(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 555 387**

(51) Int. CI.:

A61K 31/198 (2006.01)
A61P 15/08 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2010 E 10736818 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2432463**

(54) Título: **Uso de una combinación de ácidos D-aspártico y L-aspártico o sus sales para el tratamiento de la esterilidad masculina**

(30) Prioridad:

19.05.2009 IT RM20090253

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.12.2015

(73) Titular/es:

MERCK SERONO S.P.A. (100.0%)
Via Casilina 125
00176 Roma, IT

(72) Inventor/es:

D'ANIELLO, SALVATORE y
D'ANIELLO, ENRICO

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

Uso de una combinación de ácidos D-aspártico y L-aspártico o sus sales para el tratamiento de la esterilidad masculina

La presente invención se refiere al uso de una combinación de ácidos D-aspártico y L-aspártico o una de sus sales para el tratamiento de la esterilidad masculina. En particular, la invención se refiere al uso de una mezcla que consiste en una mezcla de ácidos D-aspártico y L-aspártico o una de sus sales, preferiblemente al menos en relación 1:1 con el fin de estimular la actividad procreadora del hombre mediante un aumento del número de espermatozoides y su movilidad.

La esterilidad masculina puede ser producida por trastornos relacionados con la producción de espermatozoides, la emisión o la funcionalidad y representa aproximadamente el 35% de las causas de esterilidad de la pareja. Puede ser producida por posibles infecciones genitourinarias ocurridas en el pasado o en el presente; enfermedades como la varicela, el sarampión o la parotiditis, enfermedad vírica que en los hombres puede provocar orquitis (infección testicular); enfermedades de transmisión sexual; intervenciones quirúrgicas en el pasado o traumatismos a nivel genital. Por otra parte, el estilo de vida, como el consumo de alcohol, fumar, las drogas y los trabajos peligrosos y los factores ambientales pueden desempeñar una función importante. El varicocele puede dar lugar a deficiencia activa de generación de espermatozoides. Además cantidades alteradas de FSH (folitropina), LH (luteotropina), PRL (prolactina) y T (testosterona) puede afectar el proceso de producción de espermatozoides.

Los tratamientos utilizados actualmente para la esterilidad masculina implican el uso de fármacos inyectados o administrados por vía oral. Entre los fármacos inyectados, se utiliza Menotropina, principio activo en viales de Menogon, que comprende una preparación de gonadotropinas (FSH y LH, en cantidades iguales) extraídas de la orina de mujeres posmenopáusicas, denominada por lo tanto hormona humana de la menopausia (HMG). HMG actúa directamente en los ovarios y los testículos, estimulando el proceso de la ovulación, la espermatogenia y la esteroidogenia. Dentro de los testículos, la FSH está esencialmente implicada en la estimulación de la maduración de las células de Sertoli y afecta, además, a la maduración de los túbulos seminíferos y al desarrollo de los espermatozoides. Dado que en los testículos es necesaria una alta concentración de andrógenos, ésta puede obtenerse con un pretratamiento con HCG o según el esquema terapéutico que implica la combinación con 5000 UI de HCG a la semana durante 3 meses. Sin embargo, este tratamiento presenta algunos inconvenientes, por ejemplo HCG no es eficaz si se administra por vía oral y debe administrarse por vía intramuscular. En algunos casos puede tener lugar la formación de anticuerpos anti-HCG como resultado de una administración repetida cíclica del producto, dando como resultado un tratamiento ineficaz. Un inconveniente adicional de este tratamiento es el alto coste, ya la mayoría de los esquemas de tratamiento utilizados conlleva la administración intramuscular tres veces a la semana durante un ciclo de tres meses y baja observancia del paciente debido a las administraciones semanales intramusculares repetidas.

Una terapia alternativa conlleva el tratamiento con (GnRH) hormona liberadora de gonadotropina. Esta terapia conlleva una administración pulsada usando bomba portátil (por vía intravenosa o subcutánea) a intervalos de 90-120 minutos. Aunque dicho tratamiento restablece las concentraciones de testosterona y gonadotropinas en tres meses y estimula la espermatogenia, por otro lado, implica que el paciente debe lleva una bomba portátil equipada con catéter urinario y esto puede ser incómodo para estos pacientes.

