

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 802 985**

51 Int. Cl.:

A23C 9/20 (2006.01)
A23L 33/15 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A61K 31/525 (2006.01)
A61K 31/7004 (2006.01)
A61K 35/744 (2015.01)
A61K 31/745 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2015** **PCT/EP2015/068190**
87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016** **WO16020489**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2015** **E 15750349 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020** **EP 3177151**

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:
22.01.2021

73 Titular/es:

SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.0%)
Entre-deux-Villes
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 2 802 985 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 el mioinositol y la vitamina B2. Tal composición se ha diseñado específicamente para proporcionar una nutrición optimizada a una mujer que desea quedar embarazada, a una mujer embarazada y/o a una mujer lactante. La presente invención es para su uso para tratar o prevenir la diabetes mellitus gestacional (DMG) y las afecciones que se asocian con la misma en un sujeto embarazado y/o en su descendencia.

Antecedentes de la invención

Se ha acumulado evidencia científica que demuestra que la nutrición temprana prenatal y postnatal y otros factores ambientales causan la programación de la salud y el bienestar a largo plazo, y pueden afectar el riesgo desarrollar enfermedades crónicas. Varios estudios demuestran que los cambios en la ingesta dietética o la manipulación de macro y micronutrientes individuales durante el período reproductivo pueden tener un impacto en varios procedimientos fisiológicos, tales como el crecimiento, el metabolismo, el apetito, la función cardiovascular entre otros (Koletzko B y otros (2011) Am J Nutr 94(s):2036-43S). Por lo tanto, el estado nutricional (almacenamiento de nutrientes e ingesta alimentaria) de las mujeres antes y durante el embarazo es relevante para optimizar los resultados de salud neonatal e infantil. Se cree que la nutrición materna afecta la disponibilidad y el suministro de nutrientes para el feto en desarrollo que se requieren para los procedimientos críticos de desarrollo. El estado nutricional de la mujer antes de quedar embarazada también tiene un impacto en su salud y bienestar, así como en la salud, el crecimiento y el bienestar de su bebé. Por ejemplo, las deficiencias de micronutrientes tienen efectos profundos y a menudo persistentes en los tejidos y órganos fetales, incluso en ausencia de signos clínicos de su deficiencia en la madre (Ashworth CJ y otros (2001) 122: 527-35). La ingesta inadecuada de múltiples micronutrientes es común entre las mujeres en edad reproductiva que viven en entornos de escasos recursos (Torhem LE y otros (2010) J. Nutr. 140: 2051S-58S). El estado nutricional de la mujer lactante después del parto también tiene un impacto 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 las composiciones para administración materna y se han desarrollado diversas composiciones nutricionales para abordar las necesidades de nutrición materna. Típicamente, contienen mezclas de vitaminas y minerales. Sin embargo, aún es útil enfocarse específicamente en las deficiencias nutricionales de esta población específica mediante la selección de los nutrientes más útiles para estas mujeres, como para proporcionar composiciones que se adaptan a las necesidades nutricionales de las mujeres en el período reproductivo para optimizar la nutrición prenatal y posnatal de las madres, en beneficio de la madre y de su bebé.

El documento EP1932542 se refiere a la composición antioxidante que comprende vitamina C, ácido glutámico y/o glutamina, cisteína, riboflavina, ácido succínico, ácido fumárico, coenzima Q10 y niacina para usar en la diabetes.

Baker y otros (1993): Journal of diabetes and its complications, vol 7(3) pág. 204-212 analiza las tendencias en la embriopatía diabética.

El documento US2014/0127166 divulga el potencial de los probióticos para reducir el riesgo desarrollar diabetes gestacional.

Los inventores también descubrieron sorprendentemente que la vitamina B2 puede usarse para mejorar la absorción de glucosa en las células de mamíferos, en particular en las células musculares de mamíferos. En consecuencia, la administración de vitamina B2 a un sujeto antes y/o durante el embarazo puede prevenir y/o tratar la DMG y/o prevenir una afección que se asocia con la DMG en un sujeto embarazado o su descendencia. Los inventores también descubrieron que cuando se les administra a los ratones heterocigotos db/db una vitamina B2 suplementaria durante el embarazo tienen una concentración de glucosa en ayunas inferior en comparación con los ratones que no reciben una dosis suplementaria. Además, los inventores descubrieron que los ratones que se les administró mioinositol en combinación con vitamina B2 suplementaria tienen una concentración de glucosa en ayunas sorprendentemente baja durante el embarazo y antes del embarazo.

Además, se encontró que la suplementación con B2 resultó en un incremento del % de glucosa inferior durante los primeros 30 minutos de OGTT, y que cuando el B2 se combinó con mioinositol, el incremento del % de glucosa fue aún más inferior.

Además de lo anterior, los inventores descubrieron que los ratones heterocigotos db/db cuando se les administra mioinositol en combinación con vitamina B2 suplementaria durante el embarazo tienen una deposición de grasa retroperitoneal sorprendentemente inferior.

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

Durante el embarazo, se producen cambios hormonales en el cuerpo de la madre que conducen a una mayor resistencia a la insulina y una mayor concentración de glucosa en plasma. Estos cambios ayudan a asegurar la transferencia de nutrientes de la madre al feto, lo que ayuda así a asegurar su crecimiento y desarrollo óptimos. Normalmente, el incremento de la resistencia a la insulina y las concentraciones de glucosa en plasma superiores se contrarrestan mediante el incremento de la producción de insulina por parte de la madre. Sin embargo, algunas madres no pueden producir cantidades adecuadas de insulina para contrarrestar los cambios y esto puede provocar diabetes mellitus gestacional (en adelante DMG) en dichas madres.

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

La DMG es un trastorno del embarazo que puede incrementar el riesgo de una serie de afecciones materno-fetales, que incluyen macrosomía, lesión al nacimiento, distocia de hombros, parto prematuro y parto por cesárea (en adelante, cesárea). Las madres que padecen DMG también tienen un mayor riesgo desarrollar diabetes tipo II inmediatamente después del embarazo y más adelante en la vida. Además, los descendencia de madres que padecen DMG tienen un mayor riesgo desarrollar una tolerancia a la glucosa alterada y/o sufren de exceso de peso/adiposidad y trastornos metabólicos asociados, por ejemplo, la diabetes tipo II y la obesidad.

En consecuencia, existe la necesidad de encontrar formas de tratar y/o prevenir la DMG en sujetos embarazados.

Sumario de la invención

La invención se expone en las reivindicaciones. Como se indicó anteriormente, los presentes inventores ahora descubrieron que una composición para la administración materna que comprende al mioinositol junto con la vitamina B2 es de particular utilidad para abordar las necesidades nutricionales específicas de las mujeres que desean quedar embarazadas, de las mujeres embarazadas y lactantes y de su descendencia. Tal composición es para su uso para tratar o prevenir la DMG en un sujeto embarazado, por ejemplo, una mujer, una gata o una perra embarazada. Como también se indicó anteriormente, se descubrió que la vitamina B2 puede usarse para mejorar la absorción de glucosa en las células de mamíferos, que cuando se les administra a los ratones heterocigotos db/db la vitamina B2 suplementaria durante un período de preconcepción y un período de embarazo tienen una concentración de glucosa en ayunas inferior en comparación con los ratones a los que no se les administró una dosis suplementaria y, por lo tanto, puede usarse para tratar o prevenir la DMG en un sujeto embarazado, por ejemplo, una mujer, una gata o una perra embarazada.

Como se indicó anteriormente, la DMG se asocia con una variedad de afecciones que afectan al sujeto embarazado y/o a su descendencia, por ejemplo, el parto prematuro y la cesárea, la lesión al nacimiento en la madre o el bebé, la distocia de hombros, la macrosomía, una concentración excesiva de glucosa en sangre de la descendencia, un exceso de peso/adiposidad y trastornos metabólicos que se asocian, por ejemplo, a la diabetes tipo II, la enfermedad del hígado graso y la obesidad inmediatamente después del nacimiento y más adelante en la vida de la descendencia, y un mayor riesgo para la madre de tener o desarrollar la diabetes tipo 2 inmediatamente después del nacimiento y más adelante en la vida. En consecuencia, al tratar o prevenir la DMG, la vitamina B2 también puede usarse para tratar o prevenir estas afecciones en estos sujetos embarazados o su descendencia.

La vitamina B2 puede ser particularmente efectiva para tratar o prevenir la DMG en un sujeto embarazado y/o su descendencia, cuando se usa en combinación con mioinositol (*cis*-1,2,3,5-*trans*-4,6-ciclohexanohexol) y/o uno o más probióticos, y/o uno o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc. En particular, la vitamina B2 puede ser particularmente efectiva cuando se usa en combinación con mioinositol, vitamina D o vitamina D y zinc.

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

La vitamina B2 y el mioinositol, y opcionalmente uno o más probióticos y/o uno o más de las vitamina B6, B12 y D y/o zinc pueden administrarse o emplearse en cualquier forma adecuada para la ingestión por un sujeto, por ejemplo, en la forma de una composición nutricional en polvo para reconstituir, por ejemplo, en leche, jugo o agua, un producto alimenticio, una bebida, un suplemento nutricional, tal como un suplemento nutricional en polvo para espolvorear sobre alimentos o disolver en un medio acuoso, por ejemplo, leche, jugo o agua, o un nutraceutico.

La vitamina B2 en combinación con mioinositol y, opcionalmente, uno o más probióticos y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc pueden usarse en la fabricación de un medicamento para su uso para tratar o prevenir la DMG en un sujeto embarazado.

Se puede proporcionar vitamina B2 en combinación con mioinositol y, opcionalmente, uno o más probióticos y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc, junto con una etiqueta que indica los requisitos de dosificación en un kit para su uso para tratar o prevenir la DMG en un sujeto embarazado.

5 **Dibujos**

La Figura 1 es un gráfico que muestra el porcentaje de las mujeres encuestadas del ejemplo 3 que se encontró que tienen deficiencias en las vitaminas D, vitamina B12, vitamina B6, ácido fólico, hierro y zinc, respectivamente.

La Figura 2A muestra la correlación entre los bajos niveles de vitamina B2 en las madres durante el embarazo y la masa grasa a los 6 años de edad de su descendencia.

La Figura 2B muestra la correlación entre los bajos niveles de vitamina B2 en las madres durante el embarazo y la masa grasa a los 4 años de edad de su descendencia.

Figura 3 - Gráficos que ilustran el efecto de la vitamina B2, en ausencia de insulina, sobre la absorción de glucosa en células musculares diferenciadas L6 después de incubaciones de 2 horas y 4 horas.

Figura 4 - Gráfico que ilustra el efecto de una combinación de vitamina B2 y 1,25-dihidroxivitamina D3, en ausencia de insulina, sobre la absorción de glucosa en células musculares diferenciadas L6 después de incubaciones de 2 horas y 4 horas.

Figura 5 - Gráfico que ilustra el efecto de la combinación de vitamina B2 y 1,25-dihidroxivitamina D3 y zinc, en ausencia de insulina, sobre la absorción de glucosa en células musculares diferenciadas L6 después de una incubación de 2 horas.

Figura 6 - Gráfico que ilustra el nivel de glucosa en sangre en ayunas de ratones a los que se administró mioinositol, vitamina B2 o una combinación de estos, al final del día de gestación (día 18,5 del embarazo).

Figura 7 - Gráfico que ilustra el peso de las almohadillas de grasa retroperitoneal de ratones, que se les administró mioinositol, vitamina B2 o una combinación de estos, al final del día de gestación (día 18,5 del embarazo).

Figura 8 - Gráfico que ilustra la diferencia en la respuesta OGTT entre los ratones hembras WT y heterocigotos *Lepr^{db/+}* a las 4 semanas de edad.

Figura 9 - Gráfico que ilustra el incremento en % de glucosa a partir del nivel de glucosa en sangre en ayunas en ratones a los que se administró mioinositol, vitamina B2 o una combinación de estos, durante el embarazo (día 16,5 del embarazo).

Figura 10 - Gráfico que ilustra el efecto de la vitamina B2 sobre la absorción de glucosa en ausencia de insulina en células musculares diferenciadas L6 resistentes a la insulina después de una incubación corta (2 horas) y larga (24 horas).

La Figura 11 es un gráfico que ilustra el efecto de una combinación de mioinositol y probióticos en el delta% de la masa grasa de las 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 proporción de ganancia de grasa a 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 sobre la cantidad de insulina en el páncreas el día 19,5 de gestación en las ratas Goto Kakizaki.

