

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 868**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/06** (2006.01) **A61K 33/30** (2006.01)  
**A61P 15/08** (2006.01) **A61K 31/4415** (2006.01)  
**A23L 1/302** (2006.01)  
**A23L 1/305** (2006.01)  
**A61K 31/07** (2006.01)  
**A61K 31/122** (2006.01)  
**A61K 31/198** (2006.01)  
**A61K 31/205** (2006.01)  
**A61K 31/355** (2006.01)  
**A61K 31/375** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2008 E 12172324 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 2502635**

54 Título: **Formulaciones combinadas para el tratamiento de la esterilidad masculina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.01.2014**

73 Titular/es:

**FASANI, ROBERTO (100.0%)**  
**Via G. Quarenghi 42/C**  
**24100 Bergamo, IT**

72 Inventor/es:

**FASANI, ROBERTO**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 439 868 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

Formulaciones combinadas para el tratamiento de la esterilidad masculina

La presente invención hace referencia a una formulación compuesta por dos formulaciones diferentes para ser administradas por separado, una que contiene arginina, vitamina A, vitamina E, vitamina B6, vitamina B9 (concretamente ácido fólico), vitamina B12 y coenzima Q10 y la otra que contiene carnitina, arginina, vitamina C y cinc, para tratar la esterilidad masculina.

La mala calidad del esperma no ligada a causas comprobables, la denominada oligoastenoteratozoospermia idiopática (el síndrome de OAT), es responsable del 40-75% de los casos de esterilidad masculina. Hasta la fecha, se han propuesto diversos tratamientos farmacológicos para el síndrome de OAT. Sin embargo, a fecha de hoy una evaluación rigurosa de los estudios disponible en la bibliografía ha conducido recientemente a los autores de "EAU Guidelines on Infertility – 2007" a la conclusión de que los tratamientos actualmente conocidos no satisfacen las necesidades terapéuticas de dicha patología.

Por ejemplo, a decir verdad, los estudios llevados a cabo con GnRH muestran resultados contradictorios mientras que los llevados a cabo con FSH se probaron ineficaces. Además, los fármacos activadores del sistema de "cininógeno-cinina" no se han probado eficaces todavía, mientras que los bloqueantes de mastocitos y antiestrógenos muestran una muy baja eficacia.

Por último, la combinación de hCG/hMG, andrógenos, bromocriptinas y bloqueantes  $\alpha$  no se consideran recomendables más que en casos de hipogonadismo, porque causan reacciones adversas.

Además, durante los últimos años varios estudios han mostrado la importancia de las EOR (especies de oxígeno reactivo) en la patofisiología de la reproducción: a decir verdad, se ha mostrado cómo el estrés oxidativo combinado con altos niveles de EOR en el fluido seminal (y en particular, pero no únicamente, durante estados inflamatorios que conducen a un gran número de leucocitos) causa una reducción de la motilidad de los espermatozoides y del daño al ADN celular (Agarwal *et al.*, 2006; Agarwal *et al.*, 2002).

Los espermatozoides son muy sensibles a las EOR dado que su membrana celular contiene ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) que se someten fácilmente a un proceso de peroxidación (Fraczek *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2005). Por tanto, el daño celular aparecería cuando la producción de EOR supere la actividad de los mecanismos antioxidantes habitualmente presentes en el plasma seminal (Sheweita *et al.*, 2005).

