

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 803 175**

51 Int. Cl.:

|                    |                            |           |
|--------------------|----------------------------|-----------|
| <b>A61K 9/00</b>   | (2006.01) <b>A61P 7/06</b> | (2006.01) |
| <b>A61K 9/14</b>   | (2006.01) <b>A61P 3/02</b> | (2006.01) |
| <b>A61K 33/26</b>  | (2006.01) <b>A61P 3/10</b> | (2006.01) |
| <b>A61K 35/741</b> | (2015.01)                  |           |
| <b>A23L 33/135</b> | (2006.01)                  |           |
| <b>A61K 9/107</b>  | (2006.01)                  |           |
| <b>A61K 33/42</b>  | (2006.01)                  |           |
| <b>A61K 35/747</b> | (2015.01)                  |           |
| <b>A23L 33/00</b>  | (2006.01)                  |           |
| <b>A23L 33/16</b>  | (2006.01)                  |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2016** **PCT/EP2016/063170**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016** **WO16198528**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2016** **E 16733314 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **05.03.2025** **EP 3307290**

54 Título: **Suplemento dietético**

30 Prioridad:

**11.06.2015 EP 15171552**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente modificada:  
**09.06.2025**

73 Titular/es:

**SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.00%)**  
**Entre-deux-Villes**  
**1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**MOILLE, SOPHIE;**  
**SILVA ZOLEZZI, IRMA;**  
**HABEYCH NARVAEZ, EDWIN ALBERTO;**  
**GALAFFU, NICOLA;**  
**BOURQUI, BERTRAND y**  
**COLOMBO MOTTAZ, SARA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 803 175 T5

## DESCRIPCIÓN

Suplemento dietético

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la provisión de una composición, en forma de un suplemento materno, especialmente para mujeres embarazadas y/o lactantes. La composición comprende una bacteria probiótica y una fuente de hierro, en donde la fuente de hierro no causa una inhibición o reducción significativa en la viabilidad de la bacteria. La composición puede ser particularmente útil para normalizar las concentraciones de glucosa en plasma, aumentar la sensibilidad a la insulina y, por lo tanto, reducir el desarrollo de diabetes gestacional, mientras se mantienen niveles suficientes de hierro. La composición se usa como suplemento pre-embarazo, embarazo y/o lactancia.

15 Antecedentes

Durante el embarazo, se producen diversos efectos metabólicos, tales como aumento de peso y cambios en el metabolismo de la glucosa y los lípidos para apoyar el crecimiento y el desarrollo del feto. Sin embargo, en algunos casos, estos cambios metabólicos pueden resultar en un efecto a largo plazo en la salud de la madre y/o el niño, como alteraciones en el metabolismo de la glucosa. En algunas mujeres embarazadas, estos cambios pueden resultar en una intolerancia a la glucosa, lo que aumenta el riesgo de desarrollar diabetes mellitus gestacional y, posteriormente, diabetes mellitus tipo 2. Además, la alteración del metabolismo de la glucosa en una mujer embarazada puede estar asociada con riesgos para los resultados fetales, como la macrosomía, o la alteración de la tolerancia a la glucosa con el posible desarrollo de diabetes mellitus en el niño.

El documento WO02013/055439 describe composiciones nutricionales a base de leche para sujetos pediátricos y los métodos correspondientes de usar las composiciones nutricionales para promover la salud y el desarrollo.

El documento CA2347891 describe una composición útil para mejorar la inmunidad general.

El documento WO2008/113665 describe un método de fabricación de productos comestibles cultivados que contienen una fuente de ácidos grasos omega-3 poliinsaturados ([omega]-3 PUFA), como el aceite de pescado, y una fuente de hierro.

El documento WO2009004076 describe una composición que contiene bacterias probióticas para prevenir la diabetes gestacional, mejorar la sensibilidad a la insulina y/o prevenir el síndrome metabólico en el lactante. Las bacterias probióticas pueden incluir una bacteria de ácido láctico (por ejemplo, *Lactobacillus*) y/o una *Bifidobacteria*. Las composiciones pueden, por ejemplo, estar en forma de un suplemento nutricional, que también puede contener micronutrientes tales como vitaminas, minerales y oligoelementos que pueden ser particularmente beneficiosos durante el embarazo.

Un oligoelemento particularmente importante es el hierro. En todo el mundo, la deficiencia de hierro es una de las deficiencias de nutrientes más prevalentes. En los humanos, el hierro es esencial para el funcionamiento de una gran cantidad de procesos biológicos tales como: unión y transporte de oxígeno, regulación génica, función neurológica, función inmune y regulación del crecimiento y diferenciación celular. La deficiencia de hierro puede provocar anemia, así como una variedad de problemas de salud, como deterioro de la tiroides, de las funciones inmunes y mentales, del rendimiento físico, del desarrollo cognitivo, una mayor sensibilidad a la insulina y fatiga.

La deficiencia de hierro está especialmente extendida en mujeres embarazadas y lactantes, y en niños. Por ejemplo, más del 50% de las mujeres embarazadas se consideran anémicas. Durante el embarazo, el crecimiento del feto y el aumento del volumen de sangre materna impone un gran requerimiento de hierro. Los requisitos de hierro generalmente aumentan en aproximadamente un 50% en comparación con los requisitos previos al embarazo. En las mujeres embarazadas, la deficiencia de hierro se ha asociado con resultados gestacionales adversos, como bajo peso al nacer, retraso del crecimiento fetal, disminución de la resistencia a las infecciones y desarrollo cognitivo deficiente, especialmente si ocurre durante la gestación temprana. Además, la anemia en el embarazo, causada comúnmente por deficiencia de hierro, se ha asociado con un aumento de la mortalidad y morbilidad materna y perinatal. Por ejemplo, la suplementación con hierro durante el embarazo se ha asociado con un menor riesgo de parto prematuro. Las mujeres embarazadas y lactantes generalmente necesitan ingerir hierro adicional en forma de suplementos porque su dieta normal generalmente no proporcionará la cantidad requerida.

La fortificación de alimentos con hierro es un enfoque para combatir la deficiencia de hierro. Sin embargo, en grupos particularmente vulnerables, o en grupos que requieren una mayor ingesta de hierro, como en mujeres embarazadas o lactantes, los alimentos fortificados con hierro pueden no proporcionar suficiente hierro para cumplir con los requisitos diarios de hierro en dichos grupos. En vista de esto, típicamente se prefieren los suplementos orales de hierro para corregir las deficiencias de hierro.

La ingesta dietética de referencia (IDR) para el hierro varía típicamente de 8 mg de hierro/persona/día para hombres adultos a 18 mg de hierro/persona/día para mujeres que menstrúan. El IDR es mucho mayor para las mujeres embarazadas, es decir, 27 mg de hierro/persona/día. Para las madres que amamantan, el IDR es de 9-10 mg de hierro/persona/día.

El límite superior para el hierro es 45 mg de hierro/persona/día para adultos ( $\geq 19$  años) y adolescentes (14-18 años) y 40 mg de hierro/persona/día para bebés (0-12 meses) y niños (1-13 años).