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

La Figura 15 es un gráfico que ilustra el efecto del mioinositol y la vitamina B2 en la ganancia de peso de los ratones *Lepr^{db/+}* durante el embarazo.

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

Descripción detallada

Los presentes inventores investigaron las necesidades específicas de las mujeres que desean quedar embarazadas, de las mujeres embarazadas y lactantes para identificar los nutrientes más útiles para esta población específica. En base a los estudios, ellos diseñaron una composición optimizada que comprende mioinositol y vitamina B2 para abordar específicamente las necesidades más agudas de esta población específica.

La composición de la invención comprende mioinositol y vitamina B2 y es para su uso en el tratamiento o la prevención de la diabetes mellitus gestacional (DMG) y una afección que se asocia con la misma en un sujeto embarazado y/o su descendencia, en la que dicha composición se administra a dicho sujeto antes y/o durante el embarazo y/o durante la lactancia; en el que el sujeto es un mamífero que se selecciona del grupo que consiste en: una gata, una perra, una humana y en la que dicha composición se administra preferentemente por vía entérica, con mayor preferencia por vía oral y preferentemente es una composición nutricional en polvo, un producto alimenticio, una bebida, un suplemento nutricional tal como un suplemento nutricional en polvo o un nutracéutico.

El inositol o ciclohexano-1,2,3,4,5,6-hexol es un poliol que existe bajo nueve formas estereoisoméricas en dependencia de la orientación espacial de sus seis grupos hidroxilo. El mioinositol, o cis-1,2,3,5-trans-4,6-ciclohexanohexol, es la forma isomérica predominante de inositol. El mioinositol es un compuesto presente en las células animales y vegetales y juega un papel importante en varios procedimientos celulares, como la base estructural de los segundos mensajeros en las células eucariotas, en particular como los trifosfatos de inositol (IP3), los lípidos fosfato de fosfatidilinositol (PIP2/PIP3) e inositol glicanos. Se ha demostrado que el mioinositol participa

en una variedad de procedimientos biológicos, 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 y otros (2013) Biochimie 95:1811-1827). El mioinositol se encuentra libre de fosfoinositidas y ácido fítico, en frutas y verduras frescas, y en todos los alimentos que contienen semillas (frijoles, granos y nueces) (Clements RS y Darnell B. Am J Clin Nutr (1980) 33:1954-1967). El mioinositol del ácido fítico puede liberarse en el intestino por las enzimas fitasas que se encuentran en plantas, microorganismos y tejidos animales (Schlemmer U y otros Mol Nutr Food Res (2009) 53:S330-S375). Estas enzimas son capaces de liberar inositol, ortofosfato y productos intermedios libres, que incluyen las formas mono, di, tri, tetra y pentafofosfato de inositol. Gran parte del hexafofosfato de inositol que se ingiere se hidroliza a inositol.

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

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

Puede usarse en la invención cualquier fuente de mioinositol adecuada para la ingestión del sujeto embarazado. Puede seleccionarse un metabolito de mioinositol del grupo que consiste en D-chiro-inositol, L-chiro-inositol y una combinación de los anteriores. En particular, el metabolito es D-chiro-inositol.

Debido a su importante papel fisiológico, y en particular debido a su capacidad para promover el crecimiento celular, el mioinositol es de particular interés para las mujeres que desean quedar embarazadas y para las mujeres embarazadas y lactantes. Sin embargo, el estudio de ingesta dietética que se realizó por los inventores y que se detalla en el Ejemplo 4 demuestra que las mujeres embarazadas generalmente no toman suficiente del tipo de alimento en el que se encuentra el mioinositol, principalmente frutas y verduras. Por lo tanto, los presentes inventores descubrieron que es especialmente beneficioso para las mujeres que desean quedar embarazadas, para las mujeres embarazadas y para las mujeres lactantes que obtengan suplementos de mioinositol.

La vitamina B2 es beneficiosa tanto para la madre como para la descendencia cuando se administra a mujeres embarazadas. En particular, los presentes inventores identificaron recientemente el efecto de la administración materna de vitamina B2 para la prevención del incremento de la adiposidad, el sobrepeso o la obesidad en la descendencia (solicitud de patente no publicada EP 14161190.5 y Ejemplo 5 de la presente solicitud). Los presentes inventores realizaron un estudio que se detalla en el Ejemplo 4, que demostró que una alta proporción de mujeres embarazadas no ingirió una cantidad suficiente de vitamina B2 en su dieta normal. Por lo tanto, es de particular interés complementar la dieta de las mujeres embarazadas con esta vitamina.

El término vitamina B2 como se usa en la presente memoria 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 el sujeto embarazado. En particular, la vitamina B2 puede ser riboflavina, por ejemplo, riboflavina que se vende bajo la marca registrada Riboflavin Universal.

Puede seleccionarse un metabolito de vitamina B2 del grupo que consiste en mononucleótido de flavina (en adelante FMN), dinucleótido de flavina y adenina (en adelante 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 preferente, la composición de la invención comprende además al menos una vitamina adicional que se selecciona de vitamina D, vitamina B6, vitamina B12 y mezclas de estas. Preferentemente, la composición comprende a la vitamina D, vitamina B6 y vitamina B12.

El término vitamina B12 como se usa en la presente memoria se refiere a la vitamina B12 y/o a un metabolito de esta.

El término vitamina B6 como se usa en la presente memoria se refiere a la vitamina B6 y/o a un metabolito de esta.

El término vitamina D como se usa en la presente memoria se refiere a la vitamina D, a un precursor de esta, y/o a un metabolito de esta.

El término precursor, como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier sustancia que se administra, por ejemplo, que se ingiere por un sujeto y se usa por el cuerpo de dicho sujeto para producir y/o formar un compuesto particular.

En particular, la vitamina B6 puede ser hidrocloreto de piroxidina y/o un metabolito de la vitamina B6 que se selecciona del grupo que consiste en 5'-fosfato de piridoxal (en adelante PLP).

En particular, la vitamina B12 puede ser cianocobalamina y/o un metabolito de la vitamina B12 que se selecciona del grupo que consiste en hidroxocobalamina, metilcobalamina, adenosilcobalamina y una combinación de estos.

En particular, la vitamina D puede ser vitamina D2, vitamina D3 o una combinación de estas, un precursor de vitamina D que se selecciona del grupo que consiste en 7-deshidrocolescalciferol, un metabolito de la vitamina D que se selecciona del grupo que consiste en 25-hidroxivitamina D3, 1,25-dihidroxivitamina D3, 25-hidroxivitamina D2, 1,25-dihidroxivitamina D2, y una combinación de los anteriores.

Con la máxima preferencia, la vitamina D es vitamina D3, un metabolito de la vitamina D que se selecciona del grupo que consiste en 25-hidroxivitamina D3, 1,25-dihidroxivitamina y una combinación de cualquiera de los anteriores. Aún más particularmente, la vitamina D3 es colecalciferol.

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 la máxima 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 que se detalla en el Ejemplo 3, los presentes inventores demuestran sorprendentemente que las mujeres embarazadas son más deficientes en las vitaminas B6, B12 y D en comparación con otros nutrientes. Por lo tanto, es de particular interés suplementar la dieta de las mujeres embarazadas con estas vitaminas para compensar estas deficiencias particularmente frecuentes.

El estudio del Ejemplo 3 también proporciona evidencia deficiencias comunes de zinc en al menos ciertas poblaciones de mujeres embarazadas, aunque en menor medida que las vitaminas B2, B12, B6 y D. Por lo tanto, también es particularmente ventajoso complementar la dieta de las embarazadas mujeres con zinc. De esta forma, en una realización preferente, la composición de la presente invención comprende además un fosfolípido. Más preferentemente, 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 del sujeto embarazado. En particular, 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 preferente, la composición comprende además probióticos, ya que se ha encontrado que mejoran la función de barrera intestinal y ayudan a que los nutrientes pasen a través del intestino (Cani PD y otros (2009) Gut 58:1091-1103). La combinación de mioinositol y vitamina B2 con probióticos mejora la absorción de estos nutrientes y otros nutrientes que pueden estar presentes en la composición.

El término probiótico, como se usa en la presente memoria, 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 bacterias probióticas, compuestos citoplasmáticos de bacterias probióticas, materiales de la pared celular. de bacterias probióticas, sobrenadantes de cultivo de bacterias probióticas y combinaciones de cualquiera de los anteriores.

En particular, el probiótico es bacterias probióticas vivas, bacterias probióticas no replicantes, bacterias probióticas muertas, bacterias probióticas no viables y cualquier combinación de estas. Más particularmente, el probiótico es una bacteria probiótica viva.

Preferentemente, los probióticos comprenden una combinación de Lactobacilo y Bifidobacteria. La cepa de Lactobacillus más preferente es la cepa Lactobacillus rhamnosus GG depositada por el centro de I + D de Nestlé Shanghai Ltd (13 Qiao Nan, Cao An Road, Jiading District, Shanghai 201812, PR China) en el Centro de Colección de Cultivos Microbiológicos Generales de China (CGMCC) y disponible bajo el número depósito CGMCC 1.3724. La cepa de Bifidobacteria más preferente es la cepa Bifidobacterium lactis BB12 depositada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) como CNCM 1-3446. Preferentemente, los probióticos comprenden una mezcla de la cepa Lactobacillus rhamnosus GG disponible con el número depósito CGMCC 1.3724 y de la cepa Bifidobacterium lactis BB12 depositada como CNCM 1-3446. Con la máxima preferencia, los probióticos consisten en una mezcla de la cepa Lactobacillus rhamnosus GG disponible con el número depósito CGMCC 1.3724 y de la cepa Bifidobacterium lactis BB12 depositada como CNCM 1-3446. En una realización preferente, 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 agregarse vitaminas y minerales adicionales. Por ejemplo, pueden agregarse vitaminas y minerales de acuerdo con las recomendaciones de los organismos gubernamentales 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 un equivalente de actividad de retinol (RAE), por ejemplo, en forma de betacaroteno 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: 100 a 2.500 mg de calcio, 35 a 350 mg de magnesio, 70 a 3.500 mg de fósforo, 2,7 a 45 mg de hierro, 0,1 a 10 mg de cobre, 22 a 1.100 µg de yodo, 6 a 400 µg de selenio, 77 a 3.000 µg de vitamina A o actividad de retinol equivalente (RAE), por ejemplo, en forma de betacaroteno o una mezcla de carotenoides, 8,5 a 850 mg de vitamina C, 0,14 a 14 mg de vitamina B1, 1,8 a 35 mg de niacina, 60 a 1.000 µg de ácido fólico, 3 a 300 µg de biotina, 1,9 a 109 µg de vitamina E.

La composición de la invención puede comprender ventajosamente además al menos un aceite que se selecciona de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, tales como ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA), en cualquier cantidad adecuada conocida por el experto en la técnica, por ejemplo, en una cantidad de 100-500 mg por dosis diaria, con mayor preferencia entre 200 y 400 mg por dosis diaria.

Sin embargo, a pesar de lo anterior, una ingesta alta de grasas y/o suplementos de PUFA maternos durante el embarazo se ha relacionado con un mayor riesgo de una mayor 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 que se mencionan en la presente memoria puede usarse en cualquier cantidad que sea efectiva para lograr el objetivo de la presente invención. Los artesanos expertos podrán determinar las dosis apropiadas. Típicamente, la dosificación dependerá de la edad, el tamaño y el estado de salud de la madre, de su estilo de vida y de su herencia genética.

Típicamente, las cantidades se definen en la presente solicitud como cantidades por dosis diaria. De este modo, la cantidad de nutrientes puede seleccionarse en cada composición en función de si se pretende 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 se puede consumir con menos frecuencia, mientras que el cuerpo todavía recibe constantemente una cantidad suficiente de tal nutriente.

La composición de la presente invención está destinada a la administración materna. Esto significa que la composición debe administrarse a una mujer que desea quedar embarazada, a una mujer embarazada y/o a una mujer lactante. Preferentemente, debe administrarse a una mujer que desea quedar embarazada y/o a una mujer embarazada, con la máxima preferencia a una mujer embarazada.

Preferentemente, la composición de la invención se administra a una mujer que desea quedar embarazada, por ejemplo durante al menos 1, 2, 3 o 4 meses antes del embarazo o el embarazo deseado. Cuando la composición se va a administrar a una mujer embarazada o lactante, la composición se administra preferentemente 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, incluso con mayor preferencia al menos 36 semanas durante el embarazo o la lactancia. A medida que aumentan los requerimientos nutricionales en el segundo y tercer trimestre del embarazo, se prefiere además administrar la composición de la invención durante el tercer trimestre del embarazo y con mayor preferencia durante el segundo y tercer trimestres del embarazo.