En cuanto a los tratamientos orales, los mismos pueden comprender antiestrógenos. Estos compuestos (citrato de clomifeno y tamoxifeno) se han utilizado ampliamente para el tratamiento de la esterilidad masculina, en ausencia de patologías endocrinas. Los antiestrógenos mantienen capacidad para unir a los receptores de estrógeno competitivamente, tanto en el hipotálamo como en la periferia, lo que provoca un aumento de las concentraciones de gonadotropina en el plasma y en segundo lugar de la testosterona intratesticular. El efecto farmacológico en la espermatogenia tendría que ser ejercido mediante el aumento de la concentración de estas hormonas que actúan directamente sobre la espermatogenia. En particular el citrato de clomifeno a dosis bajas (25-50 mg) administrado durante 3 a 5 meses es adecuado para mejorar las características del semen, mientras que concentraciones mayores (200-400 mg) provocan una supresión de la espermatogenia y reducción de la concentración de espermatozoides.

Diversos estudios no controlados han señalado incrementos variables de concentración de espermatozoides y una tasa de embarazo variable de 0 al 80% y en donde la respuesta al tratamiento se observó casi exclusivamente en pacientes que padecen oligozoospermia baja a moderada (10-20 millones/ml). A la luz de dichos datos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizó un estudio multicéntrico, doble a ciegas, placebo frente citrato de clomifeno, para pacientes que padecen oligozoospermia idiopática, cuyo estudio no detectó ninguna mejora de la tasa de embarazo en los pacientes tratados con este fármaco (OMS, Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction Annual Technical Report 1990. Ginebra: OMS, 1991: 146-7).

Una vez más como terapia oral, pueden utilizarse los inhibidores de aromatasa, como por ejemplo testolactona. En estudios no controlados, la administración de testolactona (1 g/día) a individuos que padecen oligozoospermia ha sido adecuada para aumentar la concentración de espermatozoides y el porcentaje de embarazos. En un ensayo aleatorio sucesivo, controlado con placebo y doble a ciegas, con dosis de testolactona más elevadas (2 g/día), no se

ha detectado ninguna variación de los parámetros del semen y no se ha observado embarazo para los grupos tratados de este modo y con placebo. Otro compuesto que muestra actividad inhibidora selectiva sobre la aromatasa es anastrozol, que a dosis diaria de 1 mg parece ser similar a la testolactona para los efectos sobre la espermatogenia. Más estudios son, sin duda necesarios para estimar la eficacia real de estos fármacos para el tratamiento de la esterilidad masculina debido al número extremadamente bajo de individuos estudiados hasta hoy.

La administración de andrógenos representó uno de los primeros intentos terapéuticos llevados a cabo para mejorar los parámetros seminales en pacientes afectados de oligozoospermia. Actualmente se utilizan dos compuestos androgénicos débiles. Mesterolon, un derivado de la testosterona reducida en 5a que no afecta a la secreción de gonadotropina se ha utilizado como monoterapia en concentraciones diarias de 50 a 150 mg en varios ensayos resultantes en diferentes modificaciones de los parámetros seminales. Los estudios más recientes y los análisis de la OMS no han documentado variaciones significativas de todos los parámetros seminales analizados y del porcentaje de embarazo en comparación con el pretratamiento y los valores del grupo tratado con placebo. Del mismo modo el undecanoato de testosterona parecía ser adecuado en la mejora de los parámetros seminales en estudios controlados sin afectar las concentraciones de gonadotropina y testosterona; sin embargo pruebas sucesivas no han confirmado estos resultados y por lo tanto el uso de este compuesto debe verificarse más.

Por último, la L-arginina u otras combinaciones de L-aminoácidos y/o complementos vitamínicos como coadyuvantes en oligoastenospermia y hiposomía, por administración oral 2-3 veces al día durante tres meses.

A la luz de lo anterior es evidente la necesidad de proporcionar nuevas soluciones para el tratamiento de la esterilidad masculina superando los inconvenientes de los usos conocidos.

