, con mayor preferencia al menos 20, con mayor preferencia al menos 24, con mayor preferencia al menos 28, aún con mayor preferencia al menos 36 semanas durante la gestación y o la lactancia. A medida que las necesidades nutritivas aumentan en el segundo y tercer trimestres de la gestación, se prefiere, además, administrar la composición de la invención a lo largo del tercer trimestre de la gestación y con mayor preferencia a lo largo del segundo y tercer trimestres de la gestación.

Es importante que las mujeres que desean la gestación preparen su cuerpo para la gestación mediante la ingestión

de nutrientes adecuados. Entonces, las necesidades de nutrientes de las mujeres aumentan durante la gestación y la lactancia. La lactancia, además, requiere del almacenamiento materno de energía, proteínas, y otros nutrientes que necesitan establecerse, y reponerse. La composición de la presente invención está diseñada específicamente para satisfacer las necesidades de la mujer durante cada uno de estos períodos.

La composición puede estar en cualquier forma que sea adecuada para administrar todos los ingredientes a la mujer. Por ejemplo, puede estar en forma de una composición nutritiva en polvo para reconstituirse en leche o agua, un producto alimenticio, un producto alimenticio funcional, una bebida, un producto lácteo, una formulación farmacéutica, un pienso para animales domésticos, un complemento nutritivo o un nutraceutico.

Cuando la composición está en forma de una composición nutritiva en polvo para reconstituirse en leche o agua, ésta comprende preferentemente una fuente de proteínas, una fuente de hidratos de carbono y una fuente de lípidos, preferentemente junto con lecitina. Con mayor preferencia también comprende lecitina de soja y/o un agente de carga. La fuente de proteína puede ser leche en polvo o leche descremada en polvo. Como fuente de hidrato de carbono puede usarse sacarosa y/o maltodextrina. La fuente de lípido puede ser aceite vegetal. La formulación puede contener, además, alternativa o adicionalmente, jarabe de glucosa, grasa de leche, citrato de magnesio, sales y ésteres de colina, fibras prebióticas, y/o palmitato de ascorbilo. Pueden añadirse saporíferos, tales como, por ejemplo, polvo de cacao o miel, para proporcionar distintos sabores.

La expresión "producto alimenticio", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de producto que puede consumir un ser humano o un animal de forma segura. Dicho producto alimenticio puede estar en forma sólida, semisólida o líquida y puede comprender uno o más nutrientes, alimentos o complementos nutritivos. Por ejemplo, el producto alimenticio también puede comprender los siguientes nutrientes y micronutrientes: una fuente de proteínas, una fuente de lípidos, una fuente de hidratos de carbono, vitaminas y minerales. La composición puede contener, además, antioxidantes, estabilizantes (cuando se proporciona en forma sólida) o emulsionantes (cuando se proporciona en forma líquida).

La expresión "producto alimenticio funcional", como se usa en el presente documento, se refiere a un producto alimenticio que proporciona una función adicional de promover la salud o prevenir la enfermedad al individuo.

Los productos alimenticios y productos alimenticios funcionales incluyen, por ejemplo, productos basados en cereales, yogures u otros productos derivados de la leche y barritas.

La expresión "complemento nutritivo" o "complemento dietético", como se usa en el presente documento, se refiere a un producto nutritivo que proporciona nutrientes a un individuo que de otro modo no podría consumir en cantidades suficientes. Por ejemplo, un complemento nutritivo puede incluir vitaminas, minerales, fibra, ácidos grasos o aminoácidos.

Los complementos pueden proporcionarse, por ejemplo, en forma de una píldora, un comprimido, una pastilla para chupar, una cápsula o un comprimido masticables, un comprimido o una cápsula, o un complemento en polvo que puede, por ejemplo, disolverse en agua o espolvorearse sobre los alimentos. El más preferido es un complemento en polvo que puede disolverse en un líquido o espolvorearse sobre los alimentos, con la máxima preferencia disolverse en agua. Dichos complementos proporcionan por lo general los nutrientes seleccionados, aunque no representan una parte significativa de las necesidades nutritivas globales del sujeto. Por lo general no representan más de 0,1 %, 1 %, 5 %, 10 % o 20 % de la necesidad diaria de energía del sujeto.

La expresión "productos lácteos", como se usa en el presente documento, se refiere a los productos alimenticios producidos a partir de animales tales como vacas, cabras, ovejas, yaks, caballos, camellos y otros mamíferos. Son ejemplos de productos lácteos leche con bajo contenido en grasa (p. ej., 0,1 %, 0,5 % o 1,5 % de grasa), leche descremada, leche en polvo, leche entera, productos de leche entera, mantequilla, suero de leche, productos de suero de leche, leche desnatada, productos lácteos desnatados, productos lácteos con alto contenido en grasa leche condensada, crema fresca, queso, helados y productos de confitería, bebidas probióticas o bebidas tipo yogur probiótico.

La expresión "formulación farmacéutica", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición que comprende al menos un agente, una sustancia química o un fármaco farmacéuticamente activo. La formulación farmacéutica puede estar en forma sólida o líquida y puede comprender al menos un agente activo, un portador, un vehículo, un excipiente o un agente auxiliar adicional que puede identificar un experto en la materia. La formulación farmacéutica puede estar en forma de un comprimido, cápsula, gránulos, polvo, líquido o jarabe. La expresión "producto de bebida", como se usa en el presente documento, se refiere a un producto nutritivo en forma líquida o semilíquida que puede consumir un individuo con seguridad. La expresión "pienso para animales domésticos", como se usa en el presente documento, se refiere a un producto alimenticio que se destina al consumo de animales domésticos. Un animal doméstico o animal de compañía, como se menciona en el presente documento, debe entenderse como un animal seleccionado de perros, gatos, aves, peces, roedores tales como ratones, ratas y cobayas, conejos, etc.



Todos los ingredientes de la composición pueden mezclarse entre sí o, alternativamente, la composición puede proporcionarse en forma de un kit de partes en donde los ingredientes o grupos de ingredientes se proporcionan por separado y están destinados a su consumo por las mujeres.

Por lo tanto, un kit de partes que comprende los ingredientes de la composición de la presente invención y que comprende al menos dos composiciones separadas físicamente, que comprenden, cada una de ellas, al menos uno de los ingredientes mencionados anteriormente, en donde al menos una de las composiciones separadas físicamente comprende mioinositol y al menos una de las composiciones separadas físicamente comprende vitamina B2, es otro objeto de la presente invención.

Cada una de las composiciones separadas físicamente puede comprender además uno o más de los otros ingredientes mencionados anteriormente. Con la máxima preferencia, una primera composición comprende vitamina B2 y opcionalmente otras vitaminas mencionadas anteriormente y una segunda composición comprende probióticos. El mioinositol puede proporcionarse en la primera o la segunda composición, o incluso por separado, pero se proporciona preferentemente en la misma composición que las vitaminas. En una realización preferida de la invención, el kit de partes comprende una primera composición que comprende mioinositol y vitamina B2, opcionalmente con cualquiera de las otras vitaminas y/o nutrientes mencionados anteriormente, a excepción de los probióticos, y una segunda composición comprende probióticos. En una realización más preferida, el kit de partes comprende una primera composición que comprende mioinositol, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina D y zinc y una segunda composición que comprende probióticos. La separación de los probióticos de otros ingredientes se prefiere principalmente para evitar cualquier daño a los probióticos debido a la presencia de alta concentración de minerales u otros nutrientes.

Para el propósito de la presente invención, la composición (o las composiciones contenidas en el kit de partes) se administra regularmente, por ejemplo, dos veces al día, cada día, cada dos días o semanalmente.

En otra realización, la presente invención proporciona un proceso para la fabricación de una composición para la administración materna, que comprende mezclar mioinositol con vitamina B2 y, opcionalmente, con cualquiera de los otros ingredientes mencionados anteriormente.

Como se ha indicado anteriormente, al margen de que los presentes inventores hayan identificado que una composición para administración materna, que comprende la vitamina B2 y mioinositol, es de particular utilidad para atender las necesidades nutritivas específicas de las mujeres que desean la gestación, las mujeres gestantes y en período de lactancia y de su descendencia, dichos inventores también han descubierto que, sorprendentemente, la administración de vitamina B2 a un sujeto puede mejorar la captación de glucosa en células de mamífero. Aún más sorprendentemente, los inventores descubrieron que, cuando la vitamina B2 se usaba junto con la vitamina D o la vitamina D y zinc, podía mejorarse el efecto con respecto al aumento de la captación de glucosa en células de mamífero, particularmente, en miocitos de mamífero. En consecuencia, la administración de vitamina B2 a una gestante antes y/o durante la gestación puede prevenir y/o tratar la DMG y/o prevenir una afección asociada a la DMG en una gestante o en su descendencia.

Como se ha indicado anteriormente, los inventores han descubierto que, sorprendentemente, la vitamina B2 puede usarse para mejorar la captación de glucosa en células de mamífero, particularmente en miocitos de mamífero. En consecuencia, la administración de vitamina B2 a un sujeto antes y/o durante la gestación puede prevenir y/o tratar la DMG y/o prevenir una afección asociada a la DMG en una gestante o en su descendencia. Los inventores también descubrieron que cuando los ratones heterocigotos db/db recibían una administración de vitamina B2 complementaria durante un período previo a la concepción y durante la gestación, tenían una menor concentración de glucosa en ayunas en comparación con los ratones que recibían administración de dosis complementaria.

El término "sujeto" como se usa en el presente documento, se refiere a un mamífero y, más particularmente, a un gato, un perro o un ser humano.

El término "DMG", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier grado de tolerancia alterada a la glucosa, que aparece, o se reconoce por primera vez, durante la gestación.

Que un mamífero tenga o no tolerancia alterada a la glucosa puede determinarse midiendo su concentración plasmática de glucosa en ayunas, o mediante una prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO). El experto en la materia estará familiarizado con estas pruebas y con los criterios para el diagnóstico de una tolerancia alterada a la glucosa y por lo tanto, la DMG. De conformidad con los criterios establecidos en las directrices de la Academia Nacional de Bioquímica Clínica (NACB) y la asociación internacional de las directrices del grupo de estudio de la gestación y diabetes (IADPSG), publicadas por la Asociación Americana de Química Clínica (AACC), se considera que una gestante humana tiene tolerancia alterada a la glucosa si su concentración plasmática de glucosa en ayunas equivale a 5,1 mmol/l o más, o si su concentración de glucemia es superior a 10 mmol/l 1 hora después de una bebida de 75 gramos de glucosa, o superior a 8,5 mmol/l 2 horas después de una bebida de 75 gramos de glucosa.

El término "tratar", como se usa en el presente documento, incluye la mejora y/o el alivio de una afección, es decir, la

mejora y/o el alivio de los síntomas de una afección. Por ejemplo, puede incluir la reducción de la gravedad de una afección en un sujeto.

El término "prevenir", como se usa en el presente documento, se refiere a la prevención de la aparición o a la reducción del riesgo de aparición, de una afección en un sujeto.

Puede usarse cualquier fuente o forma de vitamina B2 que sea adecuada para su ingestión por parte de la gestante. En particular, la vitamina B2 puede ser riboflavina, por ejemplo, riboflavina comercializada con la marca Riboflavina Universal.

Un metabolito de la vitamina B2 puede seleccionarse del grupo que consiste en mononucleótido de flavina (en lo sucesivo FMN), dinucleótido de flavina y adenina (en lo sucesivo FAD), y sales de estos, por ejemplo, sal de sodio de riboflavina-5'-fosfato.

En la invención puede usarse cualquier fuente o forma de mioinositol que sea adecuada para su ingestión por parte de la gestante.

Un metabolito de mioinositol puede seleccionarse del grupo que consiste en D-quiro-inositol, L-quiro-inositol y una combinación de estos. Particularmente, el metabolito es D-quiro-inositol.

Una combinación de vitamina B2 con mioinositol (*cis*-1,2,3,5-*trans*-4,6-ciclohexanohehexol) y/o uno o más probióticos y/o una o más de vitaminas B6, B12 y D y o zinc puede ser particularmente eficaz para el tratamiento y/o la prevención de la DMG y las afecciones asociadas A esta en una gestante y/o en su descendencia. La combinación de vitamina B2 con estos ingredientes enumerados puede proporcionar un mejor efecto, por ejemplo, más que un efecto aditivo o efecto sinérgico, respecto a lo que podría esperarse basándose en los efectos de los ingredientes individuales cuando se usan en solitario para tratar o prevenir la DMG y una afección asociada a esta en una gestante y/o en su descendencia.