Es importante que las mujeres que desean quedar embarazadas preparen su cuerpo para el embarazo tomando los nutrientes adecuados. Después, las necesidades de nutrientes de las mujeres aumentan durante el embarazo y la lactancia. Además, la lactancia es exigente en las reservas maternas de energía, proteínas y otros nutrientes que deben 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 nutricional en polvo para reconstituir en leche o agua, un producto alimenticio, un producto alimenticio funcional, una bebida (bebida), un producto lácteo, una formulación farmacéutica, un producto alimenticio para mascotas, un suplemento nutricional o un nutraceutico.

Cuando la composición está en forma de una composición nutricional en polvo para reconstituir en leche o agua, comprende preferentemente una fuente de proteínas, una fuente de carbohidratos y una fuente de lípidos,

preferentemente junto con lecitina. Más preferentemente, también comprende lecitina de soja y/o un agente de carga. La fuente de proteína puede ser leche en polvo o leche desnatada en polvo. Como fuente de carbohidratos puede usarse sacarosa y/o maltodextrina. La fuente de lípidos puede ser aceite vegetal. La formulación también puede contener 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 agregarse compuestos de sabor, como el cacao en polvo o la miel, por ejemplo, para proporcionar variaciones de sabor.

El término "producto alimenticio", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier tipo de producto que pueda consumirse de manera segura por un humano o un animal. Dicho producto alimenticio puede estar en forma sólida, semisólida o líquida y puede comprender uno o más nutrientes, alimentos o suplementos nutricionales. Por ejemplo, el producto alimenticio puede comprender adicionalmente los siguientes nutrientes y micronutrientes: una fuente de proteínas, una fuente de lípidos, una fuente de carbohidratos, vitaminas y minerales. La composición también puede contener antioxidantes, estabilizadores (cuando se proporcionan en forma sólida) o emulsionantes (cuando se proporcionan en forma líquida).

El término "producto alimenticio funcional" como se usa en la presente memoria, se refiere a un producto alimenticio que proporciona una función adicional que promueve la salud o previene enfermedades al individuo.

Los productos alimenticios y los productos alimenticios funcionales incluyen, por ejemplo, productos a base de cereales, yogures u otros productos y barras derivados de la leche.

El término "suplemento nutricional", o "suplemento dietético", como se usa en la presente memoria, se refiere a un producto nutricional que proporciona nutrientes a un individuo que de otra forma no podría ser consumido en cantidades suficientes por dicho individuo. Por ejemplo, un suplemento nutricional puede incluir vitaminas, minerales, fibra, ácidos grasos o aminoácidos.

Los suplementos se pueden proporcionar, por ejemplo, en forma de píldora, tableta, pastilla, cápsula o tableta masticable, tableta o cápsula, o un suplemento en polvo que, por ejemplo, se puede disolver en agua o espolvorear sobre los alimentos. Lo más preferente es un suplemento en polvo que se puede disolver en líquido o espolvorear sobre alimentos, con mayor preferencia disuelto en agua. Tales suplementos típicamente proporcionan los nutrientes que se seleccionan sin representar una porción significativa de las necesidades nutricionales generales del sujeto. Típicamente, no representan más del 0,1 %, 1 %, 5 %, 10 % o 20 % de la necesidad diaria de energía del sujeto.

El término "productos lácteos", como se usa en la presente memoria, se refiere a productos alimenticios que se producen a partir de animales tales como vacas, cabras, ovejas, yaks, caballos, camellos y otros mamíferos. Ejemplos de productos lácteos son la leche baja en grasa (por ejemplo, 0,1 %, 0,5 % o 1,5 % de grasa), leche descremada, leche en polvo, leche entera, productos lácteos enteros, mantequilla, suero de leche, productos de suero de leche, leche descremada, productos de leche descremada, productos con alto contenido de grasa de leche, leche condensada, crema fresca, queso, helados y productos de confitería, bebidas probióticas o bebidas tipo yogur probiótico.

El término "formulación farmacéutica", como se usa en la presente memoria, se refiere a una composición que comprende al menos un agente farmacéuticamente activo, sustancia química o fármaco. La formulación farmacéutica puede estar en forma sólida o líquida y puede comprender al menos un agente activo adicional, vehículo, vehículo, excipiente o agente auxiliar identificable por un experto en la técnica. La formulación farmacéutica puede estar en forma de tableta, cápsula, gránulos, polvo, líquido o jarabe. El término "producto de bebida" como se usa en la presente memoria, se refiere a un producto nutricional en forma líquida o semi-líquida que puede consumirse de manera segura por un individuo. El término "producto alimenticio para mascotas", como se usa en la presente memoria, se refiere a un producto nutricional que se destina al consumo de mascotas. Una mascota o animal de compañía, como se hace referencia en la presente memoria, debe entenderse como un animal que se selecciona de entre perros, gatos, pájaros, peces, roedores como ratones, ratas y conejillos de indias, conejos, etc.

Todos los ingredientes de la composición se pueden mezclar juntos o, alternativamente, la composición se puede proporcionar en forma de un kit de partes en el que los ingredientes o grupos de ingredientes se proporcionan por separado y se destinada a consumirse juntos por la mujer.

Por lo tanto, es otro objeto de la presente invención un kit de partes que comprende al menos dos composiciones separadas físicamente, cada una de las cuales comprende al menos uno de los ingredientes que se mencionan anteriormente, en el que al menos una de las composiciones separadas físicamente comprende mioinositol y al menos una de las composiciones separadas físicamente comprende vitamina B2.

Cada una de las composiciones separadas físicamente puede comprender además uno o más de los otros ingredientes que se mencionan anteriormente. Más preferentemente, una primera composición comprende la vitamina B2 y opcionalmente otras vitaminas que se mencionan anteriormente y una segunda composición comprende probióticos. El mioinositol puede proporcionarse en la primera o la segunda composición o incluso por separado, pero preferentemente se proporciona en la misma composición que las vitaminas. En una realización

preferente 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 que se mencionan anteriormente, excepto los probióticos, y una segunda composición que comprende probióticos. En una realización más preferente, 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 una alta concentración de minerales u otros nutrientes.

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

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

Como se indicó anteriormente, además de los presentes inventores que identifican que una composición para administración materna que comprende vitamina B2 y mioinositol es de particular utilidad para abordar las necesidades nutricionales específicas de mujeres que desean quedar embarazadas, de mujeres embarazadas y lactantes y de su descendencia, dichos inventores también encontraron sorprendentemente que la administración de vitamina B2 a un sujeto puede mejorar la absorción de glucosa en las células de mamíferos. Aún más sorprendentemente, los inventores descubrieron que cuando la vitamina B2 se usa en combinación con la vitamina D o vitamina D y zinc, puede haber un efecto mejorado en la mejora de la absorción de glucosa en células de mamíferos, en particular en las células musculares de mamíferos. En consecuencia, la administración de vitamina B2 a un sujeto antes y/o durante el embarazo puede prevenir y/o tratar la DMG y/o prevenir una afección que se asocia con la DMG en un sujeto embarazado o su descendencia.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona la vitamina B2 para su uso para tratar o prevenir la DMG y una afección que se asocia a la misma en un sujeto embarazado y/o su descendencia.

Como se indicó anteriormente, los inventores encontraron sorprendentemente que la vitamina B2 puede usarse para mejorar la absorción de glucosa en células de mamíferos, en particular en las células musculares de mamíferos. En consecuencia, la administración de vitamina B2 a un sujeto antes y/o durante el embarazo puede prevenir y/o tratar la DMG y/o prevenir una afección que se asocia con la DMG en un sujeto embarazado o su descendencia. Los inventores también descubrieron que los ratones heterocigotos db/db cuando se les administra una vitamina B2 suplementaria durante un período previo a la concepción y durante el embarazo tienen una concentración de glucosa en ayunas inferior en comparación con los ratones que no reciben una dosis suplementaria.

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

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

Se puede determinar si un mamífero tiene una tolerancia a la glucosa alterada o no, mediante la medición de su concentración plasmática de glucosa en ayunas o mediante la realización de una prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT). La persona experta estará familiarizada con estas pruebas y los criterios para diagnosticar una intolerancia a la glucosa y, por lo tanto, la DMG. De acuerdo con los criterios que se establecen en las pautas de la Academia Nacional de Bioquímica Clínica (NACB) y las pautas de la Asociación Internacional de Diabetes y Grupo de Estudio del Embarazo (IADPSG), publicadas por la Asociación Americana de Química Clínica (AACC), se considera un sujeto humano embarazado que tiene una tolerancia a la glucosa alterada si su concentración de glucosa en plasma en ayunas es igual a 5,1 mmol/l o más, o si su concentración de glucosa en sangre es superior a 10 mmol/l 1 hora después de una bebida de glucosa de 75 gramos, o superior a 8,5 mmol/l 2 horas después de una bebida de glucosa de 75 gramos.

El término "tratar" como se usa en la presente memoria abarca la mejora y/o el alivio de una afección, es decir, la mejora y/o el alivio de los síntomas de una afección. Puede, por ejemplo, abarcar la reducción de la gravedad de una afección en un sujeto.

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

Puede usarse cualquier fuente o forma de vitamina B2 adecuada para la ingestión del sujeto embarazado. En particular, la vitamina B2 puede ser riboflavina, por ejemplo, riboflavina que se vende bajo la marca registrada Riboflavina Universal.

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

- 5 Cualquier fuente o forma de mioinositol adecuada para la ingestión por el sujeto embarazado puede usarse en la invención.

Puede seleccionarse un metabolito de mioinositol del grupo que consiste en D-chiro-inositol, L-chiro-inositol y una combinación de estos. En particular, el metabolito es D-chiro-inositol.

- 10 Una combinación de vitamina B2 con mioinositol (*cis*-1,2,3,5-*trans*-4,6-ciclohexanohexol) y/o uno o más probióticos y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc pueden ser particularmente efectivos para el tratamiento y/o prevención de la DMG y las afecciones que se asocian a esta en un sujeto embarazado y/o su descendencia. La combinación de vitamina B2 con estos ingredientes que se enumeran puede proporcionar un efecto mejorado, por ejemplo, un efecto más que aditivo o sinérgico, sobre lo que podría esperarse sobre la base del efecto de los ingredientes individuales cuando se usan solos para tratar o prevenir la DMG y una afección asociada a esta en un sujeto embarazado y/o su descendencia.

- 20 De acuerdo con la presente invención, la vitamina B2 se usa en combinación con mioinositol y opcionalmente una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o uno o más probióticos y/o zinc.

- 25 En particular, los inventores descubrieron que cuando se usa la vitamina B2 en combinación con la vitamina D, puede haber una potenciación mejorada en la absorción de glucosa en comparación con cuando la vitamina B2 o la vitamina D se usa sola. Más particularmente aún, los inventores encontraron que cuando la vitamina B2 se usa en combinación con la vitamina D y zinc, puede haber una potenciación mejorada en la absorción de glucosa en comparación con cuando la vitamina B2, el zinc o la vitamina D se usan solos, y que esta potenciación mejorada puede ser más que aditiva.

- 30 Además, los inventores descubrieron que los ratones que no se les administró con mioinositol en combinación con la vitamina B2 suplementaria tienen una concentración de glucosa en ayunas sorprendentemente baja durante el embarazo y antes del embarazo, y aún más, los inventores descubrieron que los ratones db/db heterocigotos cuando se administran mioinositol en combinación con la vitamina B2 suplementaria durante el embarazo, tienen una deposición de grasa retroperitoneal sorprendentemente inferior.

- 35 Puede usarse en la invención cualquier fuente o forma de vitaminas B6, B12 y D y/o zinc adecuadas para la ingestión por el sujeto embarazado.

- 40 En particular, la vitamina B6 puede ser hidrocloreuro de piroxidina y/o un metabolito de la vitamina B6 que se selecciona del grupo que consiste en 5'-fosfato de piridoxal (en adelante PLP).

- En particular, la vitamina B12 puede ser cianocobalamina y/o un metabolito de la vitamina B12 que se selecciona del grupo que consiste en hidroxocobalamina, metilcobalamina, adenosilcobalamina y una combinación de estos.