Por lo tanto, la inclusión de una fuente de hierro en composiciones dietéticas o suplementos para mujeres antes del embarazo, durante el embarazo y/o durante la lactancia, es altamente deseable. Se ha utilizado una gran variedad de compuestos de hierro como agentes fortificantes de hierro en productos alimenticios y en suplementos nutricionales. Las fuentes de hierro en forma de compuestos ferrosos o férricos, como el sulfato ferroso, el citrato de amonio férrico y el bisglicinato ferroso, se usan comúnmente en los suplementos orales de hierro. El sulfato ferroso es la forma más barata y utilizada. El sulfato ferroso es muy reactivo y tiene una solubilidad en agua muy alta y, por lo tanto, una alta biodisponibilidad. Debido a su alta biodisponibilidad, el sulfato ferroso a menudo se utiliza como referencia estándar para la evaluación de la biodisponibilidad de otros compuestos de hierro. Sin embargo, hemos encontrado que varios compuestos de hierro, cuando se usan para fortificar una composición que contiene una bacteria probiótica, tienen un efecto nocivo sobre la viabilidad de la bacteria probiótica. En particular, hemos encontrado que cuando se combinan con un probiótico, se descubrió que estos compuestos de hierro causan una reducción significativa en la viabilidad de las bacterias. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición probiótica en forma de un suplemento materno que contiene un agente fortificante de hierro, en el que no se ve comprometida la viabilidad de las bacterias probióticas.

#### Resumen de la invención

Sorprendentemente, hemos encontrado que el pirofosfato férrico, cuando se usa como agente fortificante de hierro en una composición que contiene bacterias probióticas, no causa una reducción en la viabilidad de las bacterias.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición oral en el tratamiento o prevención de la diabetes gestacional en una mujer embarazada o lactante, o en una mujer antes del embarazo, comprendiendo dicha composición:

- al menos una bacteria probiótica seleccionada de los géneros: Lactobacillus y Bifidobacterium y
- pirofosfato férrico

en donde dicha composición está en forma de un suplemento materno en donde el pirofosfato férrico está microparticulado y

en donde el pirofosfato férrico tiene una distribución de tamaño de partícula  $D_{90}$  de: 200 micrómetros o menos.

El pirofosfato férrico está en forma finamente dividida. El pirofosfato férrico está microparticulado, y puede estar en forma coloidal, tal como una emulsión o una suspensión coloidal de partículas sólidas en un líquido.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención está definida por las reivindicaciones.

A menos que se indique lo contrario, las referencias al % se refieren al % en peso.

A menos que se indique lo contrario, el tamaño de partícula y las distribuciones de tamaño de partícula pueden medirse por cualquier método apropiado al rango de tamaño de la muestra. Por ejemplo, se puede usar difracción láser, utilizando por ejemplo un Mastersizer 3000, Malvern Instruments Ltd, Malvern UK.

Tal como se usa en el presente documento, las referencias a la fuente de hierro, a saber, pirofosfato férrico, en forma de micropartículas o microparticuladas, significa que comprende principalmente micropartículas. Las micropartículas son partículas de entre 0,1 y 100  $\mu\text{m}$  de tamaño. La fuente de hierro en micropartículas puede contener opcionalmente partículas más pequeñas que esta, por ejemplo en el caso de polvos ultrafinos. Por la naturaleza de las técnicas de producción de polvo, la mayoría de los polvos contienen una gama de tamaños de partículas y pueden comprender partículas que son aglomerados de partículas más pequeñas. Así, por ejemplo, una fuente de hierro microparticulada (concretamente pirofosfato férrico) puede estar compuesta principalmente de micropartículas de la fuente de hierro, pero también puede contener una porción de partículas ultrafinas. El término micronizado se refiere a un proceso de formación de un material en micropartículas, por ejemplo, molienda. El pirofosfato férrico para usar en las composiciones de cualquier aspecto o realización de la presente invención comprende principalmente micropartículas (por ejemplo, polvo de pirofosfato férrico) o comprende principalmente micropartículas y una porción de partículas ultrafinas, en donde las partículas ultrafinas forman un componente menor de la composición. Una fuente de hierro en micropartículas puede ser, por ejemplo, un polvo de pirofosfato férrico de P. Lohmann con un  $D_{97}$  de aproximadamente 7  $\mu\text{m}$  o una emulsión de pirofosfato férrico SunActive de Taiyo.

Tal como se usa en el presente documento, el término Dx significa que x% de las partículas (en función del volumen) poseen un diámetro igual o inferior a un valor D especificado. Así, a modo de ejemplo, un D<sub>90</sub> de 100 µm significa que el 90% de las partículas, en volumen, tienen un diámetro igual o inferior a 100 µm, y un D<sub>97</sub> de 100 µm significa que el 97% de las partículas, en volumen, tienen un diámetro igual o inferior a 100 µm. El término tamaño de partícula promedio se refiere a la media de un tamaño de partícula promedio, por ejemplo, la media del diámetro de volumen D<sub>4,3</sub> determinado por difracción láser.

Como se usa en el presente documento, el término "probiótico" se refiere a preparaciones de células microbianas o componentes de células microbianas con un efecto beneficioso sobre la salud o el bienestar del huésped. [Salminen S, et al., "Probiotics: how they should be defined", Trends Food Sci. Technol, (1999), 10, 107-10].

Los coloides son dispersiones microscópicas de una fase (la fase dispersa) en otra (el medio de dispersión), los ejemplos incluyen espumas, geles, emulsiones y soluciones. El pirofosfato férrico en la composición de la invención puede estar en forma de una suspensión coloidal de partículas sólidas o en forma de una emulsión. Como se usa en el presente documento, el pirofosfato férrico en forma de una emulsión puede incluir pirofosfato férrico que se mezcla con al menos un emulsionante tal como lecitina de soja y ésteres de ácidos grasos tales como ésteres de ácidos grasos de poliglicerol. Particularmente, el pirofosfato férrico en forma de emulsión se refiere al pirofosfato férrico que se emulsiona con lecitina de soja hidrolizada y éster de ácido graso de poliglicerol. Por ejemplo, tal emulsión de pirofosfato férrico puede contener pirofosfato férrico microparticulado como el principal componente de pirofosfato férrico.

#### Bacterias probióticas

Las bacterias probióticas, es decir, una preparación de bacterias con un efecto beneficioso sobre la salud o el bienestar del huésped, utilizada en las composiciones de la presente invención, se selecciona de las de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* que se sabe que poseen actividad probiótica. Las bacterias probióticas pueden ser cualquiera de los géneros anteriores que tienen características probióticas establecidas que tienen particular atención a las propiedades de adhesión y exclusión competitiva.