En consecuencia, la composición para administración materna de la presente invención comprende mioinositol, vitamina B2, vitamina B12, vitamina D, *Bifidobacterium lactis* BB12 y *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Particularmente, los inventores han descubierto que cuando la vitamina B2 se usa junto con la vitamina D, puede haber una mejora con respecto al aumento de la captación de glucosa en comparación a cuando la vitamina B2 o la vitamina D se usan en solitario. Aún más particularmente, los inventores han descubierto que cuando la vitamina B2 se usa junto con la vitamina D y zinc, puede haber una mejora respecto al aumento de la captación de glucosa en comparación a cuando la vitamina B2, el zinc o la vitamina D se usan en solitario, y que esta mejora con respecto al aumento puede ser más que aditiva.

Además, los inventores han descubierto que los ratones que reciben una administración de mioinositol junto con la vitamina B2 complementaria tienen una concentración sorprendentemente baja de glucosa en ayunas durante la gestación y antes de la gestación, y aún más, los inventores han descubierto que cuando los ratones heterocigotos db/db reciben una administración de mioinositol junto con vitamina B2 complementaria durante la gestación, tienen un depósito de grasa retroperitoneal sorprendentemente bajo.

En la invención puede usarse cualquier fuente o forma de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc que sea adecuada para su ingestión por parte de la gestante.

Particularmente, la vitamina B6 puede ser clorhidrato de piridoxina, y/o un metabolito de la vitamina B6 seleccionado del grupo que consiste en piridoxal 5'-fosfato (en lo sucesivo PLP).

Particularmente, la vitamina B12 puede ser cianocobalamina, y/o un metabolito de la vitamina B12 seleccionado del grupo que consiste en hidroxicobalamina, metilcobalamina, adenosilcobalamina, y una combinación de estos.

Particularmente, la vitamina D puede ser vitamina D2, vitamina D3, un precursor de la vitamina D seleccionado del grupo que consiste en 7-dehidrocoleciferol, un metabolito de la vitamina D seleccionado del grupo que consiste en 25-hidroxivitamina D3, 1,25-dihidroxivitamina D3, 25-hidroxivitamina D2, 1,25-dihidroxivitamina D2, y una combinación de cualquiera de los anteriores.

Más particularmente, la vitamina D es la vitamina D3, un metabolito de la vitamina D seleccionado del grupo que consiste en 25-hidroxivitamina D3, 1,25-dihidroxivitamina, y la combinación de cualquiera de los anteriores. Aún más particularmente la vitamina D3 es coleciferol.

Particularmente, el probiótico son bacterias probióticas vivas, bacterias probióticas no replicantes, bacterias probióticas muertas, bacterias probióticas no viables, y cualquier combinación de estas. Más particularmente, el probiótico son bacterias probióticas vivas.

La una o más bacterias probióticas puede(n) ser cualquiera de las bacterias acidolácticas (o del ácido láctico), Bifidobacterias, o una combinación de estas, en donde dichas bacterias acidolácticas y Bifidobacterias han establecido características probióticas. Como ejemplos no limitativos de cepas de bacterias acidolácticas se incluyen; *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 que puede obtenerse, entre otros, en Valio Oy de Finlandia con la marca comercial LGG y *Lactobacillus rhamnosus* depositada por Nestlé R&D centre Shanghai Ltd (13 Qiao Nan, Cao An Road, Jiading District, Shanghai 201812, P.R. China) en el Centro General de Colecciones de Cultivos Microbiológicos de China (CGMCC) y disponible con el número de depósito CGMCC 1.3724. Como ejemplos no limitativos de cepas de Bifidobacterias se incluyen; *Bifidobacterium lactis* depositada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) CNCM I-3446 comercializada, entre otros, por la empresa Christian Hansen de Dinamarca con la marca Bb12, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 comercializada por Morinaga Milk Industry Co. Ltd. de Japón con la marca BB536, la cepa de *Bifidobacterium breve* comercializada por Danisco con la marca comercial Bb-03, la cepa de *Bifidobacterium breve* comercializada por Morinaga con la marca comercial M-16V y la cepa de *Bifidobacterium breve* comercializada por el Instituto Rosell (Lallemand) con la marca comercial R0070.

De acuerdo con la presente invención, el uno o más probióticos es una mezcla de *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 y *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446

*Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 y *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 pueden utilizarse a una proporción de 1:99 a 99:1, sin embargo, se utilizarán, más particularmente, a una proporción de 1:2 a 2:1, incluso más particularmente de 1:1.

La vitamina B2, junto con mioinositol, vitamina B6, vitamina B12, vitamina D, *Bifidobacterium lactis* BB12 y *Lactobacillus rhamnosus* GG, puede emplearse en cualquier dosis eficaz que proporcione un beneficio con respecto al tratamiento o la prevención de la DMG y una afección asociada a ella en una gestante y/o en su descendencia.

Una dosis eficaz puede ser cualquier dosis que mejore, en cualquier grado, una tolerancia a la glucosa alterada en una gestante.

El experto puede determinar la dosis eficaz. Por lo general, una dosis eficaz dependerá del tipo, de la edad, de la estatura y del estado de salud del sujeto, de su estilo de vida, así como en su patrimonio genético.

Una dosis eficaz puede determinarse, por ejemplo, probando el efecto de una dosis sobre la concentración plasmática de glucosa en ayunas de un sujeto, o realizando una PTGO. Una dosis eficaz debería mejorar la concentración de glucosa en ayunas de un sujeto y disminuir la respuesta glucémica de un sujeto.

Una dosis particularmente útil de la vitamina B2 puede ser de 0,14 a 14 mg, de 1 a 2,5 mg, de 1,5 a 2 mg, o de 1,8 mg.

Una dosis particularmente útil del mioinositol, si está presente, es de 0,2 a 5 mg, 1,5 a 5 mg, 2 a 4 g, o 2 g.

Una dosis particularmente útil del uno o más probióticos, si están presentes, es de  $10^5$  a  $10^{12}$  unidades formadoras de colonias (ufc), o de  $10^7$  a  $10^{11}$  ufc.

Una dosis particularmente útil de la vitamina B6, si está presente, es de 0,19 a 19 mg, o de 2,6 mg. Una dosis particularmente útil de la vitamina B12, si está presente, es de 0,26 a 26 µg, o de 5,2 µg. Una dosis particularmente útil de la vitamina D, si está presente, es de 1,5 a 100 µg, o de 10 µg.

Una dosis particularmente útil de zinc, si está presente, es de 1,1 a 40 mg, o de 10 mg.

El término "dosis", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad diaria que se administra a un sujeto antes y/o durante la gestación y/o durante el periodo de lactancia. La cantidad o dosis diaria puede administrarse de una vez o puede distribuirse en varias administraciones a lo largo de un día. La dosis puede administrarse por cualquier método conocido, particularmente por vía enteral, por ejemplo, por vía oral.

La(s) dosis(s) puede(n) administrarse a cualquier hora, por ejemplo, por el día o la noche. La dosis puede ser particularmente eficaz si se administra antes de que el sujeto tome alimento o bebida, por ejemplo, tome una comida o una merienda.

En una realización, la dosis se distribuye en 2 administraciones, particularmente, la dosis se distribuye en 2 administraciones, una por la mañana y otra por la noche, particularmente antes del desayuno y antes de la cena.

El término "desayuno" como se usa en el presente documento, se refiere a la primera comida del día.

El término "cena", como se usa en el presente documento, se refiere a la última comida del día.

En otra divulgación que no forma parte de la presente invención, se proporciona un kit para su uso en el tratamiento o la prevención de la DMG y una afección asociada a esta en una gestante y/o en su descendencia, comprendiendo

el kit:

- a. vitamina B2, y opcionalmente, mioinositol y/o uno o más probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc
- b. una etiqueta que indique la posología necesaria para una gestante.

La posología necesaria puede ser de 2 administraciones al día, particularmente de 2 administraciones al día antes de cualquier alimento o bebida. Más particularmente, 2 administraciones al día en donde una es por la mañana y la otra por la noche. Aún más particularmente, 2 administraciones al día en donde una es por la mañana, antes del desayuno y la otra es por la tarde antes de la cena.

La vitamina B2, el mioinositol, uno o más probióticos y una o más de las vitaminas B6, B12 y D, pueden proporcionarse, todos ellos, en un formato que ofrezca una liberación sostenida de dichas vitaminas o de uno o más probióticos. De esta manera, estos compuestos pueden consumirse menos frecuentemente, mientras que el organismo aún se abastece constantemente con una cantidad suficiente de ellos.

Cuando la vitamina B2 se usa junto con el mioinositol y/o con uno o más probióticos y/o con una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc, puede administrarse en la misma composición que dicho mioinositol y/o uno o más probióticos y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc. Alternativamente, uno o más de dicho mioinositol y/o uno o más de los probióticos y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc puede administrarse por separado a dicha vitamina B2, por ejemplo, la vitamina B2 (opcionalmente con mioinositol, y una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc) puede administrarse por separado con uno o más de dichos probióticos. La administración por separado puede ser simultáneamente, pero la administración por separado, por ejemplo, la vitamina B2 (opcionalmente con mioinositol, y una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc) puede administrarse al mismo tiempo pero por separado con uno o más de dichos probióticos, por ejemplo, en dos comprimidos administrados por separado y secuencialmente en rápida sucesión, por ejemplo, en 5, 4, 3, 2, 1 minuto, con uno o más de dichos probióticos.

La vitamina B2, opcionalmente junto con el mioinositol y/o uno o más de los probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc, se destina para la administración a una mujer que desea la gestación, a una gestante y/o a una mujer en período de lactancia. Particularmente, se ha de administrar a una mujer que desee la gestación y/o a una gestante. Más particularmente, se le administrará a una gestante.

Si la vitamina B2, opcionalmente junto con el mioinositol y/o uno o más de los probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc, se administra a una mujer que desea la gestación puede, por ejemplo, administrarse durante al menos 1, 2, 3 o 4 meses previos a la gestación o gestación deseada. Si la vitamina B2, opcionalmente junto con el mioinositol y/o uno o más de los probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o de zinc se administra a una gestante, puede administrarse a lo largo de la gestación o parcialmente durante toda la gestación, por ejemplo, durante al menos 4, al menos 8, al menos 12, al menos 16, al menos 20, al menos 24, al menos 28, o al menos 36 semanas dependiendo del período gestacional del sujeto. La administración también puede continuar durante todo, o parcialmente durante todo, el período de lactancia de dicho sujeto.

Dado que el riesgo de DMG aumenta en el segundo y tercer trimestre de la gestación, la administración puede ser particularmente beneficiosa en el segundo y tercer trimestre de la gestación.

La composición de la presente invención puede emplearse en forma de una composición, por ejemplo, una composición nutritiva en polvo, un producto alimenticio, un producto alimenticio funcional, una bebida, un producto lácteo, una formulación farmacéutica, un pienso para animales domésticos, un nutracéutico, un complemento nutritivo, por ejemplo, un complemento nutritivo en polvo, por ejemplo, para espolvorearse sobre la comida o disolverse en un medio acuoso, por ejemplo, agua o zumo, o leche.

Cuando la composición está en forma de una composición nutritiva en polvo puede comprender además una fuente de proteínas, una fuente de hidratos de carbono y una fuente de lípidos, posiblemente junto con lecitina. Además puede comprender lecitina de soja y/o un agente de carga. La fuente de proteína puede ser leche en polvo o leche descremada en polvo. Como fuente de hidrato de carbono puede usarse sacarosa y/o maltodextrina. La fuente de lípido puede ser aceite vegetal. La formulación puede contener, además, alternativa o adicionalmente jarabe de glucosa, grasa de leche, citrato de magnesio, sales y ésteres de colina, fibras prebióticas, y/o palmitato de ascorbilo. Los compuestos de sabor, tales como polvo de cacao o miel, por ejemplo, pueden añadirse para proporcionar variaciones del gusto.

La composición de la presente invención también puede utilizarse junto con otras vitaminas y minerales. Por ejemplo, vitaminas y minerales recomendados por un organismo gubernamental, tal como la USRDA (*United States recommended daily allowance*, cantidad diaria recomendada por los Estados Unidos), para la complementación durante la gestación, por ejemplo, calcio, magnesio, fósforo, hierro, cobre, yodo, selenio, vitamina A o equivalente de la actividad de retinol (RAE), por ejemplo,  $\beta$  caroteno o una mezcla de carotenoides, vitamina C, vitamina B1, niacina, ácido fólico, biotina, vitamina E.