El ácido D-aspártico es un aminoácido natural detectado por primera vez en 1977 por Antimo D'Aniello en el cerebro del pulpo (molusco marino científicamente denominado *Octopus vulgaris*) publicado en colaboración con Antonio Giuditta en *J. of Neurochemistry* (Ref. 1-2). Investigaciones sucesivas llevadas a cabo por el mismo autor en colaboración con otros investigadores italianos y de otros países han demostrado que el ácido D-aspártico se produce no sólo en el sistema nervioso, sino también en el sistema endocrino de muchos animales marinos como moluscos, crustáceos, opistobranquios y peces (Ref. 3-5) y animales terrestres, como la rana (Ref. 6-7), lagarto (Ref. 8), pollo (Ref. 9), rata (Ref. 9-11), oveja (12) y seres humanos (Ref. 13-15). La concentración es variable de una especie a otra. En general, en animales menos avanzados el ácido D-aspártico está presente en una cantidad mayor en comparación con los más avanzados. Por otra parte, se ha detectado que este aminoácido en los mamíferos, incluyendo los seres humanos, durante la vida embrionaria se encuentra en concentraciones elevadas en el cerebro donde desempeña una función en el desarrollo del sistema nervioso. Por el contrario, durante la vida adulta, el ácido D-aspártico está presente en concentraciones elevadas en el sistema endocrino y en particular en la glándula pituitaria y los testículos donde desempeña una función en el sistema endocrino. Para una reseña completa véase (Ref. 16) y la tabla 1 siguiente, obtenida de una publicación de los autores en *Brain Reserch Review* vol. 53, páginas 215-234, 2006, que muestra el contenido de D-aspartato en los tejidos nervioso y endocrino de varias clases de animales.

Tabla 1: Concentraciones de ácido D-aspártico en varios tejidos de especies animales

Especies	Animales	Tejidos	nmoles ácido D-aspártico/g tejido
Moluscos	*Octopus vulgaris*	cerebro	8.000-15.000
	Octopus vulgaris	retina	3.000-4.000
	Octopus vulgaris	testículos	2.000-3.000
Opistobránquios	*Aplysia fasciata*	ganglios	600-800
	Aplysia fasciata	ganglios	3.000-4000
Tinicados	*C. intestinalis*	ganglios	300-500
Crustáceos	*Rock lobster*	cerebro	4.000-5.000
		retina	800-900
Anfibios	*Rana esculenta*	testículos	200-300
		glándula de Harder	100-150

Especies	Animales	Tejidos	nmoles ácido D-aspártico/g tejido
Reptiles	*Podarcis sicula*	órganos de reproducción	20-30
Peces	*Merlucius merlucius*	cerebro	30-40
Aves	*Gallus gallus*		
	Embrión:	cerebro y retina	300-600
	Adulto:	cerebro y retina	30-50
Mamíferos	Rata	cerebro (embrión)	250-350
		cerebro (adulto)	15-30
		retina (recién nacido)	300-400
		retina (adulto)	30-60
		pituitaria (2 días)	10-20
		pituitaria (adulto)	120-140
		glándula pineal	650-3.000
		testículos (embrión)	50-70
		testículos (adulto)	220-250
		hígado	10-20
	Seres humanos	cerebro (embrión)	340-380
		cerebro (adulto)	20-40

Los valores representan la concentración media en nmol de D-Asp/g en tejidos frescos (A. D'Aniello, *Brain Research Review*, 53, 215-234, 2006) (Ref. 16).

Los estudios sobre el ácido D-aspártico en ratas han demostrado que, si este compuesto se administra por vía oral, es adecuado para provocar un aumento temporal en la sangre de algunas hormonas como: la hormona luteinizante (LH) (Ref: 17-18), la hormona del crecimiento (Ref: 18), prolactina (PRL) (Ref: 19) y testosterona (Ref: 17-18). Por último recientemente ha sido demostrado también que el ácido D-aspártico está involucrado en la esterilidad masculina humana (Ref. 20).

Se ha observado para el hombre que en el líquido seminal y los espermatozoides de personas fisiológicamente fecundas (personas que tienen un número de espermatozoides mayor de 20 millones/ml de líquido seminal y movilidad superior al 70%) el ácido D-aspártico está presente en una concentración de 80±24 nmol/ml en el líquido seminal y 130±30 fmol/espermatozoide. En cambio, en el líquido seminal de personas estériles, es decir personas que tienen un número de espermatozoides inferior al normal en el líquido seminal y una movilidad del mismo por debajo de los valores fisiológicos (pacientes de oligoastenozoospermia) y en el líquido seminal de personas que no tienen espermatozoides (pacientes de azoospermia), el contenido del ácido D-aspártico está reducido de manera significativa tanto en el líquido seminal como en los espermatozoides. En concreto, en el líquido seminal de pacientes de oligoastenozoospermia, el ácido D-aspártico es aproximadamente 3 veces menor y en pacientes de azoospermia es 6 veces menor. Desde valores de 130 ± 35 fmol/espermatozoide encontrados en personas fecundas hasta 60±10 fmol/espermatozoide encontrados en pacientes de oligoastenozoospermia. La Tabla 2 presenta el contenido de ácido D-aspártico en el líquido seminal y espermatozoides humanos.