El género *Lactobacillus* incluye varias bacterias gram positivas, no formadoras de esporas, de la familia *Lactobacillaceae*. Los lactobacilos se caracterizan por su capacidad de producir ácido láctico a partir del metabolismo de la glucosa y otros azúcares de hexosa. Las especies de *Lactobacillus* preferidas que son útiles en las composiciones de la presente invención incluyen las seleccionadas del grupo que consiste en: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. brevis*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. casei* Shirota y *L. casei rhamnosus*. *L. rhamnosus* es una especie especialmente preferida. Se sabe que las especies de *L. rhamnosus* (por ejemplo, *L. rhamnosus* ATCC 53103 (obtenible, entre otros, de Valio Oy de Finlandia con la marca LGG) y *L. rhamnosus* CGMCC 1.3724 y particularmente *L. rhamnosus* CGMCC 1.3724) son beneficiosas para prevenir la diabetes gestacional, mejorando la sensibilidad a la insulina y/o previniendo el síndrome metabólico en el lactante. También se sabe que las especies de *L. rhamnosus* tienen efectos inmunomoduladores cuando se administran a mujeres embarazadas y/o lactantes, por ejemplo, al reducir significativamente el riesgo de respuesta alérgica en la descendencia. De las especies de *L. rhamnosus*, las cepas preferidas incluyen aquellas seleccionadas del grupo que consiste en: *L. rhamnosus* CRL1505, *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* CGMCC 1.3724, *L. rhamnosus* ATCC 53103 y *L. rhamnosus* NCC 4007, más preferiblemente *L. rhamnosus* ATCC 53103 y *L. rhamnosus* CGMCC 1.3724 y lo más preferiblemente *L. rhamnosus* CGMCC 1.3724.

El género *Bifidobacterium* incluye varias bacterias anaerobias no móviles gram-positivas. Están presentes en el tracto gastrointestinal (principalmente el colon) en mamíferos, incluidos los humanos. Las especies preferidas de *Bifidobacterium* que tienen un efecto probiótico y que son útiles en las composiciones de la presente invención incluyen aquellas seleccionadas del grupo que consiste en: *B. lactis*, *B. longum*, *B. breve*, la cepa de *Bifidobacterium breve* M-16V vendida por Morinaga, y la cepa de *Bifidobacterium breve* R0070 vendida por Institut Rosell (Lallemand)], *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. lactis*, *B. longum* (particularmente *B. longum* ATCC BAA-99, obtenible de Morinaga Milk Industry Co. Ltd. de Japón bajo la marca comercial 88536).

Se prefieren particularmente las especies de *B. breve*, la cepa de *Bifidobacterium breve* M-16V vendida por Morinaga, y la cepa de *Bifidobacterium breve* R0070, vendida por Institut Rosell (Lallemand)].

El género *Bacillus* abarca miembros aeróbicos facultativos o formadores de esporas Gram positivos. Las especies de *Bacillus* que tienen propiedades probióticas, y que podrían usarse en las composiciones de la presente invención, incluyen: *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. pumilus*, *B. cereus*. *B. cereus* es una especificación particularmente preferida. De las especies de *B. cereus*, las cepas preferidas son *B. cereus* NVH 75/95 y *B. cereus* IP 5832.

Las bacterias de ácido láctico probiótico adecuadas incluyen *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 obtenible, entre otros, de Valio Oy de Finlandia con la marca LGG y *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724. Las cepas adecuadas de *Bifidobacteria* probióticas incluyen *Bifidobacterium lactis* CNCM 1-3446 vendido, entre otros, por la empresa

Christian Hansen de Dinamarca con la marca 8b12, *Bifidobacterium longum* ATCC 8AA-999 vendido por Morinaga Milk Industry Co. Ltd. de Japón bajo la marca comercial 88536, la cepa de *Bifidobacterium breve* 8b-03, la cepa de *Bifidobacterium breve* M-16V vendida por Morinaga, y la cepa de *Bifidobacterium breve* R0070 vendida por Institut Rosell (Lallemand).

Se pueden usar mezclas de uno de más de cualquiera de los probióticos descritos anteriormente en las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, la composición puede contener una mezcla de géneros (particularmente una combinación de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, o una combinación de *Lactobacillus* y *Bacillus*, preferiblemente una combinación de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*). La composición puede contener una mezcla de especies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Bacillus*, y también puede contener una mezcla de cepas de una o más de estas especies.

En particular, en cualquier aspecto o realización de la presente invención, la composición puede contener una mezcla de bacterias probióticas de ácido láctico, particularmente *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Por lo tanto, una composición de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la presente invención puede incluir *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 y *Bifidobacterium lactis* CNCM 1-3446, por ejemplo, cantidades iguales de *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 y *Bifidobacterium lactis* CNCM 1-3446.

Las bacterias probióticas pueden estar presentes en las composiciones de cualquier aspecto o realización de la presente invención, por ejemplo, en una cantidad:  $\geq 5$  millones,  $\geq 10$  millones,  $\geq 15$  millones,  $\geq 20$  millones,  $\geq 25$  millones,  $\geq 30$  millones,  $\geq 35$  millones,  $\geq 45$  millones,  $\geq 50$  millones,  $\geq 75$  millones,  $\geq 100$  millones,  $\geq 250$  millones,  $\geq 500$  millones,  $\geq 750$  millones,  $\geq 1000$  millones o  $\geq 2000$  millones de bacterias por forma de dosificación de la presente invención. Por ejemplo, el probiótico puede estar presente en cantidades de: 5 millones a 2500 millones, 10 millones a 2500 millones, 30 millones a 2500 millones, 50 millones a 2500 millones, 50 millones a 1000 millones, 75 millones a 2500 millones, 75 millones a 1000 millones, 100 millones a 2500 millones, 100 millones a 1000 millones, 250 millones a 2500 millones, 250 millones a 1000 millones, 500 millones a 2500 millones, 500 millones a 1000 millones, 750 millones a 2500 millones o 750 millones a 1000 millones, 1000 millones a 2500 millones, 1500 millones a 2500 millones de bacterias por forma de dosificación.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse para proporcionar una dosis diaria de las bacterias probióticas de, por ejemplo,  $10^3$  a  $10^{14}$ ,  $10^4$  a  $10^{12}$ ,  $10^5$  a  $10^{12}$ ,  $10^6$  a  $10^{12}$ ,  $10^7$  a  $10^{11}$ , y particularmente  $10^7$  a  $10^{10}$  unidades formadoras de colonias (ufc).

Las bacterias probióticas seleccionadas pueden cultivarse de acuerdo con cualquier método adecuado y prepararse para su adición a la composición mediante técnicas conocidas tales como liofilización o secado por pulverización, por ejemplo. Alternativamente, las preparaciones bacterianas se pueden comprar a proveedores especializados como Morinaga, Institut Rosell, Christian Hansen y Valio ya preparados en una forma adecuada para agregar a los productos alimenticios, como las fórmulas nutricionales y para lactantes. Las bacterias probióticas pueden añadirse a la composición en una cantidad entre  $10^3$  y  $10^{12}$  ufc/g de polvo, más preferiblemente entre  $10^7$  y  $10^{12}$  ufc/g de polvo.

#### Pirofosfato férrico

Se ha encontrado que cuando se formula una composición que contiene una bacteria probiótica y un agente fortificante del hierro, algunos agentes fortificantes del hierro son incompatibles con la bacteria, causando una pérdida en la viabilidad de las bacterias, y en particular su capacidad de replicarse. La incompatibilidad parecería ser independiente del estado de oxidación del compuesto de hierro, ya que se ha encontrado que tanto las formas férricas como ferrosas del hierro reducen la viabilidad de las bacterias. Por ejemplo, hemos encontrado que los agentes fortificantes de hierro conocidos, el bisglicinato ferroso y el citrato de amonio férrico, así como el sulfato ferroso, causaron una pérdida significativa de la viabilidad de las bacterias. Tal incompatibilidad es altamente indeseable desde el punto de vista de la estabilidad al almacenamiento de la composición y/o preparación de la composición (es decir, reconstitución del polvo en agua u otra bebida). Además, cuando la combinación de probiótico y compuesto de hierro se ingiere en combinación, la incompatibilidad puede dar lugar a una mayor pérdida de actividad de las bacterias probióticas en el tracto gastrointestinal, reduciendo así la potencia de las bacterias probióticas.