Puede ser particularmente beneficioso si la composición de la invención se usa junto con uno o más de los siguientes micronutrientes en las siguientes cantidades: de 100 a 2500 mg de calcio, de 35 a 350 mg de magnesio, de 70 a 3500 mg de fósforo, de 2,7 a 45 mg de hierro, de 0,1 a 10 mg de cobre, de 22 a 1,100 µg de yodo, de 6 a 400 µg de selenio, de 77 a 3000 µg de vitamina A o equivalente de actividad de retinol (RAE), por ejemplo, en forma de beta caroteno o una mezcla de carotenoides, de 8,5 a 850 mg de vitamina C, de 0,14 a 14 mg de vitamina B1, de 1,8 a 35 mg de niacina, de 60 a 1000 µg de ácido fólico, de 3 a 300 µg de biotina, de 1,9 a 109 µg de Vitamina E.

La composición de la invención también puede usarse ventajosamente junto con al menos un oligosacárido y/o al menos uno de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, como el ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA). Los oligosacáridos y los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga pueden usarse en cualquier concentración segura para la administración al sujeto.

La composición de la invención también puede usarse junto con otros ingredientes usados comúnmente en forma de composición en la que se emplee, por ejemplo, un complemento nutritivo o un producto alimenticio en polvo. Como ejemplos no limitantes de tales ingredientes se incluyen: otros nutrientes, por ejemplo, seleccionados del grupo de lípidos (opcionalmente además de DHA y ARA), hidratos de carbono y proteínas, micronutrientes (además de los indicados anteriormente), o agentes farmacéuticamente activos; aditivos alimenticios convencionales, tales como antioxidantes, estabilizantes, emulsionantes, acidulantes, espesantes, tampones o agentes ajustadores del pH, agentes quelantes, colorantes, excipientes, saporíferos, agentes osmóticos, portadores farmacéuticamente aceptables, conservantes, azúcares, edulcorantes, texturizantes, emulsionantes, agua y cualquier combinación de estos.

Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, una alta ingesta de grasas durante la gestación y/o la complementación materna con PUFA se ha relacionado con un mayor riesgo de aumento de adiposidad en la descendencia. En consecuencia, en una realización particular, la composición de la invención no se usa junto con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y/o grasas animales y/o grasas vegetales.

En una realización particular, la composición de la invención no se usa junto con un oligosacárido.

Como se ha indicado anteriormente, la DMG se asocia a una variedad de afecciones que afectan a la gestante y/o a su descendencia. Se considera que la DMG está asociada a una afección si ésta aumenta el riesgo de un sujeto que tiene o que desarrolla esa afección durante la gestación, durante el nacimiento, después del nacimiento o más tarde en la vida de dicha gestante o su descendencia.

Como ejemplos no limitantes de afecciones asociadas a la DMG, que afectan a la gestante y/o a su descendencia, se incluyen; parto pretérmino y por cesárea, traumatismo durante el parto para la madre o el bebé, distocia de hombros, macrosomía, excesiva concentración de glucemia de la descendencia, exceso de peso/adiposidad y trastornos metabólicos asociados, p. ej., diabetes de tipo II, esteatosis hepática y obesidad inmediatamente después del nacimiento y más tarde en la vida de la descendencia, y un mayor riesgo para la madre de tener o desarrollar diabetes de tipo 2 inmediatamente después del nacimiento y más tarde en la vida. En consecuencia, al tratar o prevenir la DMG, la vitamina B2, opcionalmente junto con mioinositol y/o uno o más probióticos y una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc, también puede usarse para tratar o prevenir estas afecciones en estas gestantes o en su descendencia.

En otro aspecto que no forma parte de la invención, la composición de la presente invención es para su uso en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento o la prevención de la DMG y afecciones asociadas a esta en una gestante y/o en su descendencia, en donde dicho medicamento se administra a dicha gestante antes y/o durante la gestación y/o durante el periodo de lactancia.

La DMG es más prevalente entre sujetos que la padecieron en una gestación anterior, si el sujeto tiene sobrepeso o es obeso, si hay antecedentes familiares de DMG o diabetes de tipo II. Si el sujeto es un ser humano y mayor de 25 años y si el sujeto es un ser humano y es de raza negra, hispana, india americana o asiática.

En consecuencia, la composición de la invención puede ser particularmente beneficiosa para el tratamiento y/o la prevención de DMG en uno o más de estos subconjuntos de sujetos.

Los expertos en la materia comprenderán que todas las características de la presente invención desveladas en el presente documento pueden combinarse libremente. Particularmente, las características descritas en las diferentes realizaciones de la presente invención pueden combinarse. Cuando existen equivalentes conocidos para las características específicas, tales equivalentes se incorporan como si se hubiesen mencionado específicamente en la presente memoria descriptiva. Otras ventajas y características de la presente invención resultarán ser obvias a partir de las figuras y ejemplos no limitativos.

La presente invención se describirá ahora más detalladamente a través de los siguientes ejemplos.

## Ejemplos

**Ejemplo 1**

En la tabla 1 se expone un ejemplo de composición que comprende vitamina B2 junto con mioinositol, vitaminas B6, B12 y D, y *Lactobacillus rhamnosus* GG<sup>1</sup> y *Bifidobacterium lactis* BB12<sup>2</sup>.

La composición en la Tabla 1 es un complemento nutritivo en forma de polvo destinado a espolvorear sobre los alimentos.

Tabla 1: Composición del Ejemplo 1

Ingrediente	Cantidad por dosis diaria
Mioinositol	4 g
Vitamina D	10 µg
Vitamina B6	2,6 mg
Vitamina B12	5,2 µg
Vitamina B2	1,8 mg
Zinc	10 mg
β-caroteno	720 µg
Ácido fólico	400 µg
Hierro	12 µg
Calcio	150 µg
Yodo	150 µg
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG <sup>1)</sup>	1x10 <sup>9</sup> ufc
<i>Bifidobacterium lactis</i> BB12 <sup>2)</sup>	1x10 <sup>9</sup> ufc
1) Cepa depositada como CGMCC 1.3724	
2) Cepa depositada como CNCM I-3446	

La composición puede proporcionarse como un kit de partes que comprende, en un sobre, el probiótico en forma de polvo y en otro sobre los restantes ingredientes.

**Ejemplo 2**

Se suministra una bebida de leche en polvo que se reconstituye en agua a mujeres gestantes y que consiste en 30 g de leche en polvo por ración, mezclada con los ingredientes enumerados en la Tabla 1, en la mitad de las cantidades indicadas en dicha Tabla. La composición debe administrarse a una mujer gestante dos veces al día durante al menos el tercer trimestre de la gestación.

**Ejemplo 3**

El efecto de la vitamina B2 sobre la captación de glucosa en miocitos L6 diferenciados, se midió después de periodos de tiempo de incubación cortos (2 horas) y largos (24 horas).

El ingrediente G se refiere a vitamina B2, el ingrediente K se refiere a 1,25-dihidroxivitamina D3 y el ingrediente J se refiere a cloruro de zinc.

El ingrediente G se probó a 1 µM. El ingrediente K se probó a 10 nM, y el ingrediente J se probó a 20 µM.

El día del experimento, los ingredientes se diluyeron en un medio asérico (DMEM) que contenía D-glucosa 5,5 mM hasta obtener las concentraciones finales probadas y DMS al 0,1 %.

Los mioblastos L6 se mantuvieron en medio de crecimiento o DMEM con glucosa 25 mM complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Para el estudio de captación de glucosa, las células se cultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de 1000-1500 células/pocillo en 0,5 ml de medio de crecimiento. Cinco días después de la siembra, la inducción de la diferenciación en miotubos se llevó a cabo en DMEM con glucosa 25 mM que contenía FBS al 2 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin a 37 °C bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. El medio de cultivo se cambió cada dos días.

Para la incubación durante un periodo de tiempo corto (2 horas), el día antes de la prueba, el medio de cultivo se reemplazó por DMEM con D-glucosa 25 mM que contenía BSA al 0,25 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. El día después y antes de la prueba, las células se lavaron y se incubaron en DMEM que contenía D-glucosa 5,5 mM, BSA al 0,25 % en presencia de los ingredientes durante 2 horas sin insulina.

Para la incubación durante un periodo de tiempo largo (24 horas), el día antes de la prueba, las células se preincubaron en presencia de los ingredientes probados (ingrediente J, K, o una combinación de estos) durante 22 horas en DMEM con D-glucosa 25 mM que contenía BSA al 0,25 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin, en ausencia de insulina. El día después y antes de la prueba, las células se lavaron y se incubaron en presencia de los ingredientes

probados durante 2 horas más en DMEM que contenía D-glucosa 5,5 mM, BSA al 0,25 % sin insulina.

La captación de glucosa se midió incubando las células durante 15 min con 2-desoxi-D-[1,2 3H] glucosa radiomarcada. La captación de glucosa se detuvo con dos etapas de lavado en PBS 1X helado. Después, las células se disolvieron en NaOH 0,1 N durante 30 min. A continuación, se efectuó el recuento de la radioactividad asociada a las células y la cuantificación de proteínas se determinó utilizando el método colorimétrico de Lowry.

Cada ingrediente se probó por triplicado.

Los resultados se expresan en pmoles de glucosa incorporada/min/mg de proteína y en % de control o condición basal (100 %).

Se realizó un análisis estadístico que permitía efectuar comparaciones múltiples (ANOVA unidireccional seguido de la prueba de la *t* de Dunnett; \**P* < 0,05, \*\**P* < 0,01, \*\*\**P* < 0,001 frente a la condición de control). Todos los ingredientes que mostraron un aumento significativo de la captación de glucosa en comparación con el control o con condición basal, se consideraron activos.

Los resultados se muestran en las Figuras 3 a 5.

Como puede apreciarse en la figura 3, se observaron aumentos de la captación de glucosa en miocitos L6 diferenciados con el ingrediente G después de incubar durante un periodo de tiempo corto (2 horas) y largo (24 horas) en ausencia de insulina.

Como puede apreciarse en la figura 4, se observaron aumentos de la captación de glucosa en miocitos L6 diferenciados con la combinación de ingrediente G e ingrediente K después de incubar durante un periodo de tiempo corto (2 horas) y largo (24 horas) en ausencia de insulina.

Como puede apreciarse en la figura 5, se observaron aumentos de la captación de glucosa en miocitos L6 diferenciados con la combinación de ingrediente G, K e ingrediente J después de incubar durante un periodo de tiempo corto (2 horas) en ausencia de insulina.

#### Ejemplo 4

#### Animales

Los ratones y ratonas heterocigotos(as) db/db (Leprdb/+) procedían originalmente de Jackson Laboratories (EE. UU.), y de una colonia reproductora establecida (Ruakura, Nueva Zelanda).

Las ratonas se genotipificaron y después se destetaron a los 21 días de vida, y tanto los ratones de tipo natural (TN)

(Lepr +/+) como los heterocigotos (Leprdb/+) se alimentaron con la dieta AIN-93G (composición especificada en la tabla 2). A los 28 días de vida se les realizó una prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO) y después se asignaron al azar a una de las 4 dietas

- 1 - AIN-93G control
- 2 - AIN-93G complementada con mioinositol
- 3 - AIN-93G complementada con Vitamina B2
- 4 - AIN-93G complementada con mioinositol y Vitamina B2

La composición de AIN-93G se especifica en la tabla 2.

Se realizó otra PTGO antes y después de la dieta experimental.

Todas las PTGO se realizaron de la misma manera. Resumiendo, los ratones se mantuvieron en ayunas durante 6 horas (desde las 7 de la mañana (a.m.) a la 1 de la tarde (p.m.)). La glucosa en ayunas se midió en sangre extraída de la punta de la cola con un glucómetro portátil (glucómetro Freestyle Optimum de Abbott). El ratón se expuso después a glucosa - 2 g/kg suministrados por sonda gástrica. La concentración de la glucemia se midió con el glucómetro al cabo de 30, 60, 90 y 120 minutos de la exposición a la glucosa.

A las 12 semanas de vida, las ratonas se instalaron en jaulas con un macho del mismo genotipo hasta que se observó un tapón vaginal, indicativo del día 0,5 de la gestación (gestación a término =19,5 días). Las ratonas se mantuvieron en su dieta experimental asignada durante toda la gestación. El día 16,5 de la gestación se realizó una PTGO.