Tabla 2: Contenido de ácido D-aspártico en el líquido seminal y espermatozoides humanos

Líquido seminal (nmol/ml)			Espermatozoides (fmol/espermatozoide)	
Normal[1]	OAT[2]	AZO[3]	Normal[1]	OAT[2]
80	26	12	130	60
±10	±6,0	±1,5	±35	±5,0

[1]Donantes normospérmicos. [2]Donantes oligoastenoteratospérmicos. [3]Donantes azoospérmicos.

Los valores indican la desviación media y típica obtenidas a partir de 10 muestras de líquido seminal de donantes normales, 10 muestras de líquido seminal de donantes oligoastenoteratospérmicos (líquido seminal que contiene un número de espermatozoides inferior a 20 millones/ml de semen) y 10 muestras de líquido seminal de donantes azoospérmicos no obstructivos (donantes con un número de espermatozoides inferior a 1 millón/ml de semen).

El valor del ácido D-aspártico se obtuvo empleando un método cromatográfico HPLC específico en combinación con D-aspartato-oxidasa. La diferencia de ácido D-aspártico entre donantes normospérmicos y oligoastenoteratospermicos fue significativa para P <0,01 y la diferencia entre donantes oligoastenoteratospérmicos y azoospérmicos también fue significativa para p <0,01. Éstas, junto con otros resultados relativos a los aumentos de actividad del ácido D-aspártico en la hormona LH (hormona luteinizante) y testosterona (Ref. 17 y 18) obtenidos para la rata indicaron que la administración de ácido D-aspártico al hombre (una o dos dosis diarias de 3 g) durante al menos 30 días provocaron un aumento de los valores de LH y testosterona y del número de espermatozoides y la movilidad también en el hombre (Solicitud de patente italiana RM2005A000468 en septiembre de 2005). El documento US nº 5.863.940 describe un método terapéutico para el tratamiento idiopático como terozoospermia que comprende administrar una combinación de L-carnitina y acetil L-carnitina. De Aloysio *et al*. (1982), ACTA Europeea Fertilitatis Sep. 13(3), 133. Este documento describe el uso clínico del aspartato de arginina en la fecundidad masculina. Los autores de la presente invención han descubierto ahora que la combinación de los ácidos D-aspártico y L-aspártico produce un aumento de eficacia notable en comparación con la administración de la misma cantidad de ácido D-aspártico solo. Los autores han llevado a cabo estudios tanto en animales como en el hombre que demuestran un mayor aumento del número de espermatozoides y la movilidad de los individuos tratados con la combinación de la invención en comparación con los tratados con ácido D-aspártico solo. En particular, en el hombre se observa también un aumento de las concentraciones de las hormonas LH y testosterona. Los resultados del estudio llevado a cabo en el conejo y el hombre (no publicados) indican que la combinación de ácidos D-aspártico y L-aspártico o una de sus sales, en donde los ácidos se neutralizan como por ejemplo, con ion Na^+, puede utilizarse a fin de estimular la actividad procreadora del hombre mediante un aumento del número de espermatozoides y la vitalidad.