Sin embargo, sorprendentemente hemos encontrado que el pirofosfato férrico no disminuye la viabilidad bacteriana en las bacterias probióticas. Sorprendentemente, hemos encontrado que formas finamente divididas de agentes fortificantes de hierro, por ejemplo, pirofosfato ferroso, no disminuyen la viabilidad bacteriana. Las formas finamente divididas de pirofosfato férrico son particularmente ventajosas para las presentes composiciones, tienen la ventaja adicional de tener una alta biodisponibilidad además de su biocompatibilidad con las bacterias probióticas. Es sorprendente que las formas finamente divididas de pirofosfato férrico, como las que comprenden micropartículas, no disminuyan la viabilidad bacteriana. Una alta biodisponibilidad de una forma de hierro generalmente se correlaciona con una alta reactividad.

El pirofosfato férrico es un compuesto de hierro insoluble en agua que se ha utilizado para fortificar productos alimenticios. Esta forma de hierro tiene la ventaja de que no causa cambios organolépticos en el vehículo alimentario. Sin embargo, en vista de su menor biodisponibilidad, a saber, se usa pirofosfato férrico en las composiciones de la

presente invención en una forma finamente dividida. Esto es ventajoso ya que las formas finamente divididas de hierro típicamente tienen una absorción mejorada. Además, en las composiciones de la invención que deben reconstituirse en agua u otra bebida, el uso de una fuente de hierro en forma finamente dividida tiene la ventaja adicional de permitir que la fuente de hierro se disperse rápidamente en agua u otra bebida debido a un área de superficie más alta.

El pirofosfato férrico está microparticulado. Preferiblemente, en cualquier aspecto o realización de la presente invención, la fuente de hierro (concretamente pirofosfato férrico) tiene una distribución de tamaño de partícula  $D_{90}$  de: aproximadamente 100 micras o menos, aproximadamente 50 micras o menos, aproximadamente 40 micras o menos, aproximadamente 30 micras o menos, aproximadamente 25 micras o menos, aproximadamente 15 micras o menos, aproximadamente 10 micras o menos, aproximadamente 5 micras o menos, aproximadamente 2 micras o menos, aproximadamente 1 micra o menos, aproximadamente 0,5 micras o menos. En particular, la fuente de hierro (a saber, pirofosfato férrico) tiene una distribución de tamaño de partícula  $D_{90}$  de aproximadamente 30 micras o menos, aproximadamente 25 micras o menos, aproximadamente 15 micras o menos, aproximadamente 10 micras o menos, aproximadamente 5 micras o menos, aproximadamente 2 micras o menos, aproximadamente 1 micra o menos, aproximadamente 0,5 micras o menos. Más preferiblemente, la fuente de hierro (concretamente pirofosfato férrico) tiene una distribución de tamaño de partícula  $D_{90}$  de aproximadamente 10 micras o menos, aproximadamente 5 micras o menos, aproximadamente 2 micras o menos, aproximadamente 1 micra o menos, aproximadamente 0,5 micras o menos. El pirofosfato férrico puede tener particularmente una distribución de tamaño de partícula  $D_{90}$  de aproximadamente 1 micra o menos, aproximadamente 0,5 micras o menos.

La fuente de hierro (concretamente pirofosfato férrico) puede tener una distribución de tamaño de partícula  $D_{97}$  de: aproximadamente 25 micras o menos, 15 aproximadamente micras o menos, o aproximadamente 10 micras o menos, aproximadamente 5 micras o menos, aproximadamente 2 micras o menos, aproximadamente 1 micra o menos, o aproximadamente 0,5 micras o menos.

La fuente de hierro (concretamente pirofosfato férrico) puede tener un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 micras, aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5 micras, aproximadamente 0,005 a aproximadamente 5 micras, aproximadamente 0,025 a aproximadamente 5 micras, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 micras, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5 micras, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2 micras, aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1 micra y aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 micras.

De acuerdo con cualquier aspecto o realización de la presente invención, el pirofosfato férrico puede proporcionarse en forma de una emulsión o dispersión coloidal, por ejemplo, emulsionada con ésteres de ácidos grasos. La emulsión comprende micropartículas de pirofosfato férrico. Por ejemplo, el pirofosfato férrico en la emulsión puede tener un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 0,025 a aproximadamente 5 micras, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 micras, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5 micras, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2 micras, de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1 micra y de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 micras. Preferiblemente, la forma emulsionada de pirofosfato férrico puede tener un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2 micrómetros, de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1 micrómetro y de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 micrómetros. Más preferiblemente, la forma emulsionada de pirofosfato férrico tiene un tamaño medio de partícula de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 micrómetros o de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,4 micrómetros. Por ejemplo, una forma emulsionada particularmente adecuada de pirofosfato férrico está disponible comercialmente bajo el nombre comercial SunActive Fe® (fabricado por Taiyo Kagaku Co., Ltd., Yokkaichi, Mie, Japón) que es una emulsión de pirofosfato férrico (esencialmente recubierto con pirofosfato férrico en grasas - ésteres de glicerol de ácidos grasos - con emulsionantes - lecitina de soja hidrolizada enzimáticamente, en donde el pirofosfato férrico tiene un tamaño de partícula pequeño, por ejemplo, un tamaño promedio de 0,3 micras). Esta forma de pirofosfato férrico tiene ventajosamente una biodisponibilidad comparable al sulfato ferroso.

Como alternativa, el pirofosfato férrico está en forma de polvo finamente dividido, por ejemplo, en forma microparticulada, que tiene las distribuciones de tamaño de partícula como se describe en este documento. El polvo de pirofosfato férrico puede tener un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 0,025 a aproximadamente 30 micras, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 micras, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 15 micras, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 15 micras, de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 15 micras, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 micras, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 micras, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 micras. Preferiblemente el polvo de pirofosfato férrico puede tener un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 micras, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 micras, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 micras. Más preferiblemente, el polvo de pirofosfato férrico tiene un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 micrómetros, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 micrómetros. El polvo de pirofosfato férrico puede ser altamente dispersable en agua. El pirofosfato férrico microparticulado está disponible comercialmente de Dr. Paul Lohmann GmbH, Emmerthal, Alemania (por ejemplo, un polvo micronizado que tiene un  $D_{50}$  de aproximadamente 5 micras, un polvo micronizado que tiene un  $D_{50}$  de aproximadamente 3 micras, un polvo superfino que tiene un  $D_{97}$  de aproximadamente 14 micras, un polvo ultrafino micronizado que tiene  $D_{97}$  de aproximadamente 7 micras). Particularmente, se puede usar el polvo de pirofosfato férrico ultrafino que tiene un  $D_{97}$  de aproximadamente 7 micras.