El día 18,5 de la gestación, las ratonas se sacrificaron después de un ayuno de 6 horas. Se extrajeron muestras de sangre y de panículo de grasa retroperitoneal en ayunas.

Tabla 2: Dieta AIN-93G

Producto # D10012G		% en gramos	% en Kcal
Proteína		20	20,3
Hidrato de carbono		64	63,9
Grasa		7	15,8
	kcal/g Total	3,9	
Ingrediente		Gramos	Kcal
Caseína, malla 30		200	800
L-Cistina		3	12
Almidón de maíz		397	1590
Maltodextrina		132	528
Sacarosa		100	400
Celulosa		50	0
Aceite de soja		70	630
t-Butilhidroquinona		0,014	0
Mezcla mineral S10022G		35	0
Mezcla de vitaminas V10037		10	40
Bitartrato de colina		2,5	0
Total		1000	4000

Tabla 2b - Mezcla de Vitaminas añadida a AIN-93G

Ingrediente	Gramos	Cantidad en 10 g
Vitamina A, Acetato (500.000 UI/g)	0,8	4000 UI
Vitamina D3 (100.000 UI/g)	1	1.000 UI
Acetato de Vitamina E (500 UI/g)	15	75 UI
Filoquinona	0,075	0,75 mg
Biotina, 1,0 %	2	0,2 mg
Cianocobalamina, 0,1 %	2,5	25 µg
Ácido fólico	0,2	2 mg
Ácido nicotínico	3	30 mg
Pantotenato de calcio	1,6	16 mg
Clorhidrato de Piridoxina	0,7	7 mg
Riboflavina	0,6	6 mg
Clorhidrato de Tiamina	0,6	6 mg
Sacarosa	971,925	
<b>TOTAL</b>	<b>1000</b>	

5

Tabla 2c - Cantidades complementadas de mioinositol y Vitamina B2 en dietas experimentales

Grupo de dieta	Cantidad de mioinositol presente	Cantidad de Vitamina B2 presente
<u>1</u>	0 g	dieta de 6 mg/kg
<u>2</u>	dieta de 10 g/kg	dieta de 6 mg/kg
<u>3</u>	0 g	dieta de 24 mg/kg
<u>4</u>	dieta de 10 g/kg	dieta de 24 mg/kg

## Resultados

Tabla 3 - Concentración de glucemia y ABC de ratonas TN y heterocigotas a las 4 semanas de vida. Media +/- e.e.m.

Genotipo	Glucemia a los 0 min (mmol/l)	Glucemia a los 30 min (mmol/l)	Glucemia a los 60 min (mmol/l)	Glucemia a los 90 min (mmol/l)	Glucemia a los 120 min (mmol/l)	ABC
TN	11,6 +/- 0,7	17,5 +/- 0,8	14,0 +/- 0,6	12,6 +/- 0,5	12,0 +/- 0,5	1710 +/- 59
Het	11,0 +/- 0,5	17,7 +/- 0,9	14,2 +/- 0,7	13,1 +/- 0,7	13,1 +/- 0,6	1710 +/- 68

10



Como puede apreciarse en la tabla 3 y en la figura 8, antes de la asignación al azar a las dietas experimentales, no hubo diferencias en la PTGO entre las hembras TN y las heterocigotas.

Tabla 4- mediciones de glucemia en ayunas (día 18,5 de la gestación) - datos presentados como media +/- e.e.m.

Grupo de dieta	Glucemia en ayunas el día 18,5 (mmol/l)
Grupo 1 TN	7,1 +/- 0,9
Grupo 1 Het	9,2 +/- 0,7
Grupo 2 Het	8,2 +/- 0,8
Grupo 3 Het	8,1 +/- 0,8
Grupo 4 Het	6,9 +/- 1,0

Como puede apreciarse en la figura 6, y a partir de los datos de la Tabla 4, las ratonas Het que recibieron administración de una combinación de vitamina B2 y mioinositol, parecían tener un nivel de glucemia más bajo en ayunas al final de la gestación en comparación con las ratonas Het que recibieron administración de mioinositol o probióticos únicamente o con las ratonas Het que no recibieron administración de mioinositol ni B2.

Tabla 5 - peso de los panículos adiposos retroperitoneales y grasa gonadal, media +/- e.e.m.

Grupo de dieta	Peso de los panículos adiposos retroperitoneales (g)	Grasa gonadal (g)
Grupo 1 TN	0,078 +/- 0,008	0,24 +/- 0,02
Grupo 1 Het	0,152 +/- 0,041	0,32 +/- 0,04
Grupo 2 Het	0,120 +/- 0,021	0,30 +/- 0,04
Grupo 3 Het	0,164 +/- 0,040	0,42 +/- 0,05
Grupo 4 Het	0,112 +/- 0,010	0,27 +/- 0,04

Como puede apreciarse en la figura 7 y/o en los datos en la tabla 5, las ratonas Het que recibieron administración de combinación de vitamina B2 y mioinositol, parecían tener menor peso de los panículos adiposos retroperitoneales y menor peso de grasa gonadal en comparación con las ratonas Het que recibieron administración de mioinositol o probióticos únicamente, o con las ratonas Het que no recibieron administración de mioinositol ni B2.

Tabla 6 - concentración de glucemia en ayunas después de una PTGO a las 12 semanas de vida. Media +/- e.e.m.

Grupo de dieta	0 min (mmol/l)	30 min (mmol/l)
Grupo 1 TN	9,1 +/- 1,1	21,7 +/- 1,9
Grupo 1 Het	8,3 +/- 0,4	17,6 +/- 1,2
Grupo 2 Het	7,5 +/- 0,8	16,7 +/- 1,2
Grupo 3 Het	8,4 +/- 1,0	17,1 +/- 1,5
Grupo 4 Het	6,9 +/- 0,8	16,6 +/- 1,9

Como puede apreciarse a partir de los datos de la Tabla 6, las ratonas Het que recibieron administración de vitamina B2 y/o una combinación de vitamina B2 y mioinositol, parecían tener una concentración de glucemia en ayunas inferior a las 12 semanas de vida (antes de la gestación) en comparación con las ratonas Het que no recibieron administración de mioinositol ni B2, o con las ratonas Het que recibieron administración de mioinositol.

Tabla 7 - Concentraciones de leptina en plasma, medidas el día 18,5 de la gestación. (Media +/- e.e.m)

	Leptina (ng/ml)
Grupo 1 TN	141,8 +/- 18,6
Grupo 1 Het	212,6 +/- 22,4
Grupo 2 Het	242,4 +/- 0,0
Grupo 3 Het	217,5 +/- 13,0
Grupo 4 Het	118,2 +/- 21,3

Como puede apreciarse a partir de los datos de la Tabla 7 y de la Figura 17, las ratonas Het que recibieron administración de vitamina B2 y mioinositol, parecían tener concentraciones más bajas de leptina en plasma el día 18,5 de la gestación, en comparación con las ratonas Het que no recibieron administración de mioinositol ni B2, o con las ratonas Het que recibieron administración de mioinositol.

Tabla 8 - Resultados de la prueba de tolerancia a la glucosa oral - medidos el día 16,5 de la gestación (media +/- e.e.m)

	Glucemia a los 0 min (mmol/l)	Glucemia a los 30 min (mmol/l)	Glucemia a los 60 min (mmol/l)	Glucemia a los 90 min (mmol/l)	Glucemia a los 120 min (mmol/l)	ABC
Grupo 1 TN	7,6 +/- 0,5	17,3 +/- 1,3	11,9 +/- 0,9	10,4 +/- 0,7	10,4 +/- 0,7	1438 +/- 86
Grupo 1 Het	7,2 +/- 0,4	17,3 +/- 1,4	12,9 +/- 0,6	11,2 +/- 0,7	11,2 +/- 0,7	1506 +/- 81
Grupo 2 Het	7,1 +/- 0,8	16,0 +/- 2,7	13,1 +/- 2,6	10,2 +/- 1,3	10,2 +/- 1,3	1439 +/- 158
Grupo 3 Het	7,0 +/- 0,5	13,8 +/- 1,7	11,5 +/- 0,5	10,1 +/- 0,4	10,1 +/- 0,4	1340 +/- 65
Grupo 4 Het	7,2 +/- 0,7	15,7 +/- 1,2	11,6 +/- 1	10,4 +/- 0,6	10,4 +/- 0,6	1376 +/- 86

- 5 Como puede apreciarse a partir de los datos de la Tabla 8, las ratonas Het que recibieron administración de B2 y/o una combinación de vitamina B2 y mioinositol, parecían tener menores concentraciones de glucemia en ayunas y ABC el día 16,5 de la gestación, en comparación con las ratonas Het que no recibieron administración de mioinositol ni B2.

#### Ejemplo 5

- 10 El efecto de la vitamina B2 sobre la captación de glucosa se midió en miocitos L6 diferenciados insulinoresistentes después de incubarlos durante un periodo de tiempo corto (2 horas) y largo plazo (24 h) en ausencia de insulina.

El ingrediente G se refiere a la vitamina B2 y se probó a 1  $\mu$ M.

- 15 El día del experimento, el ingrediente G se diluyó en un medio asérico (DMEM) que contenía D-glucosa 5,5 mM hasta alcanzar la concentración probada final y DMSO al 0,1 %.

- 20 Los mioblastos L6 se mantuvieron en medio de crecimiento o DMEM con glucosa 25 mM complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 %, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100  $\mu$ g/ml. Para el estudio de la captación de glucosa, las células se cultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de 1000-1500 células/pocillo en 0,5 ml de medio de crecimiento. Cinco días después de la siembra, la inducción de la diferenciación en miotubos se llevó a cabo en DMEM con glucosa 25 mM que contenía FBS al 2 %, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100  $\mu$ g/ml a 37 °C bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. El medio de cultivo se cambió cada dos días.

- 25 Para la incubación durante un periodo de tiempo corto (2 horas), el día antes de la prueba, las células se cultivaron en DMEM con D-glucosa 25 mM que contenía BSA al 0,25 %, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100  $\mu$ g/ml durante 18 horas. El día después y antes de la prueba, las células se lavaron y se incubaron durante 6 horas más en DMEM que contenía D-glucosa 5,5 mM, BSA al 0,34 %, palmitato (PALM) 300  $\mu$ M sin insulina. Dos horas antes de finalizar el tiempo de incubación, se añadió vitamina B2 al medio a una concentración final de 1  $\mu$ M.

- 30 Para la incubación durante un periodo de tiempo largo (24 horas), el día antes de la prueba, las células se preincubaron en presencia de vitamina B2 (1  $\mu$ M) durante 18 horas en DMEM con D-glucosa 25 mM que contenía BSA al 0,25 %, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100  $\mu$ g/ml en ausencia de insulina. El día después y antes de la prueba, las células se lavaron y se incubaron en presencia de la vitamina B2 (1  $\mu$ M) durante 6 horas más en DMEM que contenía D-glucosa 5,5 mM, BSA al 0,34 %, palmitato (PALM) 300  $\mu$ M sin insulina.

- 35 La captación de glucosa se midió incubando las células durante 15 min con 2-desoxi-D-[1,2-<sup>3</sup>H] glucosa radiomarcada. La captación de glucosa se detuvo con dos etapas de lavado en PBS 1X helado. Después, las células se disolvieron en NaOH 0,1 N durante 30 min. A continuación, se efectuó el recuento de la radioactividad asociada a las células y la cuantificación de proteínas se determinó utilizando el método colorimétrico de Lowry.

Cada ingrediente se probó por triplicado.

- 45 Los resultados se expresan en pmoles de glucosa incorporada/min/mg de proteína y en % del control.

Se realizó un análisis estadístico que permitía efectuar comparaciones múltiples (ANOVA unidireccional seguido de la prueba de la *t* de Dunnett; \**P* < 0,05, \*\**P* < 0,01, \*\*\**P* < 0,001 frente a la condición de control). Un ingrediente que mostró un aumento significativo de la captación de glucosa en comparación con un control se consideró activo.

- 50 Los resultados se muestran en la Figura 10.

## Ejemplo 6

5 Ochenta (80) hembras vírgenes Goto Kakizaki (GK) de 4-5 semanas de vida, con pesos corporales parecidos, se adquirieron en Charles River (Francia y EE. UU.), se instalaron individualmente en jaulas en una cámara con temperatura controlada ( $22 \pm 1$  °C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, y se mantuvieron con una dieta para roedores en crecimiento AIN-93G (Research diets, EE. UU., Tabla 9).