El uso de la combinación según la invención para el tratamiento de la esterilidad ofrece la ventaja notable de ser capaz de llevar a cabo sólo una única administración diaria y un coste, para el tratamiento del ciclo de 60-90 días, menor que las terapias conocidas. Por lo tanto, es objeto específico de presente invención una composición que comprende o que consiste en la combinación de los ácidos D-aspártico y L-aspártico o uno o más de sus sales correspondientes de metales alcalinos o alcalinotérreos, estando posiblemente, dichos principios activos en combinación con uno o más excipientes y/o coadyuvantes farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de la esterilidad masculina. En el caso de la combinación de los ácidos D-aspártico y L-aspártico o una o más de sus sales correspondientes de metales alcalinos o alcalinotérreos, la concentración de ácido D-aspártico o una de sus sales puede variar de 50% a 99,5%, mientras que, la concentración de ácido L-aspártico o una de sus sales pueden variar de 0,05% a 50%, estando referidos dichos porcentajes al peso total de los ácidos D-aspártico y L-aspártico o una de sus sales. Según una realización alternativa, la concentración de ácido D-aspártico o una de sus sales puede variar de 50% a 80% y la concentración de ácido L-aspártico o una de sus sales puede variar de 20% a 50%, estando referidos dichos porcentajes al peso total de los ácidos D-aspártico y L-aspártico o una de sus sales. Según una realización preferida la concentración de ácido D-aspártico o una de sus sales es 80% y la concentración de ácido L-aspártico o una de sus sales es 20%, estando referidos dichos porcentajes al peso total de los ácidos D-aspártico y L-aspártico o una de sus sales. Alternativamente, la concentración de ácido D-aspártico o una de sus sales o de ácido L-aspártico o una de sus sales es del 50%, estando referidos dichos porcentajes al peso total de los ácidos D-aspártico y L-aspártico o una de sus sales. Según una realización adicional, la concentración de ácido D-aspártico o una de sus sales es del 99,5% y la concentración de ácido L-aspártico o una de sus sales es del 0,05%, estando referidos dichos porcentajes al peso total de los ácidos D-aspártico y L-aspártico o una de sus sales.

Preferiblemente, la presente invención se refiere a la esterilidad masculina no obstructiva caracterizada por oligo y/o astenozoospermia con o sin hipogonadismo hipogonadótropo.

En particular, la sal de ácido D-aspártico o del L-aspártico es una sal de sodio o una mezcla de sales de sodio y de potasio o magnesio o de cinc.

Como se ha indicado antes, la composición según la invención puede comprender uno o más coadyuvantes seleccionados entre el grupo que consiste en aminoácidos, vitaminas, minerales, hormonas estimulantes de la función reproductiva, calicreína, antibióticos, agentes antiinflamatorios, antiandrógenos, andrógenos, pentoxifilina, gonadotropina, hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), estimuladores adrenérgicos, complementos dietéticos, antioxidantes (ácido alfa-lipoico, coenzima Q 10, glutatión y otros antioxidantes no mencionados aquí), cetoácidos como por ejemplo los ácidos oxaloacético y alfa-cetoglutárico. En particular, los aminoácidos pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en alanina, arginina, carnitina, cisteína, glutamina, glicina, leucina, lisina, isoleucina, metionina, ornitina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, serina.

Las vitaminas pueden seleccionarse del grupo que consiste en vitamina A, C, D3, E, K, B1, B2, B6, B12, PP, biotina (H), ácido fólico, ácido lipoico.

Por último, los minerales se seleccionan del grupo que consiste en magnesio, potasio, cinc, manganeso, molibdeno, cromo, selenio, pantotenato de calcio, hierro, cobre, yodo, fósforo, flúor, calcio.

Las vitaminas se pueden utilizar a una concentración variable como a continuación: vitamina A de 0,0048% a 0,024%, vitamina C de 0,36% a 3,6%, vitamina D3 de 0,00003% a 0,00015%, vitamina E de 0,06% a 0,6%, vitamina K de 0,00042% a 0,0021%, vitamina B1 de 0,0084 a 0,042%, vitamina B2 de 0,0096% a 0,048%, vitamina B6 de 0,012% a 0,06%, vitamina B12 de 6.10^{-6}% a 3.10^{-5}% , vitamina PP de 0,108% a 0,54%, biotina de 0,0009% a $4.4,10^{-5}$%, ácido fólico de 0,0012% a 0,006%, estando referidos dichos porcentajes % en peso al peso total de la composición.

Las concentraciones de los minerales pueden variar según los siguientes porcentajes: magnesio de 3,2% a 9%, potasio de 0,4% a 4%, cinc de 0,09% a 0,45%, manganeso de 0,02% a 0,07%, molibdeno, cromo o selenio de 0,0003% a 0,002%, pantotenato de calcio de 0,04% a 0,15%, hierro de 0,084% a 0,021%, el cobre de 0,02% a 0,1%, yodo de 0,0009% a 0,0045%, fósforo de 2,5% a 20%, flúor de 0,005 % a 0,02%, calcio de 3,24% a 16,2%, estando dichos porcentajes% en peso referidos al peso total de la composición.