Se han llevado a cabo diversos estudios durante los últimos años respecto a diversos compuestos con acción antioxidante y adyuvante de la espermatogénesis en sujetos estériles que permiten extraer conclusiones importantes respecto de los antioxidantes:

- selenio y vitamina E, solos o combinados, producen una reducción de los mecanismos oxidativos y una mejora de la motilidad de los espermatozoides (Keskes-Ammar *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 1998);
- la vitamina C es capaz de mejorar el recuento, la motilidad y la morfología de los espermatozoides (Akmal *et al.*, 2006);
- la combinación de vitamina C y E conduce a una reducción del daño al ADN (Greco *et al.*, 2005);
- la combinación de L-carnitina y acetil-L-carnitina se probó eficaz para mejorar la motilidad progresiva de los espermatozoides al aumentar la capacidad antioxidante total del plasma seminal y aumentar los índices de embarazo en machos con el síndrome de OAT (Li *et al.*, 2005; Balercia *et al.*, 2005; Lenzi *et al.*, 2004), aunque a menudo se niega un efecto clínica o sustancialmente relevante sobre la motilidad o el recuento espermático total de espermatozoides móviles en machos aquejados por astenospermia idiopática (Sigman *et al.*, 2006);

y, respecto de otros compuestos con acción adyuvante:

- ácido fólico y sulfato de cinc, separadamente, conducen a una mejora sustancial del recuento de espermatozoides en sujetos subfértiles y fértiles (Ebisch *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2002);
- la adición *in vitro* de L-arginina y poliaminas a espermatozoides obtenidos de machos con astenospermia se probó beneficiosa para la motilidad espermática (Morales *et al.*, 2003);
- la vitamina B12 a altas dosis y con un tratamiento a largo plazo (16 semanas) es de gran uso en paciente aquejados de oligozoospermia (Moriyama *et al.*, 1987);
- el tratamiento de sujetos aquejados por diversos grados de oligoastenospermia con arginina abrió importantes perspectivas respecto a la capacidad fertilizante de esta última (Aydin *et al.*, 1995);
- los niveles de coenzima Q10 en el plasma seminal estaban correlacionados con el recuento y la motilidad espermáticos (Mancini *et al.*, 1994).

5 Es un objeto de la presente invención una formulación constituida por dos formulaciones diferentes para ser administradas por separado, una que contiene arginina, vitamina A, vitamina E, vitamina A, vitamina B6, vitamina B9 (concretamente ácido fólico), vitamina B12, coenzima Q10 y la otra que contiene carnitina, arginina, vitamina C y zinc. A decir verdad, dicha formulación se probó útil para el tratamiento de esterilidad masculina, en particular para el tratamiento de oligoastenoteratozoospenia (síndrome de OAT).

10 Preferiblemente, la primera formulación anteriormente mencionada contiene de 300 a 500 partes en peso de arginina, de 350 a 550 partes en peso de vitamina A, de 1 a 3 partes en peso de vitamina B6, de 0,0005 a 0,002 partes en peso de vitamina B12, de 0,1 a 0,3 partes en peso de vitamina B9, de 10 a 30 partes en peso de coenzima Q10 y de 0,07 a 0,009 partes en peso de selenio, mientras que dicha segunda formulación contiene de 100 a 300 partes en peso de carnitina, de 100 a 300 partes en peso de arginina, de 0,05 a 0,15 partes en peso de vitamina C y de 10 a 20 partes en peso de cinc.

15 Más preferiblemente, dicha primera formulación contiene 400 mg de arginina, 450 mg de vitamina A, 30 mg de vitamina E, 2 mg de vitamina B6, 0,001 mg de vitamina B12, 0,2 mg de vitamina B9, 20 mg de coenzima Q10, 0,0825 mg de selenio y dicha segunda formulación contiene 200 mg de carnitina, 200 mg de arginina, 100 mg de vitamina C y 15,2 mg de cinc.

Además, la formulación de la presente invención puede contener adicionalmente excipientes y/o adyuvantes comunes tales como, por ejemplo, agentes de carga, antiaglomerantes, de unión y/o colorantes. En particular, la formulación de la presente invención comprende celulosa microcristalina como agente de carga, estearato de magnesio y/o dióxido de silicio como agentes antiaglomerantes y clorofila y/o cúrcuma como agentes colorantes.

20 Las dos formulaciones anteriormente mencionadas se administran separadas entre sí a intervalos temporales en el intervalo de 8 a 14 horas, preferiblemente en el intervalo de 10 a 12 horas.