10 Después de una semana de aclimatación, las ratas GK se dividieron en 4 grupos (n = 20) después de una asignación al azar basándose en el valor del ABC de la glucosa y en el peso corporal, y durante 10 semanas recibieron su tratamiento correspondiente como se indica a continuación:

1. Grupo de control: ratas hembra GK se alimentaron a voluntad con una dieta AIN- 93G + una gelatina de control (Tabla 10).
- 15 2. Grupo de mioinositol: ratas hembra GK se alimentaron a voluntad con una dieta AIN93-G complementada con dieta de mioinositol (1 g de mioinositol\* por 100 g de dieta) + una gelatina de control (Tabla 10).
3. Grupo de probiótico: ratas hembra GK se alimentaron a voluntad con una dieta AIN93-G + una gelatina que contenía LPR  $10^9$  UFC y *B. lactis*  $10^9$  UFC (Tabla 10).
- 20 4. Grupo de mezcla: ratas hembra GK se alimentaron a voluntad con una dieta AIN93G complementada con dieta de mioinositol (1 g de mioinositol por 100 g de dieta) + una gelatina que contenía LPR  $10^9$  UFC y *B. lactis*  $10^9$  UFC (Tabla 10).

\*Kirsh Pharma

25 A las 15 semanas de vida, las hembras se instalaron en jaulas con machos Wistar (Charles Rivers, Francia) hasta que se observó un tapón vaginal, indicativo del día 0,5 de la gestación. Las ratas hembra permanecieron con su dieta experimental asignada durante toda la gestación. A los 16,5 días de gestación, se realizó una PTGO en todas las hembras (n = 20 por grupo) y a los 19,5 días de gestación la mitad de los animales (n = 9-11 por grupo) se sacrificaron después de 6 horas de ayuno.

30

Tabla 9: Dieta de investigación AIN-93G

Producto # D10012G		% en gramos	% en Kcal
Proteína		20	20,3
Hidratos de carbono		64	63,9
Grasa		7	15,8
	kcal/g Total	3,9	
Ingrediente		gramos	Kcal
Caseína, malla 30		200	800
L-Cistina		3	12
Almidón de maíz		397	1590
Maltodextrina		132	528
Sacarosa		100	400
Celulosa		50	0
Aceite de soja		70	630
t-Butilhidroquinona		0,014	0
Mezcla mineral S10022G		35	0
Mezcla de vitaminas V10037		10	40
Bitartrato de colina		2,5	0
Total		1000	4000

Tabla 10: Composición de la Gelatina experimental

	Tratamiento	Control
Gelatina (g)	12	12
Sacarina (mg)	0,06	0,06
Probiótico (g)*	7,7	0
Mezcla de maltodextrina (g)	0	6,7
TS + Agua (ml)	80,2	81,2
Total (ml)	99,96	99,96

\* Premezcla que contiene  $2,53 \times 10^{10}$  ufc/g de *Lactobacillus rhamnosus* (NCC4007) y  $1,58 \times 10^{10}$  ufc/g de *Bifidobacterium lactis* (NCC2818).

Mediciones y análisisMediciones fisiológicas y colecciones de muestras:

- 5 • Se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO) tras 6 horas de privación diurna (de 7,30 am. a 13,30 pm) en todos los animales a la edad de 5 semanas y a los 16,5 días de gestación. Durante la PTGO se extrajeron dos muestras de sangre de referencia de la vena de la cola, con al menos 10 minutos de intervalo entre el muestreo (tiempo -10 y 0), seguido de una sonda oral de solución de glucosa (20 % en p/v) en dosis de 1,5 g/kg de peso corporal. A continuación, se extrajeron más muestras de sangre a partir de una incisión en la cola a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min después de la administración de glucosa. Todas las muestras de sangre se analizaron directamente para determinar el nivel de glucemia utilizando glucómetros Contour Next (Bayer AG, Zurich, Suiza).
- 10 • El peso corporal y la ingesta de alimento de los animales se midieron 2 veces/semana durante todo el estudio.
- 15 • La composición corporal (grasa corporal, masa magra y contenido de agua corporal) se midió antes y después de 10 semanas de tratamiento utilizando resonancia magnética nuclear (EchoMRI TM 2004, Echo Medical Systems, Houston, EE. UU.). A partir de estos datos recogidos fue posible calcular el % de grasa delta y la relación de ganancia de grasa/ganancia de peso de la siguiente manera:
- 20 • El % de grasa delta: (% de grasa al final del tratamiento - % de grasa antes de iniciar el tratamiento)
- ganancia de grasa/ganancia de peso: (grasa (g) al final del período de tratamiento - grasa (g) antes de iniciar el tratamiento)/(peso corporal (g) al final del período de tratamiento - peso corporal (g) antes de iniciar el tratamiento)
- 25 • ganancia de carne magra/ganancia de peso: (carne magra (g) al final del período de tratamiento - carne magra (g) antes de iniciar el tratamiento)/(peso corporal (g) al final del período de tratamiento - peso corporal (g) antes de iniciar el tratamiento)
- 30 • ganancia de grasa: grasa (g) al final del período de tratamiento - grasa (g) antes de iniciar el tratamiento
- ganancia de carne magra: carne magra (g) al final del período de tratamiento - carne magra (g) antes de iniciar el tratamiento
- 35 • % de masa grasa: masa grasa (g)/peso corporal\*100
- % de masa magra: masa magra (g)/peso corporal\*100
- 40 Sacrificio: las madres se decapitaron después de 6 horas de privación diurna (de 7.30 am a 13.30 pm) y los órganos se extrajeron mediante disección, se pesaron e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Se conservaron a -80 °C hasta su análisis.
- 45 • Medición de la Insulina pancreática: El páncreas se pesó durante el sacrificio y se conservó en una solución de ácido-etanol-H<sub>2</sub>O hasta la extracción de la insulina. Para la determinación de la insulina pancreática, el páncreas se homogenizó con una solución de ácido-etanol (v/v: 75 % de etanol, 1,5 % de HCl al 37 % y 23,5 % de agua destilada) y se incubó a -20 °C durante la noche. El contenido de insulina en el sobrenadante se midió por un método de ELISA utilizando kits de Crystal Chem. Inc (IL, USA).

Resultados: El valor medio de cada medición se muestra en la Tabla 9. En las Figuras 11 a 14 también pueden observarse los resultados del % de grasa delta, ganancia de grasa/ganancia de peso, µg de insulina pancreática/g de páncreas.

**Tabla 11**

	Control	Mioinositol	Probióticos	Mezcla (mioinositol+probióticos)
% de masa de grasa	19,5	18,7	19,3	18,1
% de masa magra	66,4	67,8	67,3	68,3
% de grasa delta	8,8	7,7	8,4	6,8
Ganancia de grasa/ganancia de peso	0,28	0,27	0,27	0,24
Ganancia de carne magra/ganancia de peso	0,57	0,58	0,58	0,60
% de ganancia de grasa	27,6	26,6	27,3	24,7

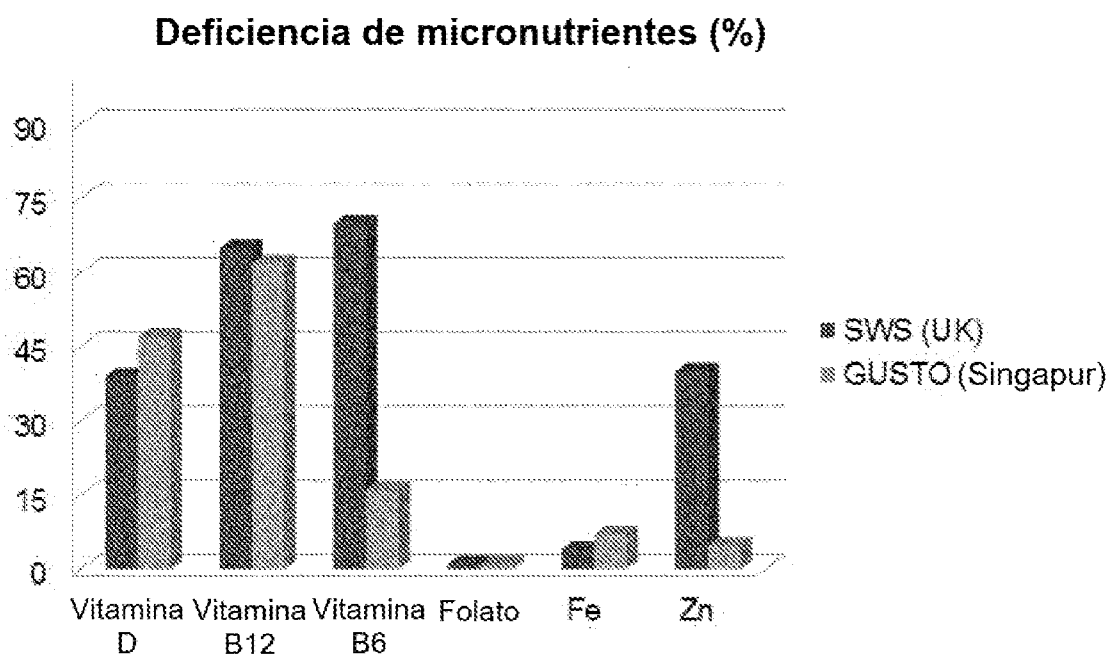
(continuación)

	Control	Mioinositol	Probióticos	Mezcla (mioinositol+probióticos)
% de ganancia carne magra	57,4	58,3	58,5	60,3
Ganancia de peso corporal	107	100	105	102
Ganancia de grasa (g)	29,8	26,8	28,8	25,3
Ganancia magra (g)	61,7	58,5	61,3	61,5
µg de insulina pancreática/g de páncreas	101	101	98,5	110,3
ABC del aumento de insulina	2	5	-2	13
FGIR	3,44	3,42	3,24	4,21
HOMA1-IR	10,42	9,29	9,76	9,07

REIVINDICACIONES

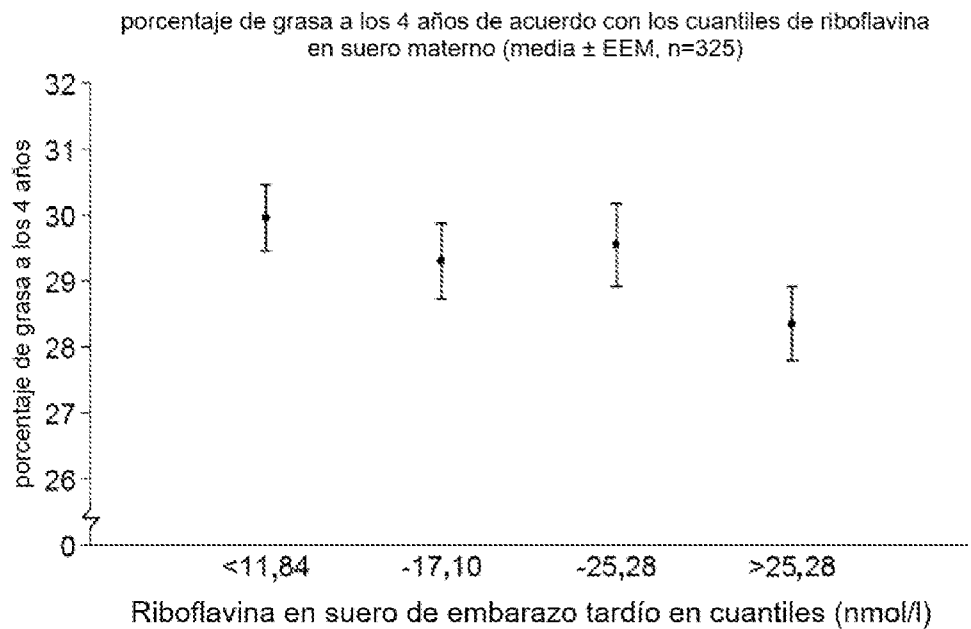
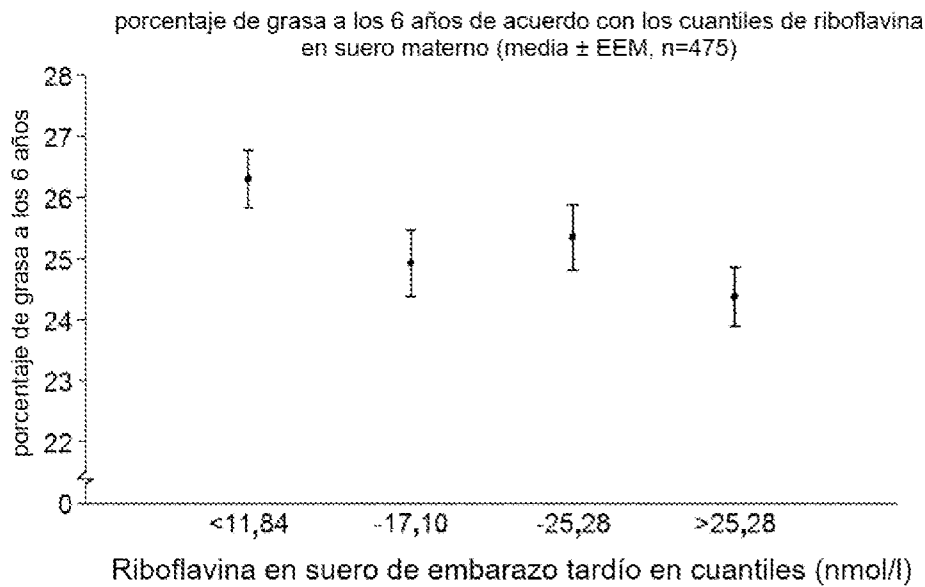
- 5 1. Una composición para la administración materna que comprende mioinositol y vitamina B2, y que comprende vitamina B6, vitamina B12, vitamina D, y una combinación de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, en donde el *Bifidobacterium* es la cepa BB12 de *Bifidobacterium lactis* depositada como CNCM I-3446, y el *Lactobacillus* es la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* disponible con el número de depósito CGMCC 1.3724.
- 10 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que la composición es para administrar a una mujer que desee la gestación, a una mujer gestante o a una mujer en período de lactancia.
3. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición está en forma de una composición nutritiva en polvo para reconstituirse en leche o agua, un producto alimenticio, una bebida, un complemento nutritivo o un nutracéutico.
- 15 4. Un kit de partes que comprende:
- 20 a) los ingredientes mioinositol, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina D y una combinación de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, en donde el *Bifidobacterium* es la cepa BB12 de *Bifidobacterium lactis* depositada como CNCM I-3446 y el *Lactobacillus* es la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* disponible con el número de depósito CGMCC 1.3724; y
- b) al menos dos composiciones separadas físicamente, comprendiendo, cada una de ellas, al menos uno de dichos ingredientes, caracterizada por que al menos una de las composiciones separadas físicamente comprende mioinositol y al menos una de las composiciones separadas físicamente comprende vitamina B2.