En realizaciones preferidas, las composiciones de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invención pueden comprender pirofosfato férrico en forma de polvo en forma de micropartículas, en donde la distribución del tamaño de partícula  $D_{90}$  puede ser de aproximadamente 25 micras o menos, aproximadamente 15 micras o menos, aproximadamente 10 micras o menos, o aproximadamente 5 micras o menos. Alternativamente, el pirofosfato férrico en forma de polvo puede tener una distribución de tamaño de partícula  $D_{97}$  de aproximadamente 15 micras o menos, aproximadamente 10 micras o menos, o aproximadamente 5 micras o menos, y particularmente aproximadamente 10 micras o menos.

Se ha descubierto que, a pesar de su pequeño tamaño de partícula y, por lo tanto, de una mayor reactividad esperada, las formas microparticuladas finamente divididas de pirofosfato férrico que se emplean preferiblemente en las composiciones de la presente invención, sorprendentemente no dan como resultado una pérdida de viabilidad de las bacterias probióticas.

En cualquier aspecto o realización de la presente invención, la composición está en una forma de dosificación en forma de un suplemento materno, que puede administrarse a una mujer embarazada y/o lactante. En este caso, la forma de dosificación puede contener de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 5 a aproximadamente 75 mg, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 mg, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 mg de hierro por día. Para las madres lactantes, la forma de dosificación puede contener de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mg de hierro por día. La dosis se puede proporcionar, por ejemplo, como una, dos o más formas de dosificación unitarias (por ejemplo, tabletas, cápsulas, pastillas, polvos, sobres, etc.).

Preferiblemente, una forma de dosificación de acuerdo con la presente invención puede proporcionar una dosis diaria de hierro en una cantidad correspondiente a la ingesta de referencia dietética (IRD) de hierro para el individuo particular para el que está destinada la dosis. A modo de ejemplo, la dosis puede proporcionar 1-100 miligramos de hierro. Sin embargo, un médico puede recetar una dosis que comprenda una mayor cantidad de hierro para la ingestión bajo supervisión médica.

#### Composiciones y administración

Las composiciones de la presente invención pueden contener vitaminas, minerales y micronutrientes adicionales, incluidos oligoelementos, de acuerdo con las recomendaciones (por ejemplo, pautas recomendadas de ingesta diaria) de organismos gubernamentales.

Por ejemplo, las composiciones de cualquier realización de la presente invención pueden incluir oligoelementos que son particularmente beneficiosos para la mujer embarazada/lactante y el feto, tales como zinc, manganeso, magnesio (que actúa como un agente antiestrés y reduce la aparición de calambres), yodo (esencial en la producción de hormonas tiroideas), cobre (que ayuda a la absorción de hierro y, por lo tanto, además tiene un efecto antianémico y también tiene un papel en el mantenimiento de los huesos y el cartílago), yodo, selenio (un antioxidante que interviene en el metabolismo de los radicales libres y otras sustancias producidas por la oxidación de los lípidos en las membranas celulares), el cromo (que tiene un papel importante en el metabolismo de los carbohidratos y la regulación de la insulina, y el molibdeno).

Además, las composiciones de cualquier aspecto o realización de la presente invención pueden incluir vitaminas tales como A, B, C, D, E y/o sus precursores y sus mezclas. Dicha composición comprende preferiblemente dichas vitaminas elegidas del grupo que comprende mioinositol,  $\beta$ -caroteno, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B4, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B12, ácido fólico, vitamina C (ácido ascórbico o ascorbato), vitamina D3, vitamina E, biotina y sus mezclas. En particular, el ácido fólico promueve el desarrollo adecuado del embrión y reduce significativamente la aparición de enfermedades en el recién nacido (por ejemplo, defectos en la médula espinal). Se sabe que la vitamina D ayuda en la formación del esqueleto del recién nacido, mientras que la vitamina A es importante para el crecimiento. Preferiblemente, la vitamina A se administra como pro-vitamina A o  $\beta$ -caroteno, que es una fuente no tóxica a partir de la cual el cuerpo puede fabricar vitamina A según sea necesario. Se sabe que la vitamina C (en forma de ácido ascórbico o ascorbato) fortalece la placenta y el estado general de la mujer embarazada y promueve la absorción de hierro - este último es particularmente ventajoso para las composiciones de la presente invención que son para tratar o prevenir la deficiencia de hierro y/o anemia.

La composición puede comprender particularmente al menos uno de vitamina C (ácido ascórbico o ascorbato) y/o cobre, para ayudar a la absorción de hierro. La composición puede comprender calcio, magnesio, fósforo, zinc, cobre, yodo, selenio, betacaroteno, vitamina C, vitamina B1, vitamina B6, vitamina B2, niacina, vitamina B12, ácido fólico, biotina, vitamina D, vitamina E.

Por ejemplo, la composición puede proporcionar una dosis diaria de uno o más de los siguientes micronutrientes en los intervalos dados: 300 a 500 mg de calcio, 50 a 100 mg de magnesio, 150 a 250 mg de fósforo, 1 a 7 mg de zinc, 0,1 a 0,3 mg de cobre, 50 a 200 g de yodo, 5 a 15 g de selenio, 1000 a 3000 g de beta-caroteno, 10 a 80 mg de

vitamina C, 1 a 2 mg de vitamina B1, 0,5 a 1,5 mg de vitamina B6, 0,5 a 2 mg de vitamina B2, 5 a 18 mg de niacina, 0,5 a 2,0 g de vitamina B12, 100 a 800 g de ácido fólico, 30 a 70 g de biotina, 1 a 5 g de vitamina D, 3 a 10 UI de vitamina E

5 Por ejemplo, la composición puede proporcionar una dosis diaria de uno o más de los siguientes micronutrientes en los intervalos dados: 100 mg a 500 mg de calcio, 50 a 100 mg de magnesio, 150 a 250 mg de fósforo, 1 a 40 mg de zinc, 0,1 a 0,3 mg de cobre, 22 mg a 200 g de yodo, 5 a 15 g de selenio, 720 mg a 3000 g de betacaroteno, 10 a 80 mg de vitamina C, 1 a 2 mg de vitamina B1, 0,5 a 3 mg de vitamina B6, 0,5 a 3 mg de vitamina B2, 5 a 18 mg de niacina, 5 mg a 2,0 g de vitamina B12, 400 mg a 800 g de ácido fólico, 30 a 70 g de biotina, 10 mg a 5 g de vitamina D, 3 a 10 UI de vitamina E, mioinositol

10 Por ejemplo, una composición de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la presente invención puede proporcionar una dosis diaria de mioinositol (1-8 g), vitamina D (5-30 mg), vitamina B6 (1-10 mg), Vitamina B12 (1-20 mg), vitamina B2 (1-5 mg), zinc (1-30 mg),  $\beta$ -caroteno (200-1500 mg), ácido fólico (200-600 mg), hierro (5- 25 mg), calcio (50-300 mg) y yodo (50-250 mg).

15 Una composición de acuerdo con la invención puede ser un producto lácteo tal como un producto lácteo acidificado, por ejemplo, un yogur cuajado o líquido.