En particular, dicha primera formulación se administra por la mañana, preferiblemente antes del desayuno, mientras que la segunda formulación se administra por la noche, después de la cena.

25 Dichas formulaciones se administran durante un periodo de tiempo en el intervalo de 4 a 8 meses, preferiblemente durante 6 meses.

Según una puesta en práctica adicional de la invención, la formulación anteriormente mencionada es una formulación combinada para administración simultánea, separada o secuencial, capaz de mejorar sustancialmente la calidad del espermatozoides de pacientes aquejados por el síndrome de OAT.

30 Las formulaciones según la presente invención están preferiblemente indicadas para administración oral, más preferiblemente en forma de un comprimido, cápsula o gránulo.

Es un objeto adicional de la presente invención el uso de dos formulaciones diferentes que pueden administrarse separadamente, conteniendo la primera arginina, vitamina A, vitamina E, vitamina B6, vitamina B9 (concretamente ácido fólico), vitamina B12 y coenzima Q10 y conteniendo la segunda carnitina, arginina, vitamina C y cinc, para tratar la esterilidad masculina, en particular para tratar la oligoastenoteratozoospermia idiopática (síndrome de OAT).

35 En particular, se administran las dos formulaciones anteriormente mencionadas separadas entre sí en un intervalo temporal en el intervalo de 8 a 14 horas, preferiblemente en el intervalo de 10 a 12 horas.

En particular, dicha primera formulación se administra por la mañana, preferiblemente antes del desayuno, mientras que dicha segunda formulación se administra por la noche, preferiblemente después de la cena.

40 Dichas formulaciones se administran durante un periodo de tiempo en el intervalo de 4 a 8 meses, preferiblemente durante 6 meses.

## EJEMPLOS

### Ejemplo I

Composición en forma de comprimido para tomar cada mañana antes del desayuno

	arginina	400 mg
45	vitamina A	450 mg
	vitamina E	30 mg
	vitamina B6	2 mg
	vitamina B12	0,0011 mg
	vitamina B9 (ácido fólico)	0,2 mg

	coenzima Q10	20 mg
	selenio	0,0825 mg
	celulosa microcristalina	135,52 mg
	estearato de magnesio	15 mg
5	dióxido de silicio	8 mg
	cúrcuma	5 mg

Ejemplo 2:

Composición en forma de comprimido para tomar cada noche después de la cena

	camitina	200 mg
10	arginina	200 mg
	vitamina C	100 mg
	cinc	15,2 mg
	celulosa microcristalina	106 mg
	estearato de magnesio	20 mg
15	dióxido de silicio	10 mg
	clorofila	2 mg

**PARTE EXPERIMENTAL**

Se inscribieron diversas parejas estériles y se sometieron a las siguientes pruebas preliminares

- 20
- dos pruebas de esperma, llevadas a cabo en el mismo laboratorio separadas entre sí a intervalos de aproximadamente 2,5 meses, con un periodo de abstinencia sexual de 4-5 días previo y una recogida completa de la eyaculación completada por expresión uretral desde el perineo hasta el meato, durante un periodo de buena salud del sujeto durante al menos los dos meses anteriores. Se examinó cada muestra de esperma, calculando los siguientes parámetros según los estándares de la OMS-1999: volumen de eyaculación (ml), concentración de espermatozoides/mm<sup>3</sup>, motilidad total (%) a 45, 120 y 180 segundos (repartida respectivamente en: progresiva rápida (%), progresiva lenta (%), local (%), ausente (%)), morfología normal (%);
- 25
- se calculó el índice espermático (IS) de cada muestra de esperma, con el objetivo de facilitar la investigación estadística, según la siguiente fórmula:

$$IS = \frac{V \times C \times (mot\ a + \sqrt{mot\ b}) \times N}{10^{10}}$$

- 30
- en la que "V" es el volumen de eyaculación (ml), "C" es la concentración de espermatozoides/ml, "mot a" es la motilidad progresiva rápida (%), "mot b" es la motilidad progresiva lenta (%), "N" son las formas normales (%). Brevemente, el IS intenta representar en un solo valor numérico el recuento total de espermatozoides bien móviles y de forma normal en una eyaculación. Por ejemplo, una eyaculación que tiene cada parámetro en su valor mínimo de normalidad según la OMS-1999. V= 2 ml; C= 20.000.000 espermatozoides/ml; mot a= 25%; mot b= 25%; formas normales= 15%, tiene un IS= 1,8, sin embargo, un esperma verdaderamente normal tiene un IS ≥ 5,0.
- 35

- Además, se efectuaron las siguientes pruebas adicionales en cada muestra de semen:

a) una prueba de azul de anilina para evaluar la condensación y madurez de la cromatina espermática (v.n.: < 50%) (Terquem & Dadoune, 1983);

- 40
- b) la prueba de naranja de acridina, que calcula el daño a las hélices de ADN de los espermatozoides (v.n.: < 30%) (Tejada *et al.*, 1984);

c) la prueba de hinchamiento, que identifica los espermatozoides funcionalmente anormales, es decir, aquellos con una capacidad fertilizante menor, así como una mayor tasa de fallo de implantación del esperma (v.n.: > 60%) (Check, 2006);

d) la prueba ARIC, que evalúa la capacidad de los espermatozoides de penetrar en los ovocitos (v.n.: > 14%) (Cummins *et al.*, 1991).

- 5 – Ecografía Doppler escrotal en color; para identificar patologías significativas de la pulpa testicular, lesiones del epidídimo potencialmente sospechosas de obstrucciones y la presencia de reflujos venosos continuos en ortostatismo a lo largo de las venas espermáticas internas.
- Ultrasonografía transrectal; para identificar patologías significativas de la próstata tales como hiperplasia prostática benigna o lesiones sospechosas de cáncer y signos sospechosos de (sub)obstrucciones y/o calculosis de los conductos eyaculatorios y problemas relacionados con el vaciado ampolovesicular.
- Cariotipo

10 Además, se efectuaron las siguientes pruebas:

- Citología y prueba de cultivo de la secreción de masaje prostático (Colpi *et al.*, 1982) después de 7 días de abstinencia, solo con respecto a pacientes cuyos datos anamnésticos u objetivos o cuyos datos de ultrasonografía transrectal mostraran o levantaran sospechas respecto a una patología inflamatoria/infecciosa de la próstata.
- 15 – FSH plasmática, LH, testosterona, prolactina, estradiol solo para pacientes con una concentración de espermatozoides menor de 20.000 espermatozoides/mm<sup>3</sup>.
- Búsqueda de microdeleciones de Yq, solo en pacientes con una concentración de espermatozoides menor de 5.000 espermatozoides/mm<sup>3</sup>.

Se consideraron como criterios de inclusión en el presente estudio:

- 20 – IS < 5;
- ausencia de patologías significativas según la ecografía Doppler escrotal en color (véase anteriormente);
- ausencia de patologías significativas según la ultrasonografía transrectal (véase anteriormente);
- un cariotipo normal y una búsqueda negativa de microdeleciones de Yq, en casos en que se requiera dicha prueba (véase anteriormente);
- 25 – una prueba de citología negativa de la secreción prostática, o una prueba de citología positiva (pero con una prueba de cultivo negativa) después de 2 semanas desde el final de una terapia de antibióticos que haya durado al menos 30 días;
- testosterona, prolactina y estradiol normales, en casos en que se requieran dichas pruebas (véase anteriormente);
- 30 – FSH no por debajo del intervalo normal, en casos en que se requiera su comportamiento (véase anteriormente), porque un valor bajo habría creado razones para terapia hormonal.

Se inscribieron en conjunto 40 pacientes aleatorizados, a los que se administró la composición del ejemplo 1 cada mañana y se administró la composición del ejemplo 2 cada noche durante un periodo de 6 meses.