**Figura 1**



**Figura 2**

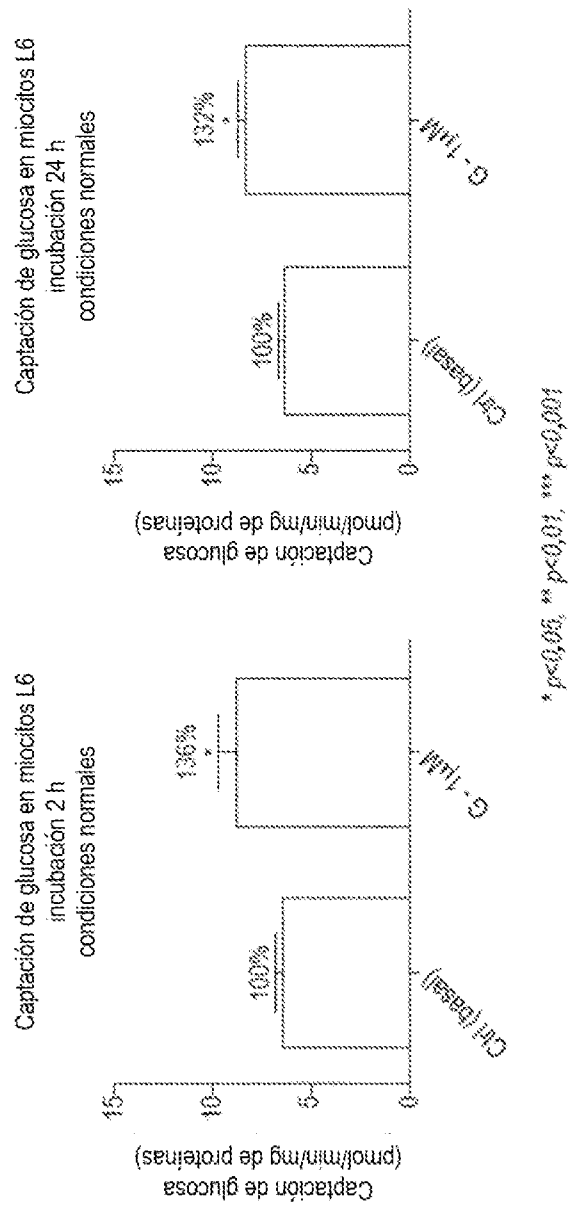
A)



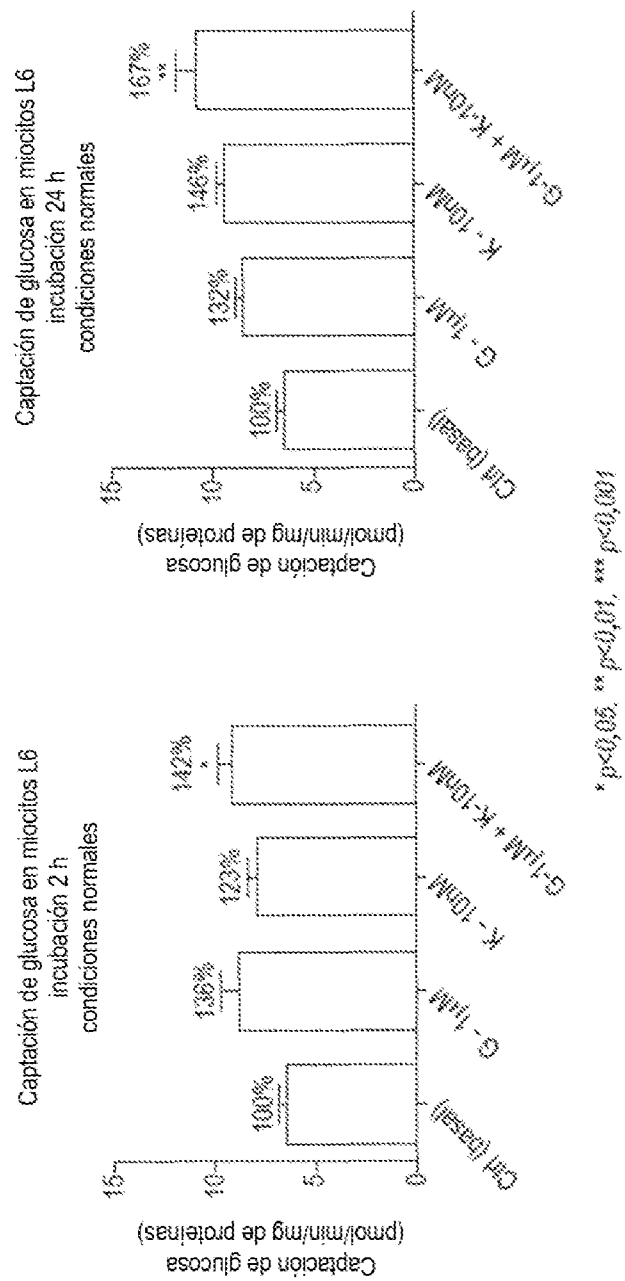
B)