- 45 En particular, la vitamina D puede ser vitamina D2, vitamina D3, un precursor de vitamina D que se selecciona del grupo que consiste en 7-deshidrocolescalciferol, un metabolito de vitamina D que se selecciona 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

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

- 55 En particular, el probiótico es bacterias probióticas vivas, bacterias probióticas no replicantes, bacterias probióticas muertas, bacterias probióticas no viables y cualquier combinación de estas. Más particularmente, el probiótico es una bacteria probiótica viva.

- 60 La una o más bacterias probióticas pueden ser cualquier bacteria de ácido láctico, Bifidobacterias, o una combinación de estas, en la que dichas bacterias de ácido láctico y Bifidobacterias tienen características probióticas establecidas. Los ejemplos no limitantes de cepas de bacterias del ácido láctico incluyen; el *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 que se obtiene, entre otros, de Valio Oy de Finlandia con la marca LGG y el *Lactobacillus rhamnosus* depositada por el centro de I + D de Nestlé Shanghai Ltd (13 Qiao Nan, Cao An Road, Distrito de Jiading, Shanghai 201812, PR China) en el Centro de Colecciones de Cultivos Microbiológicos General de China (CGMCC) y disponible con el número depósito CGMCC 1.3724. Ninguno de los ejemplos limitantes de cepas de Bifidobacterias incluye; la *Bifidobacterium lactis* depositada en la Collection Nationale de Cultures De Microorganismes (CNCM) CNCM I-3446 que se vende, entre otras cosas, por la empresa Christian Hansen de Dinamarca con la marca Bb12, la *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 que se vende por Morinaga Milk Industry Co. Ltd. de Japón con la marca

BB536, la cepa de *Bifidobacterium breve* que se vende por Danisco con la marca Bb-03, la cepa de *Bifidobacterium breve* que se vende por Morinaga con la marca M-16V y la cepa de *Bifidobacterium breve* que se vende por el Institut Rosell (Lallemand) bajo la marca comercial R0070.

- 5 En una realización particular, el uno o más probióticos es una mezcla de *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 y de *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446

10 El *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 y la *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 pueden usarse en una proporción de 1:99 a 99:1, sin embargo, más particularmente se usarán en una proporción de 1:2 a 2 a 1, incluso más particularmente 1:1.

15 La vitamina B2 en combinación con el mioinositol y opcionalmente uno o más probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D, y/o zinc pueden emplearse en cualquier dosis efectiva que proporcione un beneficio con respecto a la tratamiento o prevención de la DMG y una afección que se asocia a la misma en un sujeto embarazado y/o su descendencia.

Una dosis efectiva puede ser cualquier dosis que mejore, en cualquier grado, una intolerancia a la glucosa en un sujeto embarazado.

- 20 Está dentro del alcance de la persona experta determinar una dosis efectiva. Típicamente, una dosis efectiva dependerá del tipo, edad, tamaño y estado de salud del sujeto, del estilo de vida del sujeto y de su herencia genética.

25 Una dosis efectiva puede, por ejemplo, determinarse probando el efecto de una dosis sobre la concentración plasmática de glucosa en ayunas de un sujeto, o llevando a cabo un OGTT. Una dosis efectiva debe mejorar la concentración de glucosa en ayunas de un sujeto y disminuir la respuesta glucémica de un sujeto.

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

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

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

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

- 40 El término "dosis" como se usa en la presente memoria se refiere a una cantidad diaria que se administra a un sujeto antes y/o durante el embarazo y/o durante la lactancia. La cantidad o dosis diaria puede administrarse de una vez o se puede distribuir en varias administraciones a lo largo del día. La dosis puede administrarse mediante cualquier procedimiento conocido, en particular por vía entérica, por ejemplo, por vía oral.

45 Las dosis pueden administrarse en cualquier momento, por ejemplo, durante el día o la noche. La dosis puede ser particularmente efectiva si se administra antes de que el sujeto coma alimentos o bebidas, por ejemplo, cene o coma un refrigerio.

- 50 En una realización, la dosis se extiende sobre 2 administraciones, en particular la dosis se extiende sobre 2 administraciones, una por la mañana y otra por la noche, en particular antes del desayuno y antes de la cena.

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

El término "cena" tal como se usa en la presente memoria se refiere a la última comida del día.

- 55 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un kit tal como se define en las reivindicaciones para su uso para tratar o prevenir la DMG y una afección que se asocia con la misma en un sujeto embarazado y/o su descendencia, en el que dicha composición se administra a dicho sujeto antes y/o durante el embarazo y/o durante la lactancia, el kit que comprende:

60 a. vitamina B2 y mioinositol y opcionalmente uno o más probióticos, y/o una o más de las vitamina B6, B12 y D y/o zinc, y

65 b. un requisito de dosificación indicativo para un sujeto embarazado; en el que el sujeto es un mamífero que se selecciona de entre: un gato, un perro y un ser humano. Los requisitos de dosificación pueden ser 2 administraciones por día, en particular 2 administraciones por día antes de cualquier alimento o bebida. Más particularmente, 2 administraciones por día en las que una es por la mañana y otra por la tarde. Aún más

particularmente, 2 administraciones por día en las que una es por la mañana antes del desayuno y otra por la tarde antes de la cena.

5 La vitamina B2, el mioinositol, uno o más probióticos, y una o más de las vitaminas B6, B12 y D, pueden proporcionarse en un formato que proporcione la liberación sostenida de dichas vitaminas o uno o más probióticos. De esta forma, estos compuestos se pueden consumir con menos frecuencia, mientras que el cuerpo todavía recibe constantemente una cantidad suficiente de ellos.

10 La vitamina B2 que se usa en combinación con mioinositol y opcionalmente y/o uno o más probióticos y/o 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 uno o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc. Alternativamente, uno o más de dicho 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 separado a dicha vitamina B2, por ejemplo, vitamina B2 y mioinositol (opcionalmente con una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc) pueden administrarse por separado a dicho uno o más probióticos. La administración separada puede ser simultánea pero puede administrarse por separado, por ejemplo, la vitamina B2 y mioinositol (opcionalmente con una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc) al mismo tiempo, pero por separado a dicho uno o más probióticos, por ejemplo en dos tabletas que se administran por separado y secuencialmente en rápida sucesión, por ejemplo, dentro de 5, 4, 3, 2, 1 minuto, a dicho uno o más probióticos. La vitamina B2 en combinación con el mioinositol y, opcionalmente, uno o más probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc, se destina a la administración a un sujeto que desee quedar embarazado, a un sujeto embarazado y/o a un sujeto lactante. En particular, debe administrarse a un sujeto que desee quedar embarazado y/o a un sujeto embarazado. Más particularmente, se administrará a un sujeto embarazado.

25 Si la vitamina B2 en combinación con el mioinositol y opcionalmente uno o más probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc, se administra a un sujeto que desea quedar embarazado, por ejemplo, puede administrarse durante al menos 1, 2, 3 o 4 meses antes del embarazo o el embarazo deseado. Si la vitamina B2 en combinación con el mioinositol y opcionalmente uno o más probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc se administran a un sujeto embarazado, puede administrarse total o parcialmente durante el embarazo, 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, en dependencia del período de gestación del sujeto. La administración también puede continuar durante todo o parcialmente durante el período de lactancia de dicho sujeto.

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

La vitamina B2 en combinación con el mioinositol y opcionalmente uno o más probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc, puede administrarse o emplearse en cualquier forma adecuada para la ingestión por el sujeto, por ejemplo, puede emplearse en forma de una composición, por ejemplo, una composición nutricional en polvo, un producto alimenticio, un producto alimenticio funcional, una bebida (bebida), un producto lácteo, una formulación farmacéutica, un producto alimenticio para mascotas, un nutracéutico, un suplemento nutricional, por ejemplo, un suplemento nutricional en polvo, por ejemplo, para espolvorear sobre alimentos o disolver en un medio acuoso, por ejemplo, agua o jugo, o leche.

45 Cuando la composición está en forma de una composición nutricional en polvo, puede comprender además una fuente de proteínas, una fuente de carbohidratos y una fuente de lípidos, posiblemente junto con lecitina. También puede comprender lecitina de soja y/o un agente de carga. La fuente de proteína puede ser leche en polvo o leche desnatada en polvo. Como fuente de carbohidratos puede usarse sacarosa y/o maltodextrina. La fuente de lípidos puede ser aceite vegetal. La formulación también puede contener 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 agregarse compuestos de sabor, como el cacao en polvo o la miel, por ejemplo, para proporcionar variaciones de sabor.

55 La vitamina B2 en combinación con el mioinositol y, opcionalmente, uno o más probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc, también pueden usarse en combinación con otras vitaminas y minerales. Por ejemplo, las vitaminas y minerales que se recomiendan por un organismo gubernamental, como la USRDA, para la suplementación en el embarazo, por ejemplo, calcio, magnesio, fósforo, hierro, cobre, yodo, selenio, vitamina A o actividad de retinol equivalente (RAE), por ejemplo, betacaroteno o una mezcla de carotenoides, vitamina C, vitamina B1, niacina, ácido fólico, biotina, vitamina E.

60 Puede ser particularmente beneficioso si la vitamina B2 en combinación con el mioinositol y opcionalmente uno o más probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D, se usa en combinación con uno o más de los siguientes micronutrientes en las siguientes cantidades: 100 a 2.500 mg de calcio, 35 a 350 mg de magnesio, 70 a 3.500 mg de fósforo, 2,7 a 45 mg de hierro, 0,1 a 10 mg de cobre, 22 a 1.100 µg de yodo, 6 a 400 µg de selenio, 77 a 3.000 µg de vitamina A o actividad de retinol equivalente (RAE), por ejemplo, en forma de betacaroteno o una mezcla de carotenoides, 8,5 a 850 mg de vitamina C, 0,14 a 14 mg de vitamina B1, 1,8 a 35 mg de niacina, 60 a 1.000 µg de ácido fólico, 3 a 300 µg de biotina, 1,9 a 109 µg de vitamina E.

La vitamina B2 en combinación con el mioinositol y opcionalmente uno o más probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D, y/o zinc también pueden usarse ventajosamente en combinación con al menos un oligosacárido y/o al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga, como el ácido araquidónico (ARA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o el 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 vitamina B2 en combinación con el mioinositol y opcionalmente uno o más probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc, también pueden usarse en combinación con otros ingredientes comúnmente usados en forma de composición en que se emplea, por ejemplo, un suplemento nutricional en polvo, o un producto alimenticio. Los ejemplos no limitantes de tales ingredientes incluyen: otros nutrientes, por ejemplo, que se seleccionan del grupo de lípidos (opcionalmente además de DHA y ARA), carbohidratos y proteínas, micronutrientes (además de los establecidos anteriormente) o agentes farmacéuticamente activos; aditivos alimentarios convencionales como antioxidantes, estabilizadores, emulsionantes, acidulantes, espesantes, tampones o agentes para el ajuste del pH, agentes quelantes, colorantes, excipientes, agentes aromatizantes, agentes osmóticos, vehículos farmacéuticamente aceptables, conservantes, azúcares, edulcorantes, texturizadores, emulsionantes, agua y cualquier combinación de estos.

Sin embargo, como se indicó anteriormente, una ingesta alta de grasas durante el embarazo y/o la suplementación materna de PUFA se ha relacionado con un mayor riesgo de adiposidad superior en la descendencia. En concordancia, en una realización particular, la vitamina B2 en combinación con el mioinositol y opcionalmente uno o más probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc no se usa en combinación con una grasa poliinsaturada de cadena larga grasas ácidas y/o animales y/o grasas vegetales.

En una realización particular, la vitamina B2 en combinación con el mioinositol y opcionalmente uno o más probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc no se usa en combinación con un oligosacárido.

Como se indicó anteriormente, la DMG se asocia con una variedad de afecciones que afectan al sujeto embarazado y/o a su descendencia. Se considera que la DMG se asocia con una afección si aumenta el riesgo de que un sujeto tenga o desarrolle esa afección durante el embarazo, durante el parto, después del nacimiento o más adelante en la vida de dicho sujeto embarazado o su descendencia.

Los ejemplos no limitantes de afecciones que se asocian con la DMG, que afectan al sujeto embarazado y/o a su descendencia, incluyen; el parto prematuro y la cesárea, la lesión al nacimiento de la madre o el bebé, la distocia de hombros, la macrosomía, una concentración excesiva de glucosa en sangre de la descendencia, el exceso de peso/adiposidad y los trastornos metabólicos que se asocian, por ejemplo, a la diabetes tipo II, la enfermedad del hígado graso y la obesidad, inmediatamente después del nacimiento y más tarde en el vida de la descendencia y un mayor riesgo para la madre de tener o desarrollar diabetes tipo 2 inmediatamente después del nacimiento y más adelante en la vida. En consecuencia, al tratar o prevenir la DMG, la vitamina B2, en combinación con el mioinositol y, opcionalmente, uno o más probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D y/o zinc, también pueden usarse para tratar o prevenir estas afecciones en estos sujetos embarazados o su descendencia.