35 Al final del tratamiento, se invitó a todos los pacientes a someterse a una nueva prueba de esperma, según los procedimientos resumidos anteriormente.

## RESULTADOS

El tratamiento fue bien tolerado y no se observaron síntomas ligados a la terapia en ninguno de los pacientes.

El volumen de esperma aumentó considerablemente desde 4,07 ± 1,83 ml (X±DE) antes del tratamiento a 4,55 ± 1,86 ml después del tratamiento (p < 0,001).

40 La concentración de espermatozoides aumentó de manera muy significativa desde 26525 ± 25251 mm<sup>3</sup> (X±DE) antes del tratamiento a 34200 ± 28254 después del tratamiento (p < 0,0001).

La motilidad espermática total aumentó desde 47,40 ± 9,125% (X±DE) antes del tratamiento a 51,08 ± 11,711% después del tratamiento a los 45 s (p = 0,011), desde 44,10 ± 9,092% a 47,28 ± 10,238% a los 120 s (p = 0,018) y desde 39,95 ± 9,546% a 44,90 ± 11,600% a los 180 s (p = 0,003) (prueba de Wilcoxon).

45 Los espermatozoides con morfología normal aumentaron significativamente desde 8,18 ± 4,454% (X±DE) antes del tratamiento a 10,15 ± 4,828% después del tratamiento (p = 0,001) (prueba de Wilcoxon).

El índice espermático mejoró significativamente, pasando de  $0,820 \pm 1,015$  ( $X \pm DE$ ) antes del tratamiento a  $1,52 \pm 1,760$  después del tratamiento ( $p < 0,001$ ) (prueba bilateral).

5 Los espermatozoides con pruebas de hinchamiento positivas (en los 38 pacientes ensayados) no variaron significativamente, desde  $66,18 \pm 11,392\%$  ( $X \pm DE$ ) antes del tratamiento a  $67,11 \pm 12,944\%$  después del tratamiento ( $p = 0,34$ ).

Los espermatozoides con prueba de ARIC positiva (en los 34 pacientes ensayados) aumentaron de manera muy significativa desde  $7,71 \pm 3,928\%$  ( $X \pm DE$ ) antes del tratamiento a  $10,15 \pm 4,279\%$  después del tratamiento ( $p < 0,001$ ).

10 Los espermatozoides con anomalías en la maduración de cromatina detectadas por la prueba de azul de anilina (en los 39 pacientes ensayados) no variaron significativamente, pasando de  $48,51 \pm 15,841\%$  ( $X \pm DE$ ) antes del tratamiento a  $45,72 \pm 15,970\%$  después del tratamiento ( $p = 0,113$ ).

Los espermatozoides con anomalías del ADN detectadas por la prueba de naranja de acridina (en los 36 pacientes ensayados) cayeron significativamente desde  $31,03 \pm 13,185\%$  ( $X \pm DE$ ) antes del tratamiento a  $25,36 \pm 14,137$  después del tratamiento ( $p = 0,013$ ).

15 La formulación según la presente invención era por lo tanto eficaz para mejorar significativamente todos los parámetros individuales evaluados en una prueba de esperma estándar, incluyendo también el índice espermático, que tiene la ventaja de resumir el recuento total de espermatozoides bien móviles y de forma normal presentes en una eyaculación en un solo valor numérico.

20 Es particularmente importante la mejora significativa inducida por la terapia sobre el porcentaje de espermatozoides patológicos según la prueba de naranja de acridina, especialmente hoy en día, en que la integridad del ADN del esperma está en alta consideración, con el objetivo de obtener un embarazo a término, tanto espontáneo como resultado de técnicas de reproducción asistida.

25 Es igualmente relevante la mejora significativa del porcentaje de espermatozoides positivos a la prueba de ARIC, signo de una capacidad mejorada del esperma de fertilizar un ovocito, siendo dichos datos significativos tanto cuando se intenta una fertilización espontánea como cuando se busca una indicación correcta para usar inseminación intrauterina.