**Figura 3**



**Figura 4**



**Figura 5**

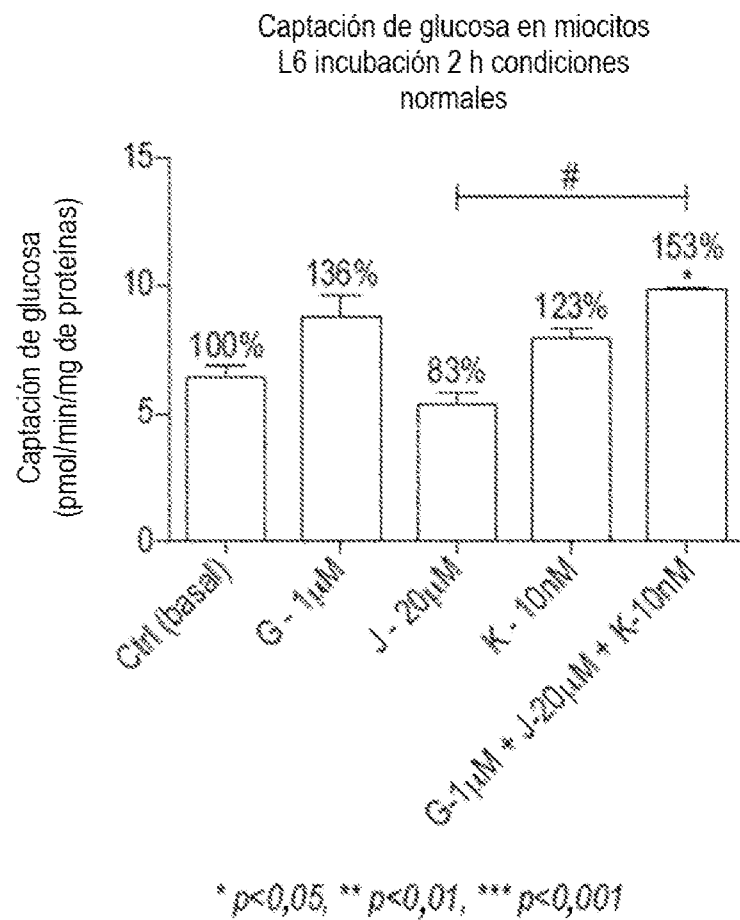


Figura 6

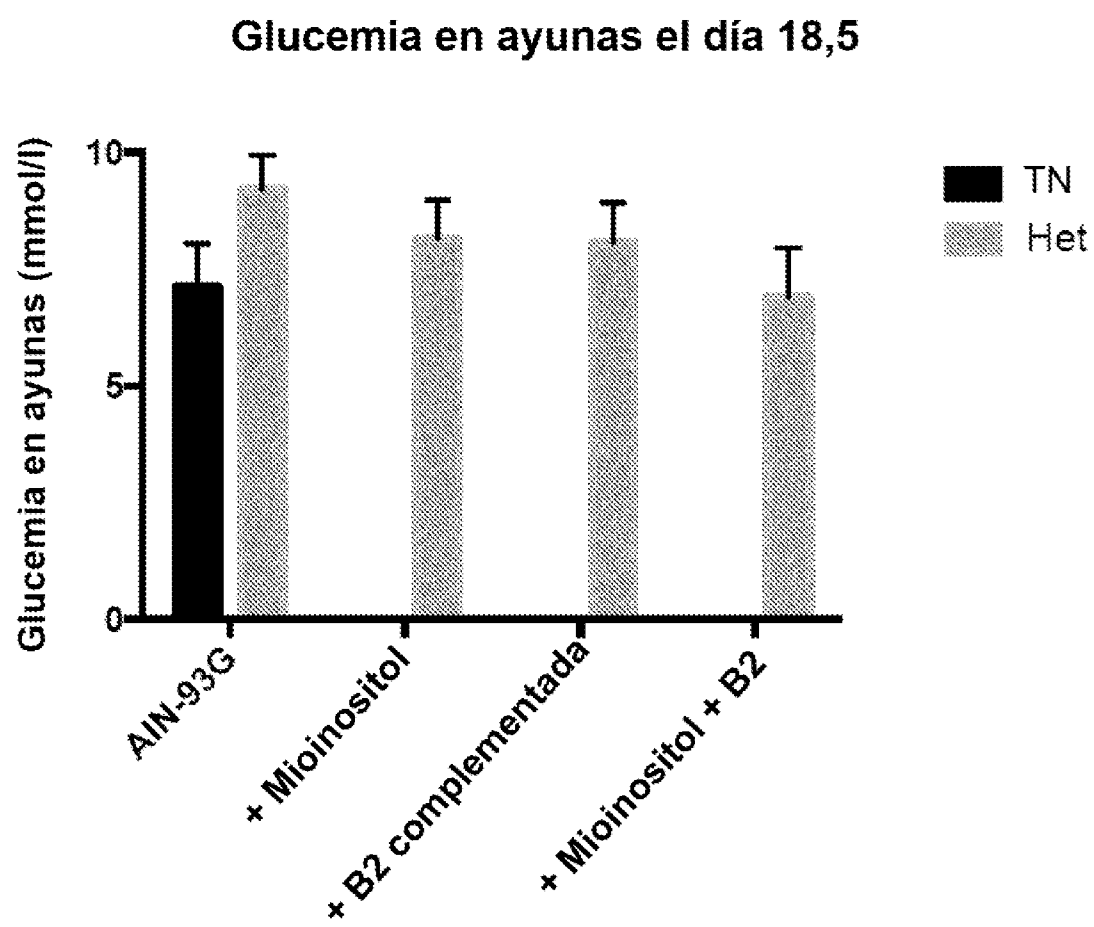


Figura 7

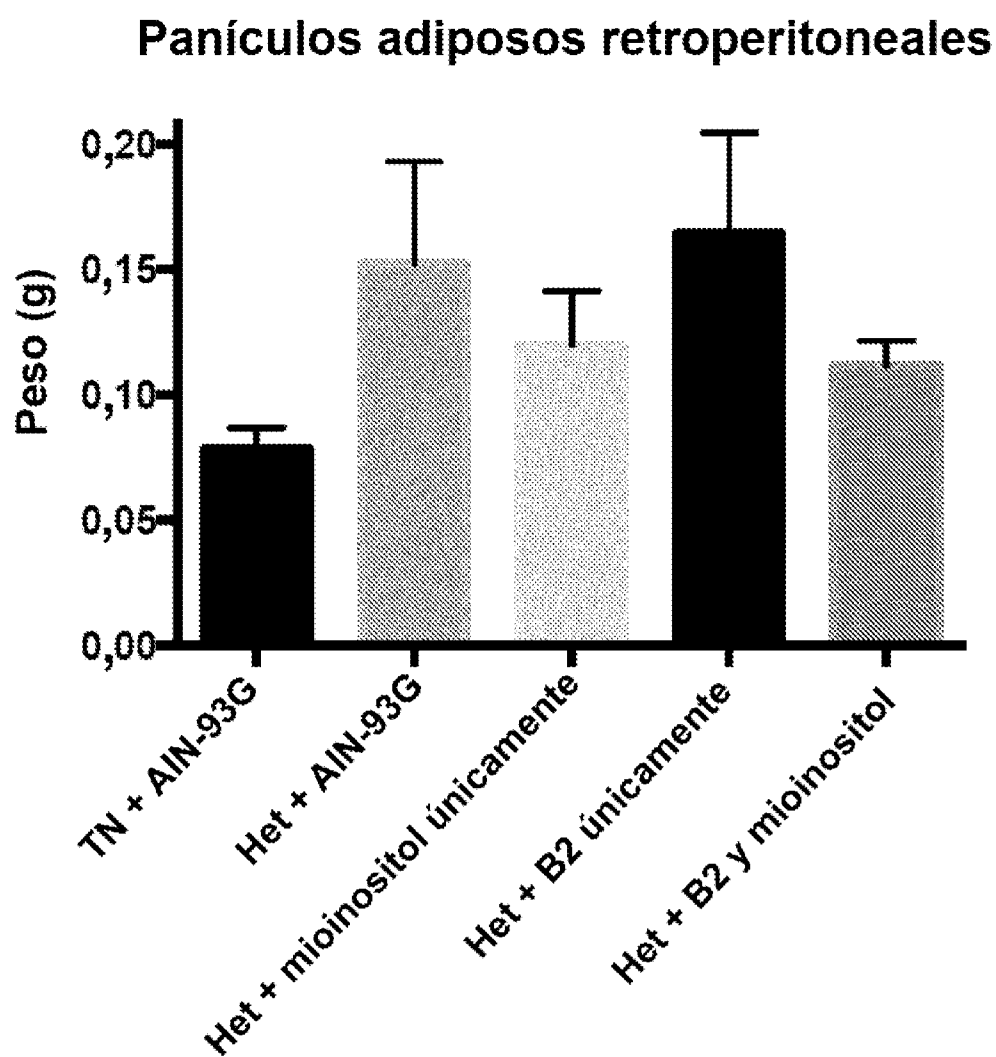
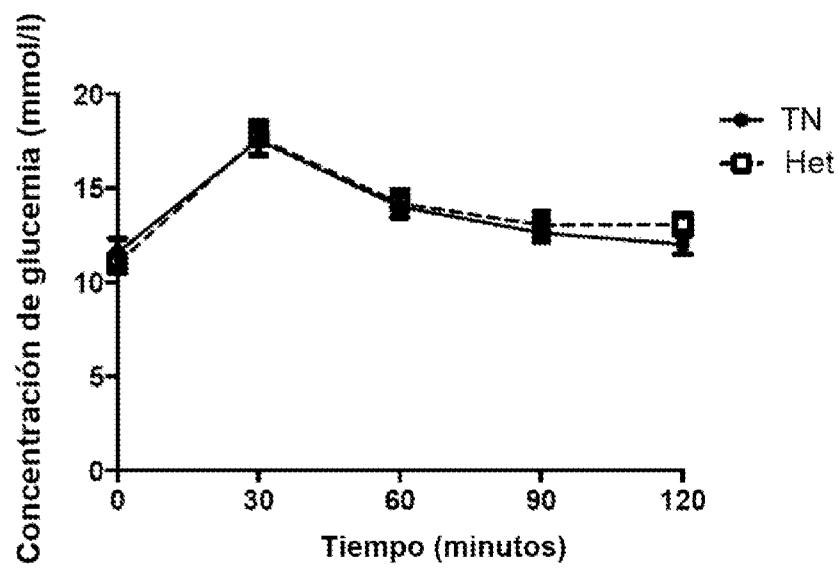
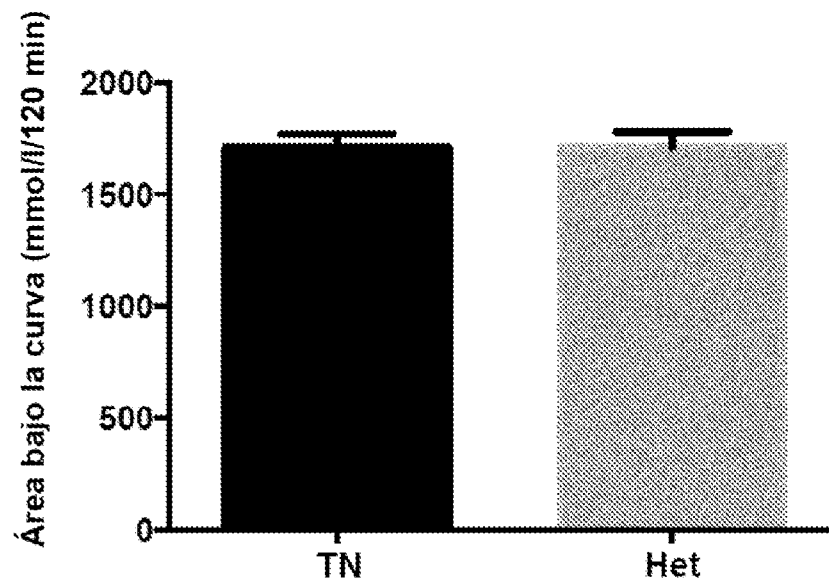
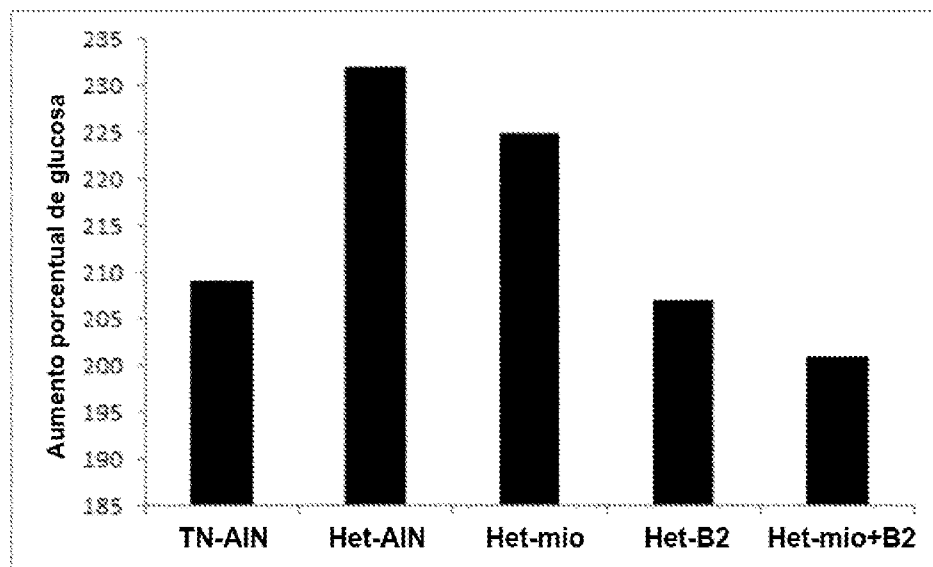