En otro aspecto, se proporciona la vitamina B2 en combinación con mioinositol para su uso en un procedimiento para tratar y/o prevenir la DMG y una afección que se asocia a la misma en un sujeto embarazado y/o su descendencia que comprende administrar la vitamina B2 en combinación con el mio y opcionalmente uno o más probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D, y/o zinc a dicho sujeto antes y/o durante el embarazo y/o durante la lactancia.

La DMG es más frecuente entre los sujetos que la padecieron en un embarazo anterior, si el sujeto tiene sobrepeso u obesidad, si hay antecedentes familiares de DMG o diabetes tipo II. Si el sujeto es humano y tiene más de 25 años de edad, y si el sujeto es humano y es negro, hispano, indio americano o asiático.

En consecuencia, la vitamina B2 en combinación con el mioinositol y, opcionalmente, uno o más probióticos, y/o una o más de las vitaminas B6, B12 y D, y/o zinc pueden ser particularmente beneficiosos para tratar y/o prevenir la DMG en uno o más de estos subconjuntos de sujetos.

Como se indica en la presente memoria, la combinación de vitamina B2 y mioinositol, y cualquier otro ingrediente opcional que se divulga en la presente memoria, se comprenden en la composición de la invención, que se emplea en cualquier procedimiento o uso que se establece en la presente memoria.

Otras ventajas y características de la presente invención son evidentes a partir de la figura y el ejemplo no limitativo.

La presente invención se describirá con más detalle, mediante el uso de los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Una composición de ejemplo que comprende la vitamina B2 en combinación con mioinositol, las vitaminas B6, B12 y D, y el *Lactobacillus rhamnosus* GG¹ y la *Bifidobacterium lactis* BB12² se expone en la tabla 1.

- 5 La composición en la tabla 1 es para un suplemento nutricional en forma de polvo, que se destina a rociarse en los alimentos.

Tabla 1: Composición del Ejemplo 1

Ingrediente	Cantidad por dosis diaria
Mioinositol	4g
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 ¹⁾	1x10 ⁹ ufc
<i>Bifidobacterium lactis</i> BB12 ²⁾	1x10 ⁹ 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 como un polvo y en un segundo sobre todos los demás ingredientes.

Ejemplo 2

Se proporciona una bebida de leche en polvo para mujeres embarazadas para reconstituir en agua que consiste en 30 g de leche en polvo por porción mezclada con los ingredientes enumerados en la Tabla 1, en la mitad de las cantidades mencionadas en la Tabla 1. La composición debe administrarse a una mujer embarazada dos veces al día durante al menos el tercer trimestre del embarazo.

Ejemplo 3 (para referencia, no de acuerdo a la invención)

El efecto de la vitamina B2 sobre la absorción de glucosa en las células musculares diferenciadas de L6 se midió después de incubaciones a corto (2 h) y a largo plazo (24 h).

El ingrediente G se refiere a la vitamina B2, el ingrediente k se refiere a la 1,25-dihidroxitamina D3, y el ingrediente J se refiere al 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 sin suero (DMEM) que contenía D-glucosa 5,5 mM para lograr las concentraciones finales probadas y el 0,1 % de DMSO.

Los mioblastos L6 se mantuvieron en medio de crecimiento o DMEM con glucosa 25 mM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml. Para el estudio de absorción de glucosa, las células se cultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de 1.000-1.500 células/pocillo en 0,5 ml de medio de crecimiento. Cinco días después de la siembra en placa, se realizó la inducción de la diferenciación en miotubos en DMEM con glucosa 25 mM que contenía FBS al 2 %, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml a 37 °C bajo una atmósfera de CO₂ al 5 %. El medio de cultivo se cambió cada dos días.

Para la incubación a corto plazo (2 horas), el día anterior a la prueba, el medio de cultivo se reemplazó por DMEM con D-glucosa 25 mM que contenía BSA al 0,25 %, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml. 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 a largo plazo (24 horas), el día anterior a la prueba, las células se incubaron previamente en presencia de los ingredientes probados (ingrediente J, K o una combinación de estos) durante 22 horas en DMEM que contiene D-glucosa 25 mM 0,25 % de BSA, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina 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 absorción de glucosa se midió por incubación de las células con glucosa 2-desoxi-D- [1,2 3H] radiomarcada durante 15 minutos. La absorción de glucosa se detuvo mediante dos pasos de lavado en PBS 1X helado. Después las células se solubilizaron en NaOH 0,1 N durante 30 minutos. Después se contó la radiactividad que se asocia a las células y se determinó la cuantificación de proteínas mediante el uso del procedimiento de Lowry colorimétrico.

Cada ingrediente se probó por triplicado.

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

Se realizó un análisis estadístico que permite comparaciones múltiples (ANOVA unidireccional seguido de una prueba t de Dunnett; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ versus condición de control). Todos los ingredientes que muestran un incremento significativo en la absorción de glucosa en comparación con el control o la condición basal se consideran activos.

Los resultados se muestran en las Figuras 3 a la 5.

Como puede verse en la figura 3, se observaron incrementos en la absorción de glucosa en las células musculares diferenciadas L6 con el ingrediente G después de una incubación a corto plazo (2 horas) y una incubación a largo plazo (24 horas) en ausencia de insulina.

Como puede verse en la figura 4, se observaron incrementos en la absorción de glucosa en las células musculares diferenciadas L6 con la combinación del ingrediente G y el ingrediente K después de la incubación a corto plazo (2 horas) y la incubación a largo plazo (24 horas) en ausencia de insulina.

Como puede verse en la figura 5, se observaron incrementos en la absorción de glucosa en las células musculares diferenciadas L6 con la combinación del ingrediente G, K y el ingrediente J después de una incubación a corto plazo (2 horas) en ausencia de insulina.

Ejemplo 4

Animales

Los ratones db/db heterocigotos machos y hembras (Leprdb/+) se obtuvieron originalmente de Jackson Laboratories (EE. UU.), y se estableció una colonia de cría (Ruakura, Nueva Zelanda).

Los ratones hembra se genotipificaron y después se destetaron a los 21 días de edad, y ambos ratones WT (Lepr+/+) y heterocigotos (Leprdb/+) se colocaron en la dieta AIN-93G (composición que se especifica en la tabla 2). A los 28 días de edad, se realizó la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT), después los ratones se asignaron al azar a una de las 4 dietas

1 - control AIN-93G

2 - AIN-93G suplementado con mioinositol

3 - AIN-93G suplementado con vitamina B2

4 - AIN-93G suplementado con mioinositol y vitamina B2

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

Se realizó un OGTT adicional antes y después de la dieta experimental).

Todos los OGTT se realizaron de esta manera. Brevemente, los ratones estuvieron en ayunas durante 6 horas (de 7 a.m. a 1 p.m.). La glucosa en ayunas se midió a partir de sangre tomada del final de la cola con un glucómetro de mano (glucómetro Freestyle Optimum por Abbott). El ratón después recibió un reto con glucosa - 2 g/kg que se administró por sonda gástrica. La concentración de glucosa en sangre que se midió mediante el uso del glucómetro, a los 30, 60, 90 y 120 minutos después del reto con glucosa.

A las 12 semanas de edad, las hembras se alojaron con un macho con genotipo apareado hasta que se observó el tapón vaginal, que indica el día 0,5 de gestación (término del embarazo = 19,5 días). Los ratones hembra permanecieron en su dieta experimental asignada a lo largo de la gestación. Se realizó un OGTT en el día gestacional 16,5.

En el día de gestación 18,5, los ratones se sacrificaron después de un ayuno de 6 horas. Se recogieron muestras de sangre en ayunas y la almohadilla de grasa retroperitoneal.

Tabla 2 : Dieta AIN-93G

Producto # D10012G		gm%	Kcal%
Proteína		20	20,3
Carbohidrato		64	63,9
Grasa		7	15,8
	Total kcal/gm	3,9	
Ingrediente		gm	Kcal
Caseína, 30 Mesh		200	800
L-cistina		3	12
Almíndon de maíz		397	1.590
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 vitamina V10037		10	40
Bitartrato de colina		2,5	0
Total		1.000	4.000

Tabla 2b - Mezcla de vitaminas agregada a la AIN-93G

Ingrediente	gm	Cantidad en 10gm
Acetato de vitamina A (500,000 UI/gm)	0,8	4.000 UI
Vitamina D3 (100,000 UI/gm)	1	1.000 IU
Acetato de vitamina E (500 UI/gm)	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
Piridoxina---HCl	0,7	7 mg
Riboflavina	0,6	6 mg
Tiamina HCl	0,6	6 mg
Sacarosa	971,925	
TOTAL	1.000	

Tabla 2c - Cantidades suplementadas de mioinositol y vitamina B2 en las dietas experimentales

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

Resultados

Tabla 3 - Concentración de glucosa en sangre y AUC para los ratones WT y heterocigotos a las 4 semanas de edad. Media +/- s.e.m.

Genotipo	Glucosa en sangre a los 0 minutos (mmol/l)	Glucosa en sangre a los 30 minutos (mmol/l)	Glucosa en sangre a los 60 minutos (mmol/l)	Glucosa en sangre a los 90 minutos (mmol/l)	Glucosa en sangre a los 120 minutos (mmol/l)	AUC
WT	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

Como puede verse en la tabla 3 y en la figura 8, antes de la asignación al azar a las dietas experimentales, no hubo diferencias en el OGTT entre WT y hembras heterocigotas.

Tabla 4 - mediciones de glucosa en sangre en ayunas (día gestacional 18,5) - datos que se presentan como media +/- s.e.m.

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

Como puede verse en la figura 6 y a partir de los datos de la tabla 4, los ratones Het que se le administró una combinación de vitamina B2 y mioinositol tuvieron un nivel de glucosa en sangre en ayunas inferior al final de la gestación en comparación con los ratones Het que se les administró inositol o probióticos solos, o los ratones Het que no se les administró mioinositol o B2.

Tabla 5 - peso de las almohadillas grasas retroperitoneales y grasa gonadal, media +/- s.e.m.

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

Como puede verse en la figura 7 y/o a partir de los datos de la tabla 5, los ratones Het que se les administró una combinación de vitamina B2 y mioinositol tuvieron un peso de las almohadillas de grasa retroperitoneal inferior y un peso de grasa gonadal inferior en comparación con los ratones Het que se les administró mioinositol o probióticos solos, o los ratones Het que no se les administró mioinositol o B2.

Tabla 6 - Concentración de glucosa en ayunas en sangre después de la OGTT a las 12 semanas de edad. Media +/- s.e.m.

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

Como puede verse en los datos de la tabla 6, los ratones Het que se les administró vitamina B2 y/o una combinación de vitamina B2 y mioinositol tuvieron una concentración de glucosa en sangre en ayunas inferior a las 12 semanas de edad (antes de la gestación) en comparación a los ratones Het que no se les administró mioinositol o B2, o a los ratones Het que no se les administró mioinositol.

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

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

Como puede verse en los datos de la tabla 7 y de la figura 17, los ratones Het que se les administró vitamina B2 y mioinositol tuvieron concentraciones de leptina en plasma inferiores el día 18,5 de gestación en comparación con los ratones Het que no se les administró mioinositol o B2, o con los ratones Het que se les administró mioinositol.

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

	Glucosa en sangre 0 minutos (mmol/l)	Glucosa en sangre 30 minutos (mmol/l)	Glucosa en sangre 60 minutos (mmol/l)	Glucosa en sangre 90 minutos (mmol/l)	Glucosa en sangre 120 minutos (mmol/l)	AUC
grupo WT 1	7,6 +/- 0,5	17,3 +/- 1,3	11,9 +/- 0,9	10,4 +/- 0,7	10,4 +/- 0,7	1.438 +/- 86
grupo Het 1	7,2 +/- 0,4	17,3 +/- 1,4	12,9 +/- 0,6	11,2 +/- 0,7	11,2 +/- 0,7	1.506 +/- 81
grupo Het 2	7,1 +/- 0,8	16,0 +/- 2,7	13,1 +/- 2,6	10,2 +/- 1,3	10,2 +/- 1,3	1.439 +/- 158
grupo Het 3	7,0 +/- 0,5	13,8 +/- 1,7	11,5 +/- 0,5	10,1 +/- 0,4	10,1 +/- 0,4	1.340 +/- 65
grupo Het 4	7,2 +/- 0,7	15,7 +/- 1,2	11,6 +/- 1	10,4 +/- 0,6	10,4 +/- 0,6	1.376 +/- 86

Como puede verse en los datos de la tabla 8, los ratones Het que se les administró la B2 y/o una combinación de vitamina B2 y mioinositol tuvieron concentraciones inferiores de glucosa en sangre en ayunas y AUC en el día 16,5 de gestación en comparación con los ratones Het que no se les administró mioinositol o B2.