20 Una composición de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la presente invención está en forma de un suplemento para administración a una mujer que está planeando quedarse embarazada. Por lo tanto, el suplemento puede administrarse antes de la concepción, es decir, como un suplemento previo al embarazo. El suplemento previo al embarazo puede, por ejemplo, administrarse al menos un mes antes de la concepción. En particular, el suplemento previo al embarazo puede administrarse al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 6 al menos 9 o al menos 12  
25 meses antes de la concepción. Alternativamente, o adicionalmente, las composiciones de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la presente invención están en forma de un suplemento para administración a una mujer embarazada en cualquier etapa del embarazo (suplemento de embarazo) o a la madre después del nacimiento y/o durante la lactancia (suplemento de lactancia) como suplemento. En particular, el suplemento de embarazo puede administrarse durante al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 6, al menos 8, al menos 9, o durante  
30 toda la duración del embarazo. En particular, el suplemento de lactancia puede administrarse al comienzo de la lactancia durante al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 6, o durante toda la duración de la lactancia. El suplemento puede estar en cualquier forma adecuada para administración oral. En particular, el suplemento puede estar en forma de tableta, cápsula o polvo.

35 Preferiblemente, las composiciones de cualquier aspecto o realización de la presente invención se administran al menos un mes antes de la concepción, como un suplemento previo al embarazo. Preferiblemente, la composición se administra durante al menos el segundo y/o tercer trimestre del embarazo. Más preferiblemente, la composición se administra a la mujer embarazada durante el embarazo (es decir, durante toda la duración del embarazo).

40 Las composiciones de acuerdo con la presente invención están preferiblemente en forma sólida. La composición puede, por ejemplo, estar en forma de una tableta masticable, tableta dispersable, cápsula, pastilla en rombo, pastilla, goma de mascar, polvo (por ejemplo, en bolsita), bolsitas de palitos o botella con polvo en la tapa. Preferiblemente, la composición está en forma de una tableta, cápsula o polvo. La tableta o cápsula se puede proporcionar como una forma de dosificación unitaria para, por ejemplo, una o dos veces al día, preferiblemente una vez al día, administración.  
45 Una composición en polvo puede estar contenida en una bolsita. Se puede usar una composición en polvo según la presente invención para rociar sobre un alimento o bebida. Una realización particularmente preferida proporciona una composición de acuerdo con la invención en forma de una bolsita que contiene un polvo, en la que el polvo puede dispersarse en una bebida (por ejemplo, agua, zumo de frutas, leche, etc.) para proporcionar un líquido nutritivo agradable al paladar para la administración oral.

50 Alternativamente, la composición puede estar en forma de una composición nutricional terapéutica. La composición puede ser una fórmula nutricional completa, por ejemplo, que incluye una fuente de proteínas, carbohidratos y grasas.

55 Una fórmula nutricional completa para la administración a mujeres embarazadas de acuerdo con la invención puede comprender una fuente de proteína. Se puede usar cualquier proteína dietética adecuada, por ejemplo, proteínas animales (tales como proteínas de leche, proteínas de carne y proteínas de huevo); proteínas vegetales (tales como proteína de soja, proteína de trigo, proteína de arroz y proteína de guisante); mezclas de aminoácidos libres; o combinaciones de los mismos. Las proteínas de la leche, como la caseína y el suero, y las proteínas de soja son particularmente preferidas. La composición también puede contener una fuente de carbohidratos y una fuente de  
60 grasa. La fuente de grasa puede comprender al menos un ácido graso poliinsaturado omega-3, por ejemplo, los que se encuentran en los aceites de pescado, especialmente el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA).

65 Si la fórmula incluye una fuente de grasa además de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3, la fuente de grasa proporciona preferiblemente del 5% al 40% de la energía de la fórmula; por ejemplo del 20% al 30% de la energía. Se



puede obtener un perfil de grasa adecuado usando una mezcla de aceite de canola, aceite de maíz y aceite de girasol con alto contenido de ácido oleico.

Se puede añadir una fuente de carbohidratos a la composición. Preferiblemente proporciona del 40% al 80% de la energía de la fórmula. Se puede usar cualquier carbohidrato adecuado, por ejemplo, sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrinas y mezclas de los mismos. También se puede agregar fibra dietética si se desea. La fibra dietética pasa a través del intestino delgado sin ser digerida por enzimas y funciona como un agente de volumen y laxante natural. La fibra dietética puede ser soluble o insoluble y, en general, se prefiere una combinación de los dos tipos. Las fuentes adecuadas de fibra dietética incluyen soja, guisante, avena, pectina, goma guar, goma arábiga, fructooligosacáridos, galacto-oligosacáridos, sialil-lactosa y oligosacáridos derivados de leches animales. Una mezcla de fibras preferida es una mezcla de galacto-oligosacáridos con fructo-oligosacáridos de cadena corta. Preferiblemente, si hay fibra presente, el contenido de fibra está entre 2 y 40 g/l de la fórmula tal como se consume, más preferiblemente entre 4 y 10 g/l.

La composición puede estar en forma de una tableta, cápsula, polvo, bolsita o pastilla. Preferiblemente, la composición está en forma de un polvo.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden comprender además al menos un aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, seleccionado entre estabilizadores, agentes de relleno, emulsionantes, tensioactivos, agentes solubilizantes, adsorbentes, agentes fluídos, estabilizadores, tampones, lubricantes, agentes humectantes, vehículos, antioxidantes, espesantes, agentes antiaglomerantes, agentes de recubrimiento, agentes de enmascaramiento del sabor, antioxidantes, conservantes, agentes aromatizantes y colorantes.

Una composición sólida de acuerdo con la presente invención puede prepararse de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, se puede preparar mezclando la proteína, la fuente de carbohidratos y la fuente de grasa (si se van a incluir) en proporciones apropiadas. Si se usan, los emulsionantes pueden incluirse en este punto. Las vitaminas y minerales se pueden agregar en este punto, pero generalmente se agregan más tarde para evitar la degradación térmica. Cualquier vitamina lipofílica, emulsionante y similares pueden disolverse en la fuente de grasa antes de la mezcla. El agua, preferiblemente agua que ha sido sometida a ósmosis inversa, puede mezclarse para formar una mezcla líquida. La temperatura del agua es convenientemente de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 80 °C para ayudar a la dispersión de los ingredientes. Se pueden usar licuadores disponibles comercialmente para formar la mezcla líquida. La mezcla líquida se homogeneiza después; por ejemplo, en dos etapas.

La mezcla líquida puede tratarse entonces térmicamente para reducir las cargas bacterianas, por ejemplo, calentando rápidamente la mezcla líquida a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 80 °C a aproximadamente 150 °C durante de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 5 minutos. Esto puede llevarse a cabo por inyección de vapor, autoclave o por intercambiador de calor; por ejemplo, un intercambiador de calor de placas.

Entonces, la mezcla líquida se puede enfriar entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 85 °C; por ejemplo, por enfriamiento rápido. La mezcla líquida se puede homogeneizar nuevamente; por ejemplo, en dos etapas entre aproximadamente 10 MPa y aproximadamente 30 MPa en la primera etapa y aproximadamente 2 MPa a aproximadamente 10 MPa en la segunda etapa. La mezcla homogeneizada puede enfriarse luego para agregar cualquier componente sensible al calor; tales como vitaminas y minerales. El pH y el contenido de sólidos de la mezcla homogeneizada se ajustan convenientemente en este punto. La mezcla homogeneizada se transfiere a un aparato de secado adecuado, como un secador por pulverización o un liofilizador, y se convierte en polvo. El polvo debe tener un contenido de humedad de menos de aproximadamente 5% en peso. Las bacterias probióticas se pueden agregar a este polvo.