Figura 8



**Figura 9**



**Figura 10**

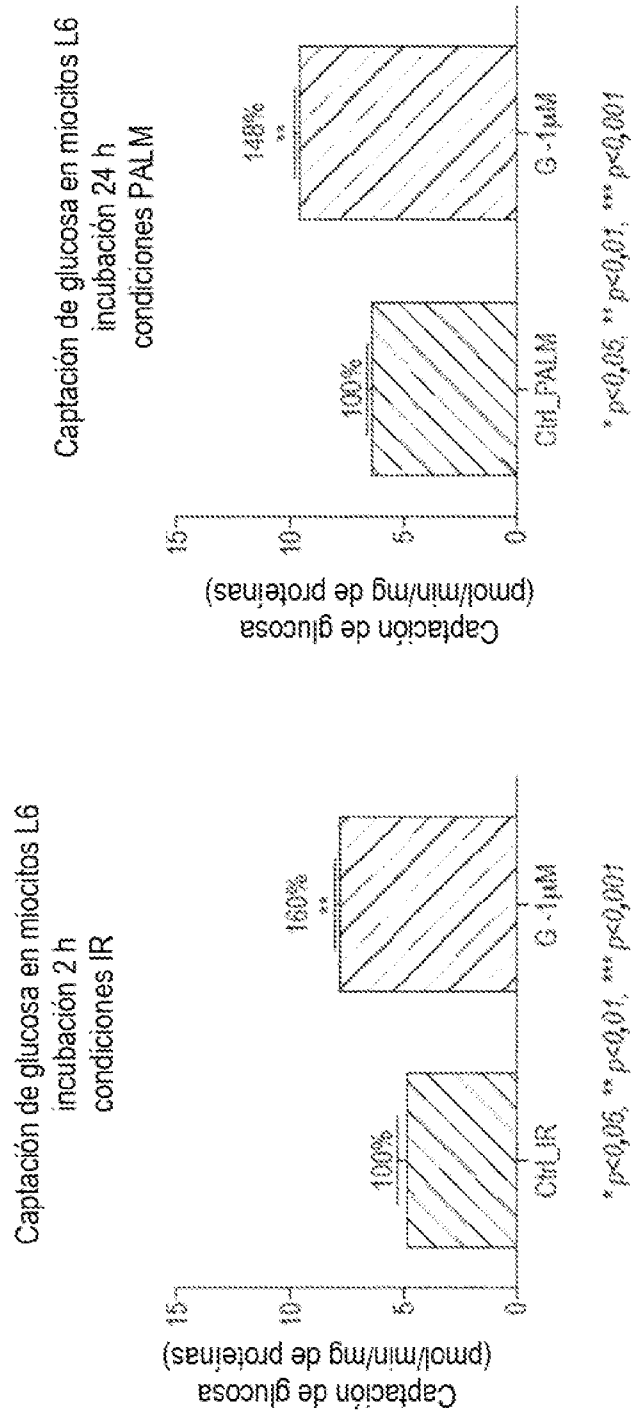




Figura 11

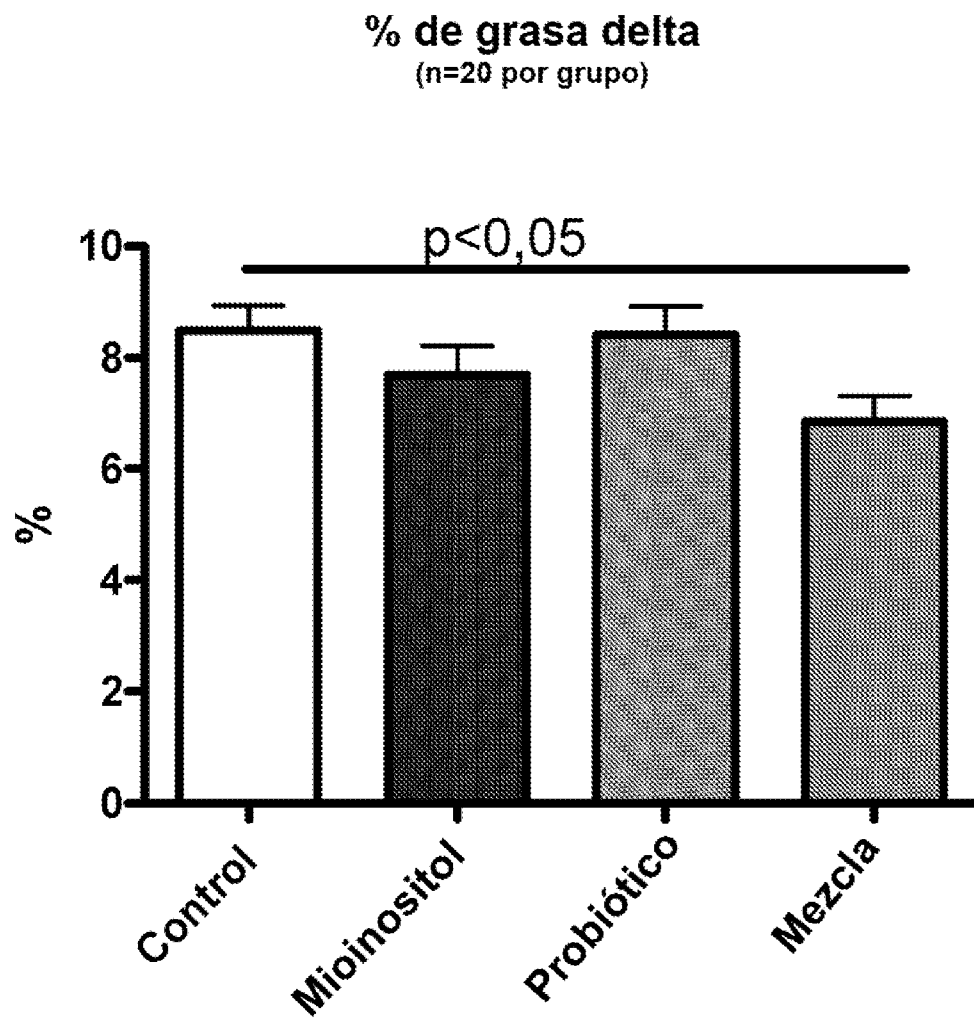
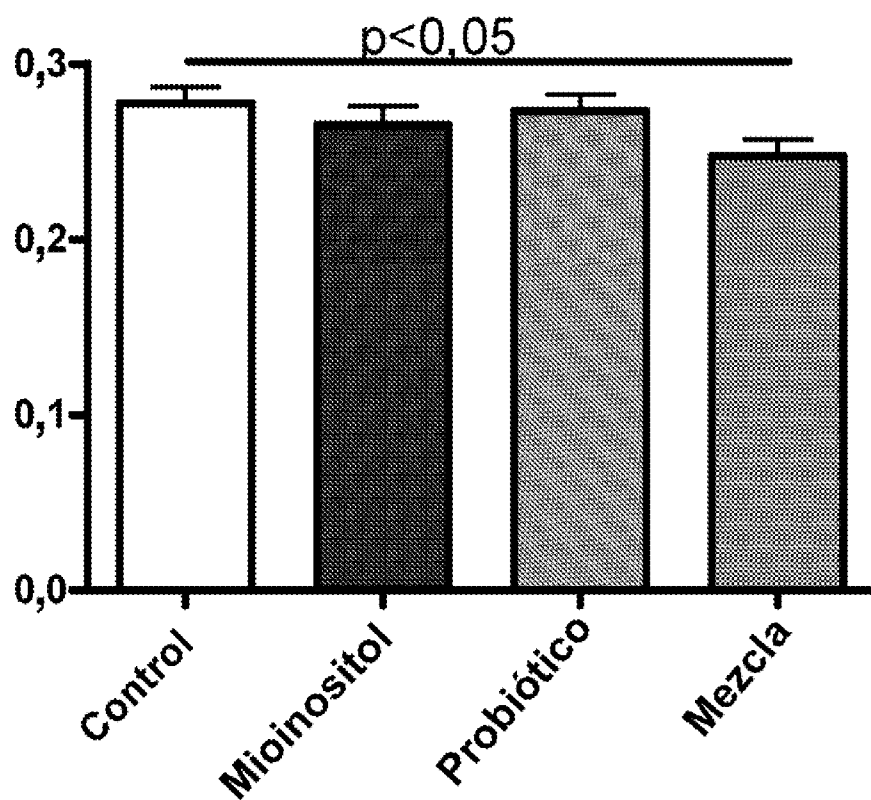


Figura 12

**ganancia de grasa/ganancia de peso**  
(n=20 por grupo)



**Figura 13**

**Insulina pancreática**

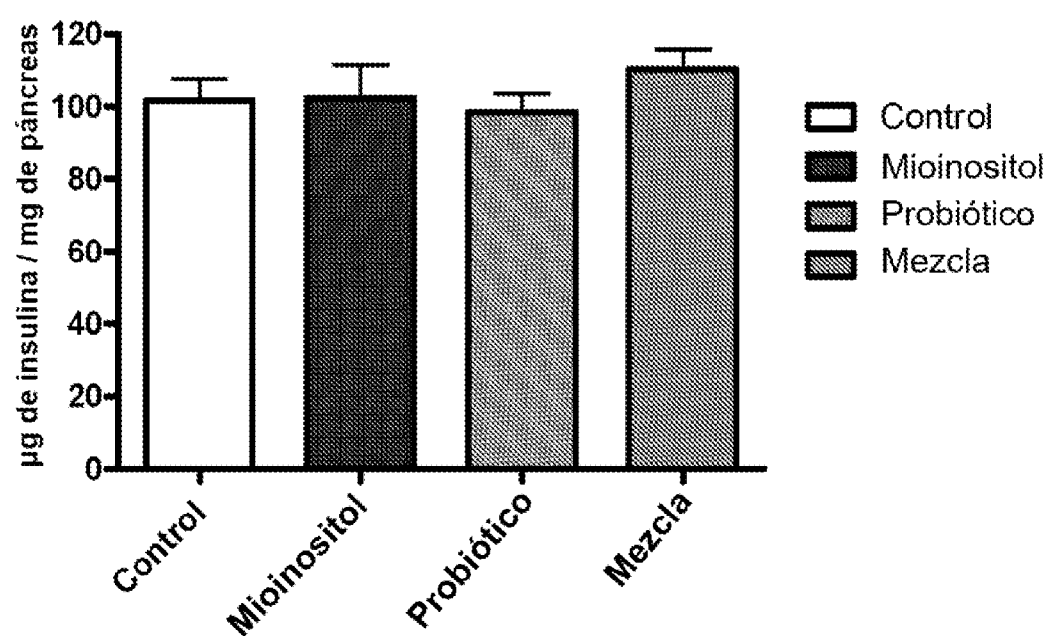
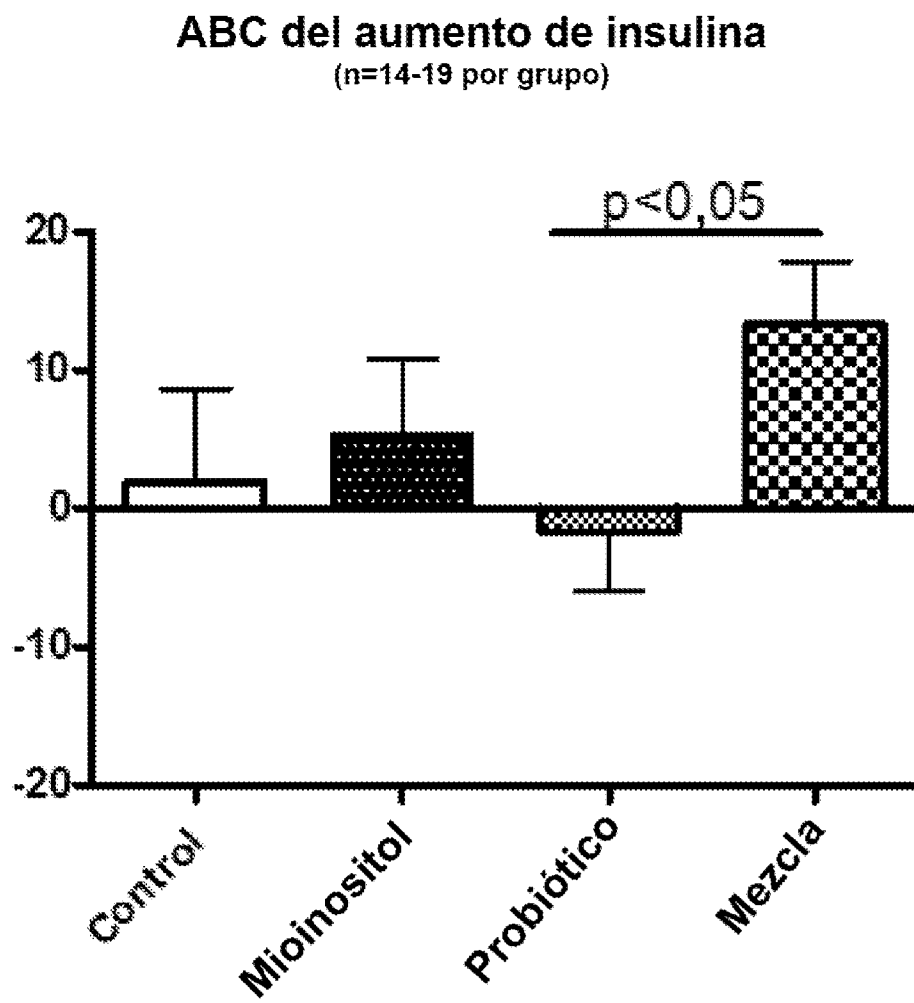


Figura 14



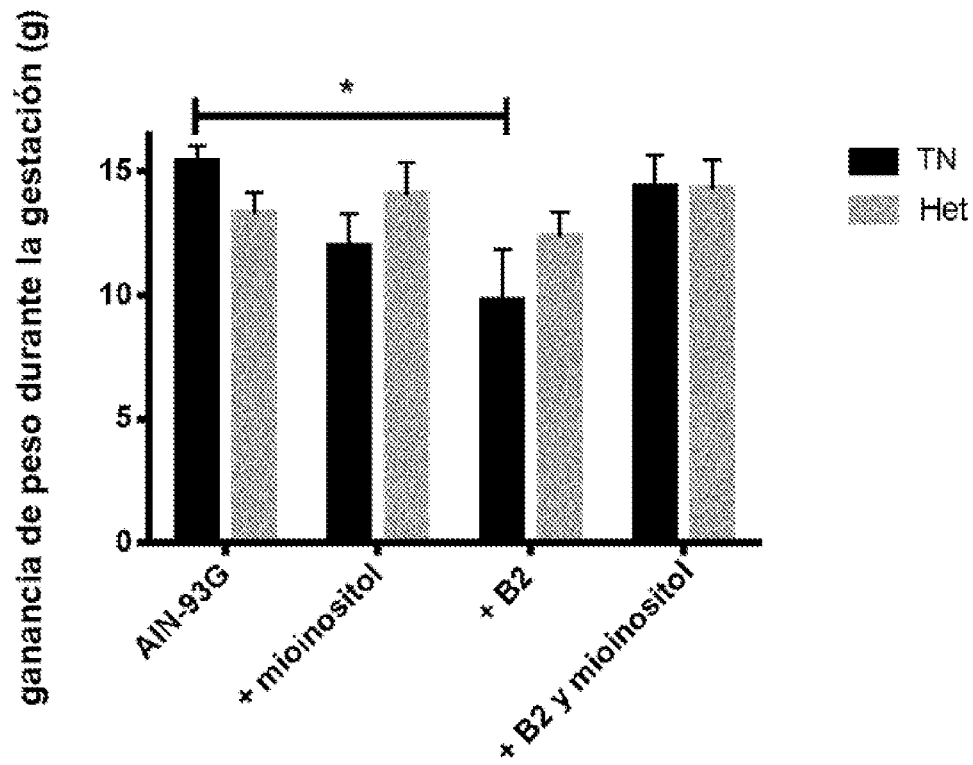


Figura 15

**Figura 16**