Ejemplo 5 (para referencia, no de acuerdo a la presente invención)

Se midió el efecto de la vitamina B2 sobre la absorción de glucosa en células musculares diferenciadas L6 resistentes a la insulina después de una incubación a corto (2 h) y a largo plazo (24 h) en ausencia de insulina.

El ingrediente G se refiere a la vitamina B2 y se probó a 1 μ M.

El día del experimento, el ingrediente G se diluyó en un medio sin suero (DMEM) que contenía D-glucosa 5,5 mM para lograr la concentración final probada y el 0,1 % de DMSO.

Los mioblastos L6 se mantuvieron en medio de crecimiento o DMEM con glucosa 25 mM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 μ g/ml. Para el estudio de absorción de glucosa, las células se cultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de 1.000-1.500 células/pocillo en 0,5 ml de medio de crecimiento. Cinco días después de la siembra en placa, se realizó la inducción de la diferenciación en miotubos en DMEM con glucosa 25 mM que contenía FBS al 2 %, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 μ g/ml a 37 °C bajo una atmósfera de CO₂ al 5 %. El medio de cultivo se cambió cada dos días.

Para la incubación a corto plazo (2 horas), el día anterior a la prueba, las células se cultivaron en DMEM con D-glucosa 25 mM que contenía BSA al 0,25 %, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 μ g/ml durante 18 horas. El día después y antes de la prueba, las células se lavaron e incubaron durante 6 horas más en DMEM que contenía D-glucosa 5,5 mM, BSA al 0,34 %, palmitato 300 μ M (PALM) sin insulina. 2 horas antes del final del tiempo de incubación, se añadió vitamina B2 a los medios a una concentración final de 1 μ M).

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

La absorción de glucosa se midió por incubación de las células con glucosa 2-desoxi-D- [1,2 ³H] radiomarcada durante 15 minutos. La absorción de glucosa se detuvo por dos pasos de lavado en PBS 1X helado. Después, las células se solubilizaron en NaOH 0,1 N durante 30 minutos. Después se contó la radiactividad que se asocia a las células y se determinó la cuantificación de proteínas mediante el uso del procedimiento de Lowry colorimétrico.

Cada ingrediente se probó por triplicado.

Los resultados se expresan en pmol de glucosa incorporada/min/mg de proteína y en % de control.

Se realizó un análisis estadístico que permitió comparaciones múltiples (ANOVA de una vía seguido de una prueba t de Dunnett; * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 versus condición de control). Un ingrediente que muestra un incremento significativo en la absorción de glucosa en comparación con un control se considera activo.

Los resultados se muestran en la Figura 10.

Ejemplo 6 (para información, no de acuerdo con la invención)

80 hembras vírgenes Goto Kakizaki (GK) de 4-5 semanas de edad con un peso corporal cercano, se compraron de Charles River (Francia y EE. UU.), se enjaularon individualmente en una habitación con temperatura controlada (22 $\pm$ 1 °C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, y se mantuvieron con una dieta de roedores en crecimiento AIN-93G (Research diets, EE. UU., **Tabla 9**).

Después de una semana de aclimatación, las ratas GK se dividieron en 4 grupos (n = 20) después de una aleatorización en base al valor de glucosa AUC y al peso corporal, y recibieron su tratamiento correspondiente durante 10 semanas de la siguiente manera:

1. Grupo de control: Las ratas hembras GK comieron *ad libitum* una dieta AIN-93G + una gelatina de control (**Tabla 10**).

2. Grupo Mioinositol: Las ratas hembras GK comieron *ad libitum* una dieta AIN93-G suplementada con una dieta de mioinositol (1 g de mioinositol * por 100 g de dieta) + una gelatina de control (**Tabla 10**).

3. Grupo Probiótico: Las ratas hembras GK comieron *ad libitum* un AIN93-G + una gelatina que contiene 10⁹ ufc de LPR y 10⁹ ufc de B.lactis (**Tabla 10**).

4. Grupo de Mezcla: Las hembras GK comieron *ad libitum* una dieta AIN93G suplementada con una dieta de mioinositol (1 g de mioinositol por 100 g de dieta) + una gelatina que contiene 10⁹ ufc de LPR y 10⁹ ufc de B.lactis (**Tabla 10**).

***Kirsh Pharma**

A las 15 semanas de edad, las hembras se alojaron con machos Wistar (Charles Rivers, Francia) hasta que se observó un tapón vaginal, lo que indica el día 0,5 de gestación. Las ratas hembras permanecieron en su dieta experimental asignada durante la gestación. A los 16,5 días de gestación se realizó un OGTT 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.

Tabla 9 : Dieta de investigación AIN-93G

Producto # D10012G		gm%	Kcal%
Proteína		20	20,3
Carbohidrato		64	63,9
Grasa		7	15,8
	Total kcal/gm	3,9	
Ingrediente		gm	Kcal
Caseína, 30 Mesh		200	800

L-cistina		3	12
Almíndon de maíz		397	1.590
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 vitamina V10037		10	40
Bitartrato de colina		2,5	0
Total		1.000	4.000

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
Agua + TS (ml)	80,2	81,2
Total (ml)	99,96	99,96
*Premezcla que contiene 2,53 E+10 ufc/g de Lactobacillus rhamnosus (NCC4007) y 1,58E+10 ufc/g de Bifido Lactis (NCC2818),		

Mediciones y análisis

Mediciones fisiológicas y colecciones de muestras:

- Se realizó una prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) después de 6 horas de privación diaria (de 7.30 a 13.30 p. M.) en todos los animales a la edad de 5 semanas y a los 16,5 días de gestación. Durante la OGTT, se tomaron dos muestras de sangre basales de la vena de la cola, con un intervalo de muestreo de al menos 10 minutos (tiempo -10 y 0), seguido de una inyección oral de solución de glucosa (20 % p/v) a una dosis de 1,5 g/Kg de peso corporal. Después se recogieron más muestras de sangre de la incisión de la cola a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de glucosa. Todas las muestras de sangre se analizaron directamente para determinar el nivel de glucosa en sangre, mediante el uso de glucómetros Contour Next (Bayer AG, Zurich, Suiza).
- El peso corporal y la ingesta de alimentos de los animales se midieron 2 veces/semana durante todo el estudio.
- La composición corporal (grasa corporal, masa magra y contenido de agua corporal) se midió antes y después de 10 semanas de tratamiento mediante resonancia magnética nuclear (EchoMRI TM 2004, Echo Medical

Systems, Houston, EE. UU.). A partir de estos datos que se recopilaron, fue posible calcular el delta% de grasa y la relación de ganancia de grasa/ganancia de peso de la siguiente manera:

- El delta% de grasa: ($\%$ de grasa al final del tratamiento - $\%$ de grasa antes del inicio del tratamiento)
- Ganancia de grasa/ganancia de peso: ($\text{grasa (g) al final del período de tratamiento} - \text{grasa(g) antes del inicio del tratamiento}$) / ($\text{peso corporal (g) al final del período de tratamiento} - \text{peso corporal (g) antes del inicio del tratamiento}$)
- ganancia magra / ganancia de peso: ($\text{magra (g) al final del período de tratamiento} - \text{magra (g) antes del inicio del tratamiento}$) / ($\text{peso corporal (g) al final del período de tratamiento} - \text{peso corporal (g) antes del inicio del tratamiento}$)
- Ganancia de grasa: $\text{grasa (g) al final del período de tratamiento} - \text{grasa (g) antes del inicio del tratamiento}$
- ganancia magra: $\text{magra (g) al final del período de tratamiento} - \text{magra (g) antes del inicio del tratamiento}$
- $\%$ de masa grasa: $\text{masa grasa (g)} / \text{peso corporal} \times 100$
- $\%$ de masa magra: $\text{masa magra (g)} / \text{peso corporal} \times 100$

Sacrificio: las presas se decapitaron después de 6 horas de privación diaria (de 7.30 a 13.30 p. m.) y el órgano se recogió por disección, se pesó e inmediatamente se congeló en nitrógeno líquido. Se mantuvieron a -80°C hasta el análisis.

- Medición pancreática de insulina: El páncreas se pesó durante el sacrificio y se conservó en una solución de ácido-etanol-H₂O hasta la extracción de insulina. Para la determinación de la insulina pancreática, el páncreas se homogeneizó con un ácido-etanol (solución v/v: 75 % de etanol, 1,5 % de HCl al 37 % y 23,5 % de agua destilada) y se incubaron a -20°C durante la noche. El contenido de insulina en el sobrenadante se midió mediante un procedimiento ELISA mediante el uso de los kits de Crystal Chem. Inc (IL, EE. UU.).

Resultados: El valor medio para cada medición se muestra en la tabla 9. Los resultados para delta% de grasa, ganancia de grasa/ganancia de peso, μg de insulina del páncreas/ g de páncreas también pueden verse en las Figuras 11 a 14.

Tabla 11

	Control	Mioinositol	Probióticos	Mezcla (mioinositol + probióticos)
% masa grasa	19,5	18,7	19,3	18,1
% de masa magra	66,4	67,8	67,3	68,3
Delta% de grasa	8,8	7,7	8,4	6,8
Ganancia de grasa/ ganancia de peso	0,28	0,27	0,27	0,24
Ganancia magra/ ganancia de peso	0,57	0,58	0,58	0,60
% de ganancia de grasa	27,6	26,6	27,3	24,7
% de ganancia 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 del páncreas/ g de páncreas	101	101	98,5	110,3
Incremento de insulina AUC	2	5	-2	13
FGIR	3,44	3,42	3,24	4,21
HOMA1-IR	10,42	9,29	9,76	9,07

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende mioinositol y vitamina B2 para su uso en el tratamiento o la prevención de la diabetes mellitus gestacional y una afección asociada con la misma en un sujeto embarazado y/o su descendencia, en la que dicha composición se administra a dicho sujeto antes y/o durante el embarazo y/o durante la lactancia; en el que el sujeto es un mamífero que se selecciona del grupo que consiste en; un gato, un perro, un ser humano, y en la que dicha composición se administra preferentemente por vía entérica, con mayor preferencia por vía oral, y preferentemente es una composición nutricional en polvo, un producto alimenticio, una bebida, un suplemento nutricional tal como un suplemento nutricional en polvo o un nutraceutico.
2. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende además al menos una vitamina seleccionada de vitamina B6, vitamina B12, vitamina D y zinc y mezclas de estos y en la que dicha composición comprende preferentemente vitamina B2 en una cantidad de 0,14 a 14 mg por dosis diaria y mioinositol en una cantidad de 0,2 a 5 mg.
3. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la vitamina B6 si está presente está presente en una cantidad de 0,19 a 19 mg por dosis diaria, la vitamina B12 si está presente está presente en una cantidad de 0,26 a 26 µg por dosis diaria, la vitamina D si está presente está presente en una cantidad de 1,5 a 100 µg por dosis diaria, y el zinc si está presente está presente en una cantidad de 1,1 a 40 mg.
4. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha composición comprende además probióticos y en la que los probióticos comprenden preferentemente una combinación de Lactobacilos y Bifidobacteria y preferentemente en la que el Lactobacilo es la cepa de Lactobacillus rhamnosus GG disponible con el número de depósito CGMCC 1.3724 y la Bifidobacteria es la cepa de Bifidobacterium lactis BB12 depositada como CNCM 1-3446.
5. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende mioinositol, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina D, un Bifidobacterium lactis BB12 CNCMI-3446 y un Lactobacillus rhamnosus GG CGMCC 1.3724.
6. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** la composición se administrará a una mujer que desee quedar embarazada, a una mujer embarazada o a una mujer lactante, y preferentemente en la que dicha composición esté en forma de una composición nutricional en polvo para reconstituir en leche o agua, un producto alimenticio, una bebida, un suplemento nutricional o un nutraceutico.
7. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la afección asociada con la diabetes mellitus gestacional es el parto prematuro y la cesárea, la lesión al nacimiento de la madre o el bebé, la distocia de hombros, la macrosomía, una concentración excesiva de glucosa en sangre de la descendencia, el exceso de peso y/o adiposidad trastornos metabólicos asociados, por ejemplo, la diabetes tipo II, la enfermedad del hígado graso y la obesidad inmediatamente después del nacimiento y más adelante en la vida de la descendencia, y un mayor riesgo para la madre de tener o desarrollar diabetes tipo II inmediatamente después del nacimiento o más adelante en la vida.
8. Un kit de partes que comprende al menos dos composiciones separadas físicamente, comprendiendo cada una al menos uno de los ingredientes mencionados en la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento o la prevención de la diabetes mellitus gestacional y una afección asociada a la misma en un sujeto embarazado y/o su descendencia, en la que dicha composición se administra a dicho sujeto antes y/o durante el embarazo y/o durante la lactancia; en el que el sujeto es un mamífero seleccionado del grupo que consiste en: un gato, un perro, un ser humano, **caracterizado porque** al menos una de las composiciones separadas físicamente comprende mioinositol y al menos una de las composiciones separadas físicamente comprende vitamina B2.