Las bacterias probióticas seleccionadas pueden cultivarse de acuerdo con cualquier método adecuado y prepararse para su adición a la composición mediante por ejemplo liofilización o secado por pulverización. Alternativamente, las preparaciones bacterianas se pueden comprar a proveedores especializados como Christian Hansen y Valio ya preparados en una forma adecuada para agregar a los productos alimenticios y suplementos. Las bacterias probióticas se pueden agregar a la fórmula en una cantidad de:  $10^3$  a  $10^{14}$  ufc/g de polvo, preferiblemente  $10^4$  a  $10^{12}$  ufc/g de polvo, más preferiblemente  $10^5$  a  $10^{12}$  y lo más preferiblemente entre  $10^7$  y  $10^{12}$  ufc/g de polvo.

El polvo se puede envasar en una bolsita, por ejemplo, como un polvo para agregar a una bebida. Para la reconstitución, el polvo se puede agitar en una bebida adecuada, por ejemplo, agua, zumo de frutas, leche, etc., típicamente a temperatura ambiente, para su consumo.

La invención se ilustrará ahora adicionalmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

En el siguiente ejemplo, consideramos una bolsita de polvo que contiene 6 mg de hierro y 333,3 mg de premezcla de

## ES 2 803 175 T5

bacterias probióticas (es decir, una mezcla de *Lactobacillus rhamnosus* seco (L. rhamnosus GG1) y *Bifidobacterium lactis* (B. lactis 88122) en un vehículo de maltodextrina a una concentración de alrededor de  $1,0E + 10$  ufc por gramo de polvo). Por razones prácticas (precisión en la cantidad pesada), las cantidades se han multiplicado por 5.

- 5 Se probaron cinco preparaciones que contenían varios agentes fortificantes de hierro y bacterias probióticas, y una composición de control que contenía bacterias probióticas y ningún agente fortificante de hierro, como sigue:

|   | Preparación                   |  |  |   |   |  |
|---|-------------------------------|--|--|---|---|--|
|   | 1                             | 2  | 3  | 4   | 5   | 6  |
| Tipo de hierro                                      | Bisglicinato ferroso en polvo | Emulsión de pirofosfato férrico (en esencia pirofosfato férrico recubierto en grasa) | Polvo de pirofosfato férrico micronizado | Polvo de pirofosfato férrico no micronizado | Polvo de citrato de amonio férrico (no micronizado) | Control con premezcla de bacterias probióticas |
| Producto/proveedor                                  | Albion                        | SunActive Taiyo  | Ultrafine P. Lohmann                     | P. Lohmann                                  | P. Lohmann  | NA   |
| Pureza (%Fe)  | 20%peso                       | 8%peso   | 25%peso                                  | 25%peso                                     | 14,5%peso   | NA   |
| Forma reactiva                                      | forma +2                      | forma +3   | forma +3                                 | forma +3                                    | forma +3  | NA   |
| Cantidad de sal de hierro (mg)                      | 150,0                         | 375,0  | 120,0                                    | 120,0                                       | 206,9   | 0  |
| Cantidad de premezcla de bacterias probióticas (mg) | 1666,5                        | 1666,5   | 1666,5                                   | 1666,5                                      | 1666,5  | 1666,5   |
| Cantidad de diluyente TS+ (en g)                    | 998,2                         | 998,0  | 998,2                                    | 998,2                                       | 998,1   | 998,3  |

- 10 Para cada preparación, se pesó la cantidad requerida de fortificante de hierro. El fortificante de hierro se mezcló con la cantidad especificada de diluyente TS +, es decir, una solución de reconstitución con triptona, cloruro de sodio y antiespumante a 37 ° C que tenía la siguiente composición:

|    |                  |                                     |
|----|------------------|-------------------------------------|
|    | Triptona         | 15 g                                |
|    | Cloruro de sodio | 8,5 g                               |
| 15 | Antiespumante    | 1 ml de una solución al 10% en agua |
|    | Agua destilada   | hasta 1000 ml                       |
|    | pH               | 7,0 ± 0,2 (a 25 °C)                 |

El TS+ se prepara mediante el siguiente proceso:

- 20
- Disolver los componentes en el agua calentándolos suavemente
  - Ajustar el pH si es necesario
- 25
- Esterilizar por tratamiento térmico a 121 °C durante 15 minutos
  - Condiciones de almacenamiento: 4 °C ± 2 °C por 4 semanas.

El TS+ también se puede obtener comercialmente.

30 La mezcla se agitó hasta la completa homogeneización de la solución (3 min).

Se añadió la premezcla de bacterias probióticas (PP036) y la mezcla se agitó durante 1 minuto.

35 Se analizaron cada una de las seis preparaciones por triplicado.

La viabilidad bacteriana se determinó inmediatamente después de la preparación mediante el cultivo en placas de las diluciones en serie y el posterior recuento de las unidades formadoras de colonias. Se puede utilizar cualquier método adecuado para medir la viabilidad bacteriana.[p.ej. Jett, B.D. et al, "Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria" - Biotechniques (1997), 23, 648-650; Sieuwerts, S., et al., "A simple and fast method for determining colony forming units"

40

## ES 2 803 175 T5

- Letters in Applied Microbiology (2008), 47, 275-278]. El principio del método es el siguiente:

- Las muestras que contienen probióticos se pesan, se rehidratan en un diluyente (TS+) y se homogenizan por digestión.
- Las diluciones decimales en serie se realizan en el mismo diluyente (TS+)
- 1 ml de cada dilución apropiada se transfiere a placas de Petri y se mezcla con un agar específico (método de vertido en placa)
- Las placas de agar solidificadas inoculadas se incuban en condiciones específicas que permiten la formación de colonias por la bacteria diana (enumeración selectiva)
- Se cuentan las colonias y los resultados se calculan y expresan en unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g).

Se obtuvieron los siguientes resultados:

| Preparación   | 1        | 2        | 3        | 4        | 5        | 6        |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Hierro [mg]   | 60,2     | 150,3    | 47,9     | 48,1     | 82,9     | 0        |
| Premezcla de probiótico [mg]  | 666,4    | 666,1    | 666,3    | 666      | 665,9    | 665,9    |
| Diluyente [ml] TS+  | 399,83   | 399,87   | 400,04   | 399,69   | 399,9    | 399,91   |
| Dilución seleccionada para numeración   | 5        | 5        | 5        | 5        | 5        | 5        |
| Duplicado   | a        | 182      | 271      | 224      | 315      | 173      |
|   | b        | 171      | 249      | 262      | 265      | 162      |
|   | c        | 208      | 297      | 226      | 292      | 163      |
| UFC/ml en el producto reconstituido   | 1,87E+07 | 2,72E+07 | 2,37E+07 | 2,91E+07 | 1,66E+07 | 2,57E+07 |
| UFC/sobre   | 3,47E+09 | 5,44E+09 | 4,75E+09 | 5,81E+09 | 3,32E+09 | 5,14E+09 |
| Log   | 9,57     | 9,74     | 9,68     | 9,76     | 9,52     | 9,71     |
| Pérdida log durante la reconstitución   | -0,14    | 0,03     | -0,03    | 0,05     | -0,19    | 0,00     |
| UFC/sobre=contenido de UFC en los 333 mg iniciales de la premezcla log de bacterias probióticas = UFC/sobre expresado como valor log              |          |          |          |          |          |          |
| Pérdida log durante la reconstitución = UFC de referencia en log – UFC de la muestra analizada en log (los números negativos indican una pérdida) |          |          |          |          |          |          |