30 En conclusión, en el campo de la terapia de la esterilidad masculina, que hoy en día muestra un uso casi sistemático de las técnicas de reproducción asistida y específicamente de ICSI, parece bastante interesante poder obtener mejoras significativas del esperma usando, en pacientes aquejados de una oligoastenoteratozoospermia idiopática real (porque se seleccionan bien preliminarmente dependiendo de los posibles factores causales de su dispermia), una terapia con vitaminas y minerales, siendo dicha terapia sencilla y segura, porque está sustancialmente exenta de contraindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Formulaci3n constituida por dos formulaciones diferentes para ser administradas por separado, conteniendo la primera arginina, vitamina A, vitamina E, vitamina B6, vitamina B9, vitamina B12 y coenzima Q10 y conteniendo la segunda carnitina, arginina, vitamina C y cinc, para su uso en el tratamiento de la esterilidad masculina.
- 5 2. Formulaci3n para su uso seg3n la reivindicaci3n 1, en la que dicha primera formulaci3n contiene de 300 a 500 partes en peso de arginina, de 350 a 550 partes en peso de vitamina A, de 1 a 3 partes en peso de vitamina B6, de 0,0005 a 0,002 partes en peso de vitamina B12, de 0,1 a 0,3 partes en peso de vitamina B9, de 10 a 30 partes en peso de coenzima Q10 y de 0,07 a 0,09 partes en peso de selenio, y dicha segunda formulaci3n contiene de 100 a 10 300 partes en peso de carnitina, de 100 a 300 partes en peso de arginina, de 0,05 a 0,15 partes en peso de vitamina C y de 10 a 20 partes en peso de cinc.
- 15 3. Formulaci3n para su uso seg3n las reivindicaciones 1 y 2, en la que dicha primera formulaci3n contiene aproximadamente 400 mg de arginina, aproximadamente 450 mg de vitamina A, aproximadamente 30 mg de vitamina E, aproximadamente 2 mg de vitamina B6, aproximadamente 0,001 mg de vitamina B12, aproximadamente 0,2 mg de vitamina B9, aproximadamente 20 mg de coenzima Q10 y aproximadamente 0,0825 mg de selenio, y dicha segunda formulaci3n contiene aproximadamente 200 mg de carnitina, aproximadamente 200 mg de arginina, aproximadamente 100 mg de vitamina C y aproximadamente 15,2 mg de cinc.
4. Formulaci3n para su uso seg3n cualquiera de las reivindicaciones precedentes que contiene adicionalmente excipientes y/o adyuvantes.
- 20 5. Formulaci3n para su uso seg3n cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichas formulaciones est3n indicadas para administraci3n oral.
6. Formulaci3n para su uso seg3n cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichas formulaciones est3n en forma de un comprimido, c3psula o gr3nulo.
7. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, para su uso en el tratamiento de oligoastenoteratozoospermia idiop3tica.
- 25 8. Formulaci3n para su uso seg3n cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichas formulaciones se administran en un intervalo temporal en el intervalo de 8 a 14 horas.
9. Formulaci3n para su uso seg3n la reivindicaci3n 8, en la que dichas formulaciones se administran en un intervalo temporal en el intervalo de 10 a 12 horas.
- 30 10. Formulaci3n para su uso seg3n cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha primera formulaci3n se administra por la ma1ana y dicha segunda formulaci3n se administra por la noche.
11. Formulaci3n para su uso seg3n cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha primera formulaci3n se administra antes del desayuno y dicha segunda formulaci3n se administra despu3s de la cena.
12. Formulaci3n para su uso seg3n cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la administraci3n tiene lugar durante un periodo de tiempo en el intervalo de 4 a 8 meses.
- 35 13. Formulaci3n para su uso seg3n la reivindicaci3n 12, en la que la administraci3n tiene lugar durante un periodo de tiempo de 6 meses.