Figura 1

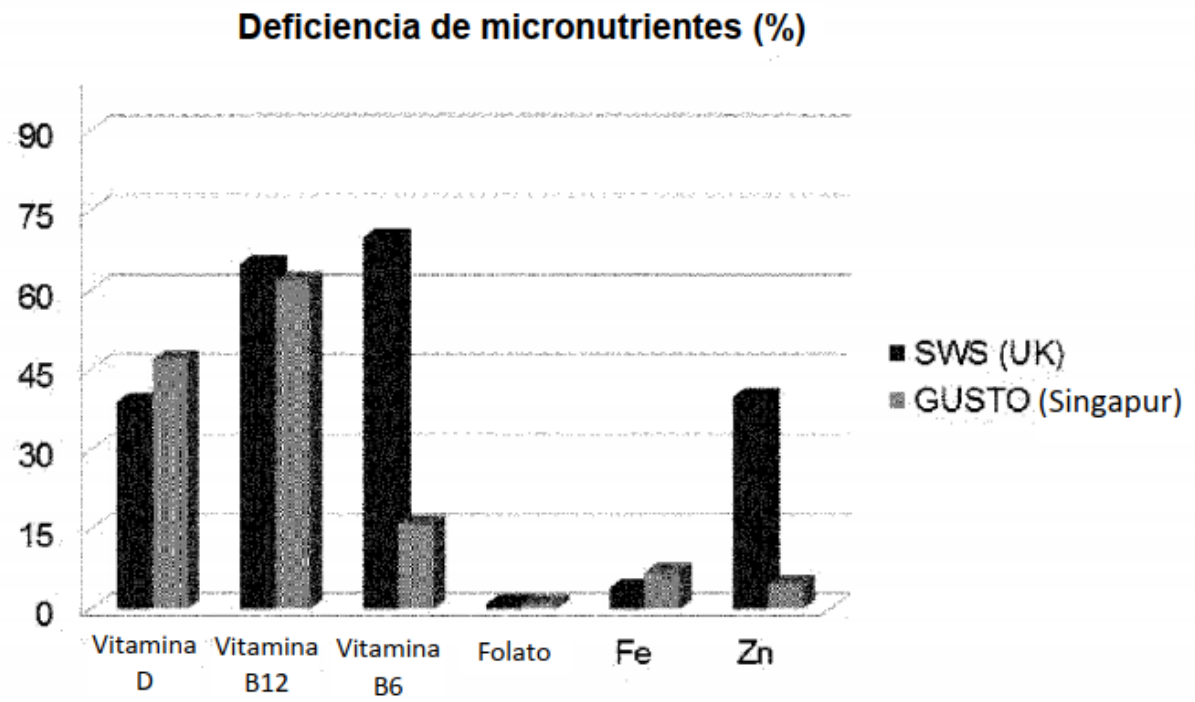
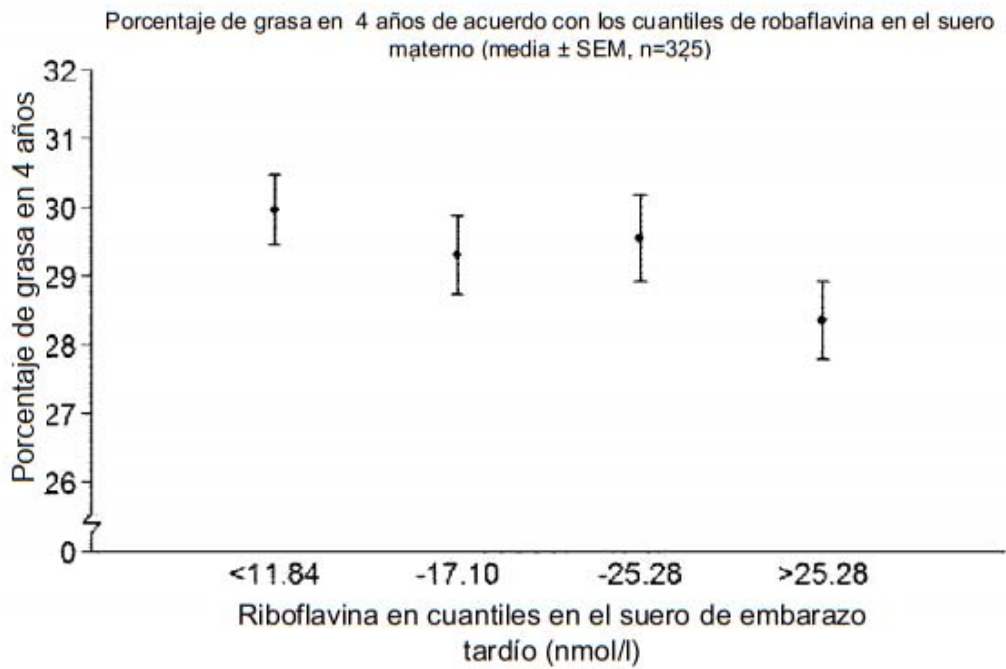
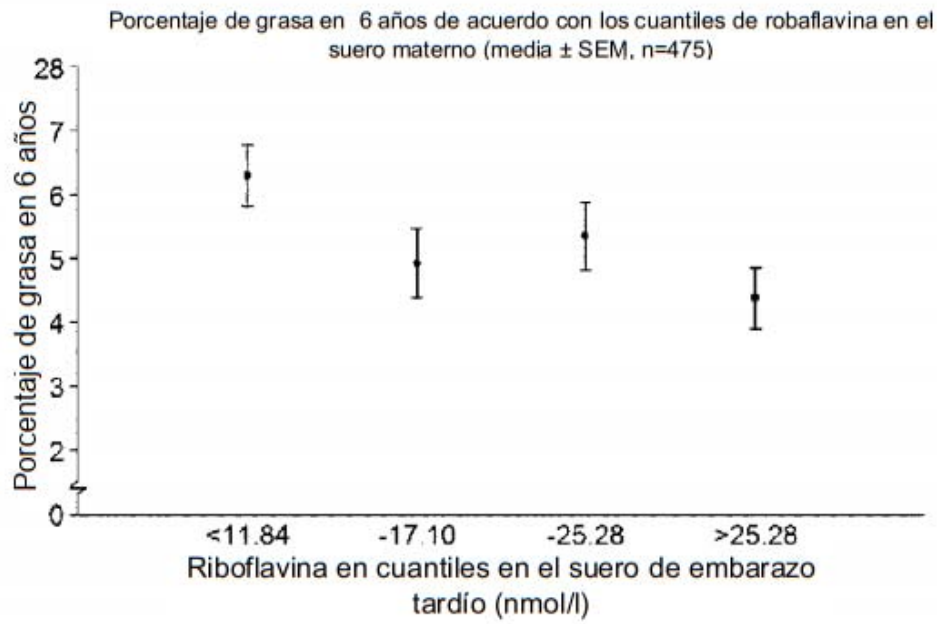


Figura 2

A)



B)