La desviación estándar para cada resultado es de aproximadamente 0,04. Los resultados anteriores muestran que las Preparaciones 2, 3 y 4, que contienen pirofosfato férrico tienen un valor de pérdida logarítmica similar, lo que indica que estos agentes fortificadores de hierro no causan pérdida de viabilidad bacteriana en comparación con las composiciones que contienen bisglicinato ferroso (Preparación 1) y citrato férrico de amonio (Preparación 5). Este resultado es particularmente sorprendente en vista del hecho de que el bisglicinato ferroso es más soluble en agua que el pirofosfato férrico y, por lo tanto, es muy reactivo, y el citrato de amonio férrico contiene hierro en el mismo estado de oxidación que el pirofosfato férrico. Además, el pirofosfato férrico en la Preparación 2 y la Preparación 3 está en una forma finamente dividida (es decir, que comprende micropartículas), lo que aumenta la exposición de las bacterias al hierro debido a una mayor área de superficie y, por lo tanto, se espera que resulte en una mayor pérdida de viabilidad.

### Ejemplo 2

Se puede preparar una formulación en polvo que comprende *L. rhamnosus* (y opcionalmente *B. lactis*) y pirofosfato férrico. La formulación se puede dispersar en agua u otra bebida para proporcionar un suplemento nutricional como sigue:

|  | Por 100g | Por 100 kcal listo para beber | Por porción (190 ml) |
|--|----------|-------------------------------|----------------------|
| Energía (kcal)                                 | 100      | 65                            | 130                  |
| <i>L. rhamnosus</i> GG1                        |          |                               | 10e <sup>10</sup>    |
| <i>B. lactis</i> BB12                          |          |                               | 10e <sup>10</sup>    |
| Pirofosfato férrico (mg equivalente de hierro) | 12       | 7,5                           | 15                   |
| Grasa (g)                                      | 0,92     | 0,60                          | 1,20                 |
| Proteína (g)                                   | 3,54     | 2,30                          | 4,60                 |
| Carbohidrato (g)                               | 19,4     | 12,60                         | 25,2                 |
| Fibra dietética (g)                            | 3,62     | 2,35                          | 4,70                 |
| Minerales                                      |          |                               |                      |
| Sodio (mg)                                     | 51       | 33                            | 66                   |

(continuación)

|                       | Por 100g | Por 100 kcal listo para beber | Por porción (190 ml) |
|-----------------------|----------|-------------------------------|----------------------|
| Potasio (mg)          | 238      | 155                           | 310                  |
| Cloruro (mg)          | 123      | 80                            | 160                  |
| Calcio (mg)           | 308      | 200                           | 400                  |
| Fósforo (mg)          | 162      | 105                           | 210                  |
| Magnesio (mg)         | 58,0     | 38                            | 76                   |
| Selenio (mg)          | 7,7      | 5,0                           | 10,0                 |
| Vitaminas             |          |                               |                      |
| Beta caroteno (mg)    | 1600     | 1050                          | 2100                 |
| Vitamina D (mg)       | 3,8      | 2,50                          | 5,0                  |
| Vitamina E (UI)       | 4,6      | 3,0                           | 6,0                  |
| Vitamina C (mg)       | 38       | 25                            | 50                   |
| Vitamina B1 (mg)      | 1,2      | 0,75                          | 1,5                  |
| Vitamina B2 (mg)      | 1,3      | 0,85                          | 1,7                  |
| Niacina (mg)          | 12       | 8                             | 16                   |
| Vitamina B6 (mg)      | 1,1      | 0,7                           | 1,4                  |
| Ácido fólico (mg)     | 310      | 200                           | 400                  |
| Vitamina B12 (mg)     | 1,2      | 0,75                          | 1,5                  |
| Biotina (mg)          | 54       | 35                            | 70                   |
| Otros elementos traza |          |                               |                      |
| Yodo (mg)             | 150      | 100                           | 200                  |
| Cobre (mg)            | 0,20     | 0,13                          | 0,26                 |
| Zinc (mg)             | 3,8      | 2,5                           | 5,0                  |

## Ejemplo 3

- 5 Se puede preparar una formulación en polvo que comprende *L. Rhamnosus* (y opcionalmente *B. lactis*) y pirofosfato férrico. La formulación se puede dispersar en agua u otra bebida para proporcionar un suplemento nutricional de la siguiente manera:

|    | Ingrediente                                    | Cantidad por dosis diaria |
|----|--|---------------------------|
| 10 | Mio-inositol                                   | 4g                        |
|    | Vitamina D                                     | 10 mg                     |
|    | Vitamina B6                                    | 2.6 mg                    |
|    | Vitamina B12                                   | 5.2 mg                    |
|    | Vitamina B2                                    | 1.8 mg                    |
| 15 | Zinc   | 10 mg                     |
|    | β-caroteno                                     | 720 mg                    |
|    | Ácido fólico                                   | 400 mg                    |
|    | Pirofosfato férrico (mg equivalente de hierro) | 12 mg                     |
|    | Calcio   | 150 mg                    |
| 20 | Yodo   | 150 mg                    |
|    | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG1)            | 1x10 <sup>9</sup> ufc     |
|    | <i>Bifidobacterium lactis</i> BB122)           | 1x10 <sup>9</sup> ufc     |

- 25 1) Cepa depositada como CGMCC 1-3724  
2) Cepa depositada como CNCM 1-3446

La composición puede administrarse a una mujer que desee quedarse embarazada durante al menos un mes antes del embarazo y más tarde a la misma mujer durante al menos un mes durante el embarazo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición oral para su uso en el tratamiento o prevención de la diabetes gestacional en una mujer embarazada y/o lactante, o en una mujer antes del embarazo, comprendiendo dicha composición:
- al menos una bacteria probiótica seleccionada de los géneros: *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y
  - pirofosfato férrico
- 10 en el que dicha composición está en forma de un suplemento materno, en la que el pirofosfato férrico está microparticulado y en donde, el pirofosfato férrico tiene una distribución de tamaño de partícula  $D_{90}$  de: 200 micras o menos.
- 15 2. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la que el pirofosfato férrico está en forma de un coloide tal como una suspensión coloidal de partículas sólidas en un líquido, o una emulsión, tal como una emulsión con un éster de ácido graso.
3. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en la que la bacteria probiótica *Lactobacillus* es *L. rhamnosus* CGMCC 1.3724.
- 20 4. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la bacteria probiótica *Bifidobacterium* es *B. lactis*, por ejemplo, *bifidobacterium lactis* CNCM I-3446.
- 25 5. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende *L. rhamnosus* CGMCC 1.3724; y pirofosfato férrico, preferiblemente en el que el pirofosfato férrico está en forma de una emulsión con un éster de ácido graso, preferiblemente en el que el pirofosfato férrico tiene una distribución de tamaño de partícula  $D_{90}$  de: 30 micras o menos.
6. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además uno o más micronutrientes, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en vitaminas, minerales y oligoelementos.