Figura 3

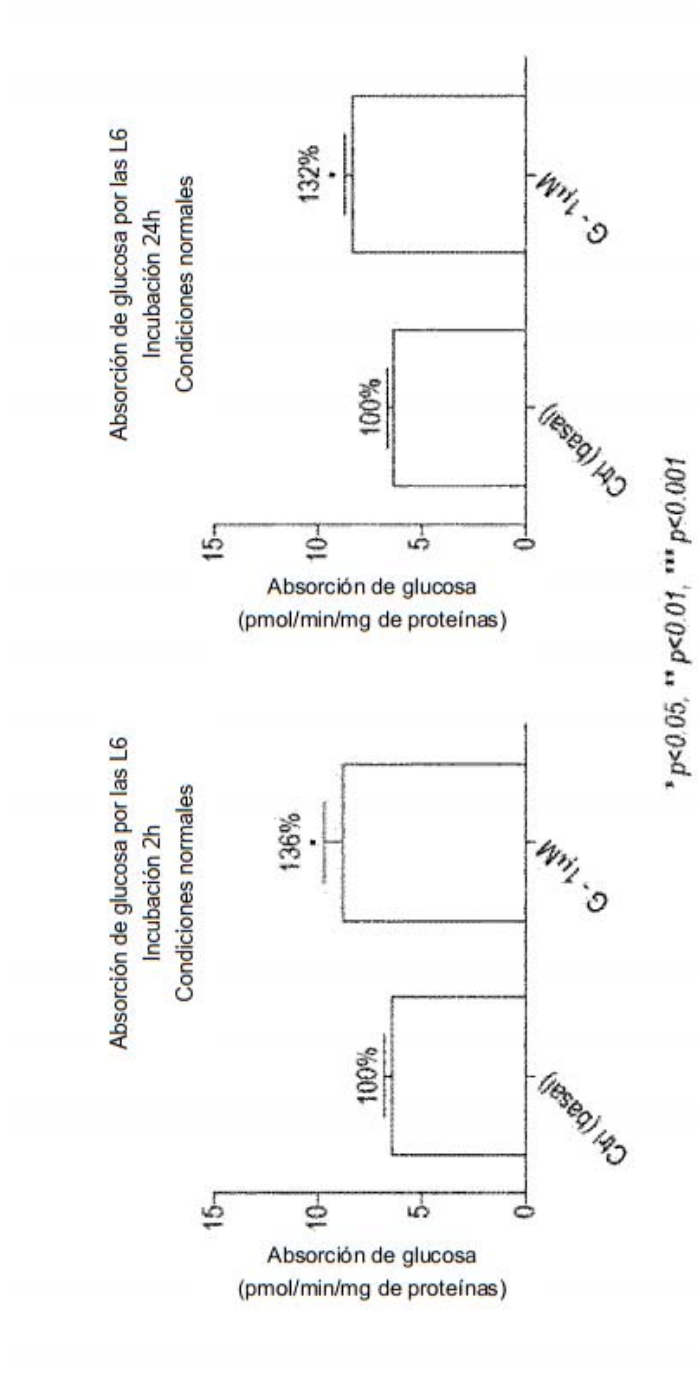


Figura 4

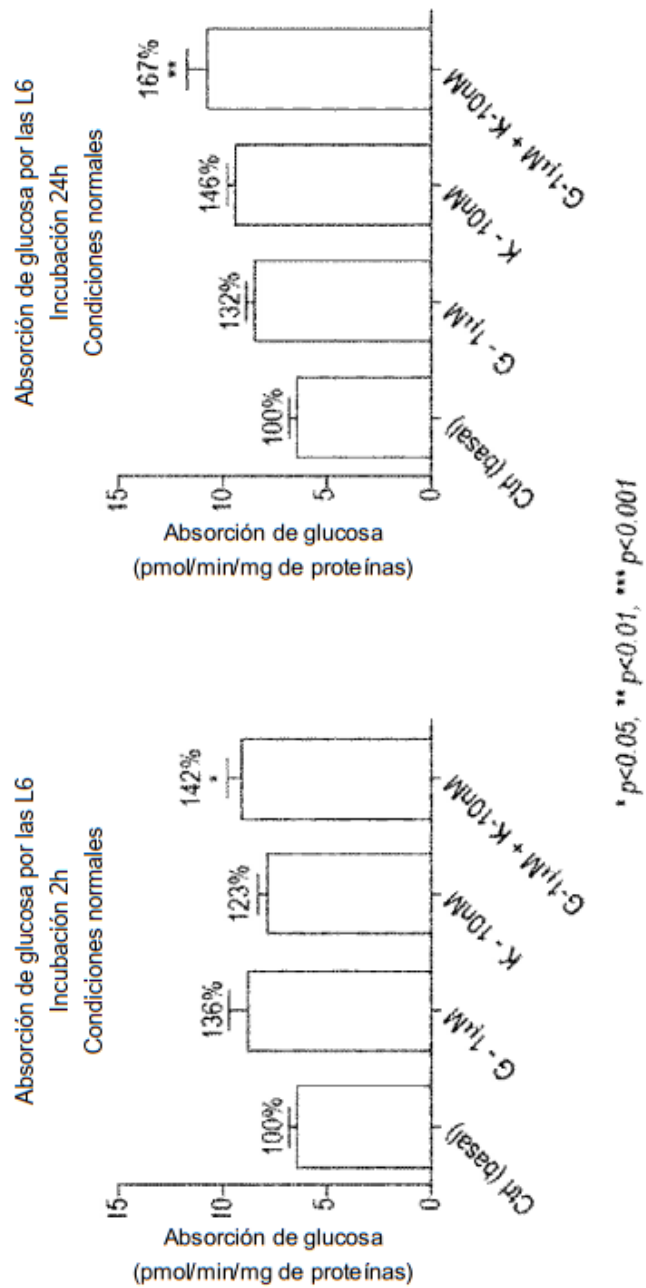


Figura 5

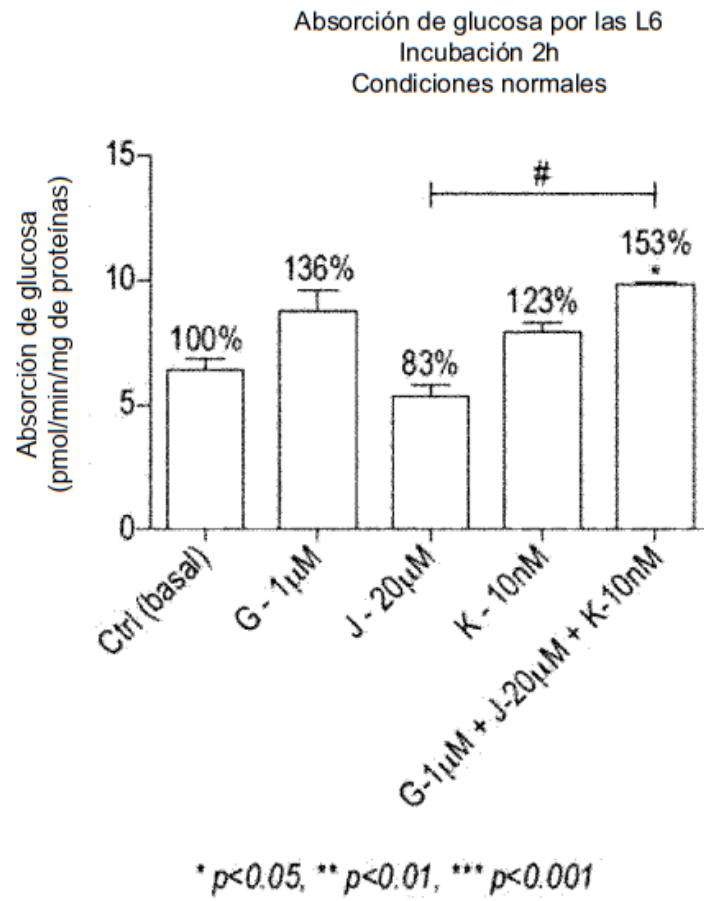


Figura 6

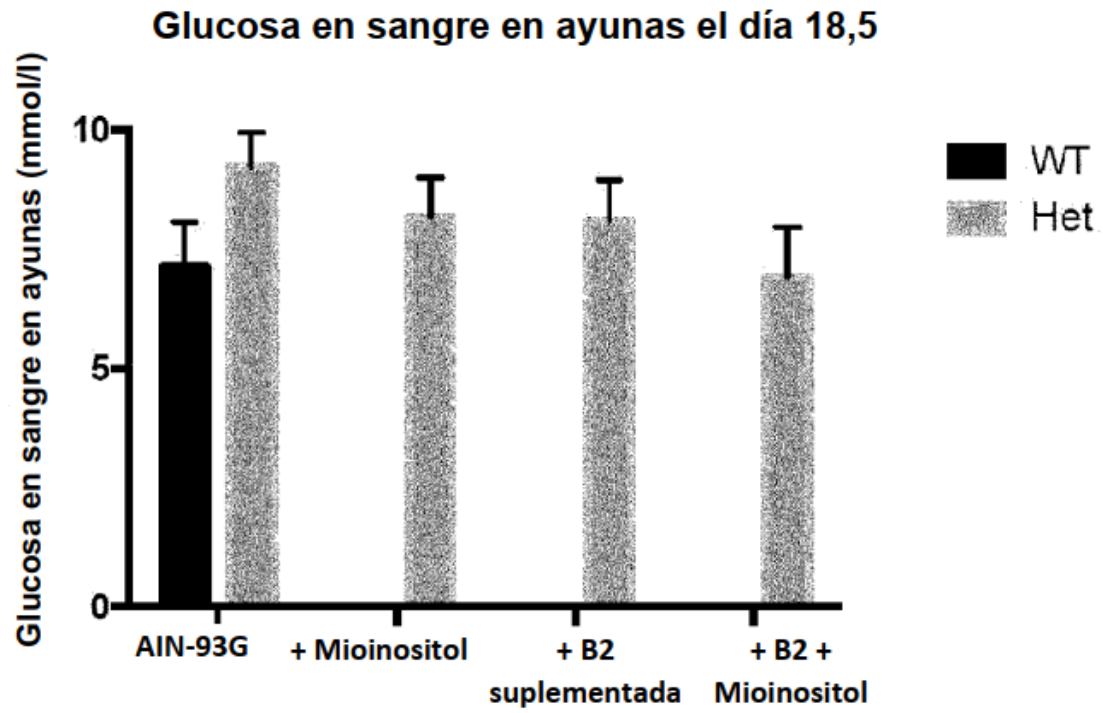


Figura 7

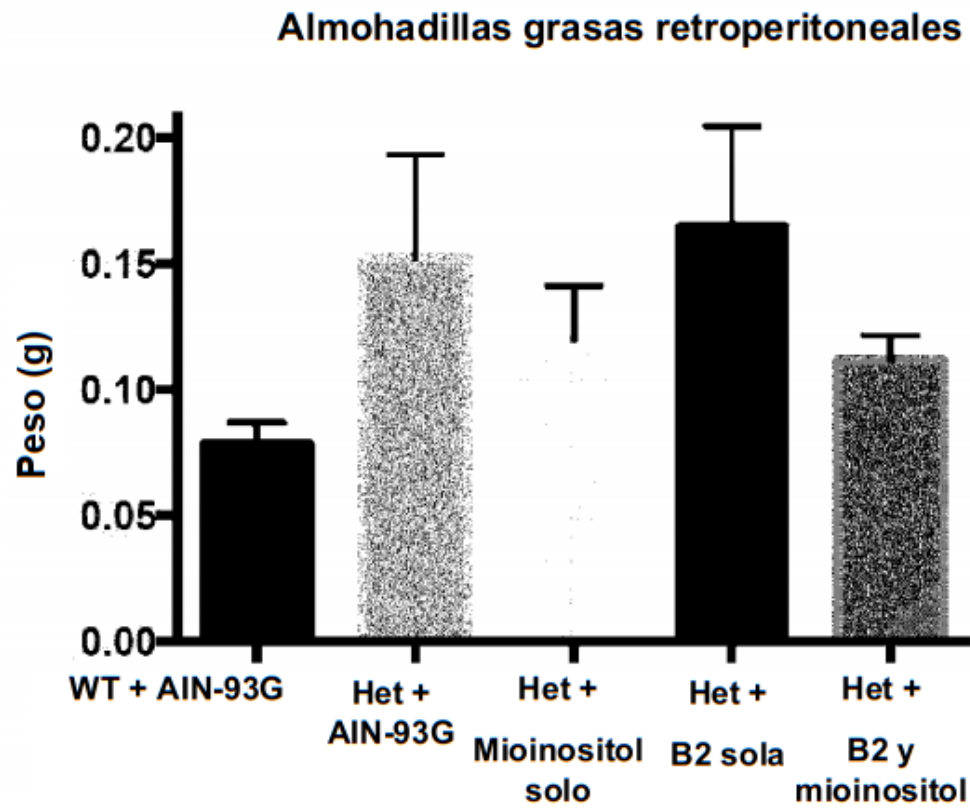


Figura 8

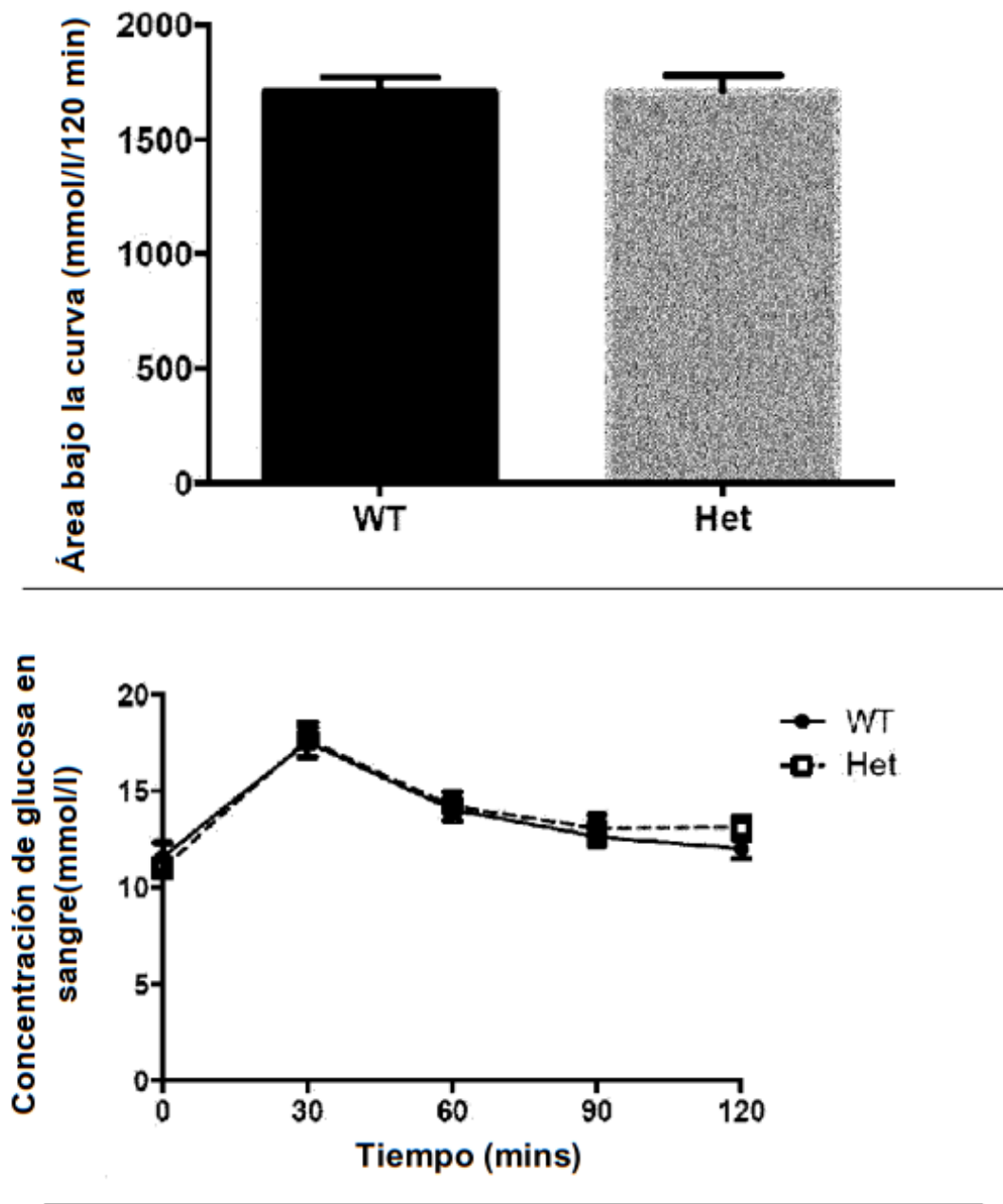


Figura 9