Las concentraciones de aminoácidos, además de los aminoácidos D-aspártico y L-aspártico puede variar de 0,6% a 10% en peso referido al peso total de la composición.

Según una realización preferida de la presente invención la composición puede comprender, además de D- y L-aspartato, ácido fólico, vitamina B6, vitamina B12 y conservantes sorbato de potasio y benzoato de sodio. En particular, las concentraciones pueden variar como a continuación: el ácido fólico de 0,002% a 0,006%, vitamina B6 de 0,02% a 0,06%, vitamina B12 de 1.10^{-5}% a 3.10^{-5}%, sorbato de potasio de 0,002 a 0,008%, benzoato de sodio de 0,002 a 0,008%.

La composición según la presente invención se puede administrar como dosis diaria variable de 0,001 g/día a 10 g/día.

En base en lo anterior, las concentraciones de vitaminas y minerales, por tanto, pueden variar del 30% al 150% de RDA (dosis diaria recomendada). En particular, en la Tabla 3 se exponen diversos compuestos y dosis mínima y máxima de la misma que puede estar contenida en una dosis unitaria de fármaco de la composición según la invención.

Tabla 3: Dosis mínima y máxima de compuestos que pueden estar contenidos en dosis unitarias de fármaco

Componente	Dosis mínima	Dosis máxima
Vit. A	240 µg	1.200 µg
Vit. C	18 mg	180 mg (300% RDA)
Vit. D3	1,5 µg	7,5 µg
Vit. E	3 mg	30 mg (300% RDA)
Vit. K	21 µg	105 µg
Vit. B1	0,42 mg	2,1 mg

Componente	Dosis mínima	Dosis máxima
Vit. B2	0,48 mg	2,4 mg
Vit. B6	0,6 mg	3 mg
Vit. B12	0,3 µg	1,5 µg
Vit. PP	5,4 mg	27 mg
Biotina (h)	45 µg	2,25 µg
Ácido fólico	60 µg	300 µg
Magnesio	90 mg	450 mg
Potasio	20 mg	200 mg
Cinc	4,5 mg	22,5 mg
Manganeso	1 mg	3,5 mg
Molibdeno	15 µg	100 µg
Cromo	15 µg	100 µg
Selenio	15 µg	100 µg
Pantotenato de calcio	2 mg	7,5 mg
Hierro	4,2 mg	21 mg
Cobre	1 mg	5 mg
Yodo	45 µg	225 µg
Fósforo	125 mg	1.000 mg
Flúor	0,25 mg	1 mg
Calcio	162 mg	810 mg
Alanina	30 mg	300 mg
Arginina	30 mg	300 mg
Carnitina	30 mg	300 mg
Cisteína	30 mg	300 mg
Glutamina	30 mg	300 mg
Glicina	30 mg	300 mg
Leucina	30 mg	300 mg

Componente	Dosis mínima	Dosis máxima
Lisina	30 mg	300 mg
Isoleucina	30 mg	300 mg
Metionina	30 mg	300 mg
Ornitina	30 mg	300 mg
Fenilalanina	30 mg	300 mg
Treonina	30 mg	300 mg
Triptófano	30 mg	300 mg
Valina	30 mg	300 mg

La Tabla 4 muestra las dosis correspondientes a la composición según la invención con la dosis/día menor y mayor.

Tabla 4

Composición	Dosis media	Dosis menor	Dosis mayor
Principio activo			
1º Composición (80% de D-aspartato y 20% de L-aspartato)			
D-aspartato de sodio	2,49 (g/dosis)	1,24 (g/dosis)	7,47 (g/dosis)
L-aspartato de sodio	0,63 (g/dosis)	0,315 (g/dosis)	1,89 (g/dosis)
O			
2ª Composición (50% de D-aspartato y 50% de L-aspartato)			
D-aspartato de sodio	1,56 (g/dosis)	0,78 (g/dosis)	6,24 (g/dosis)
L-aspartato de sodio	1,56 (g/dosis)	0,78 (g/dosis)	6,24 (g/dosis)
Vitaminas			
Ácido fólico	100 µg/dosis	50 µg/dosis	300 µg/dosis
Vitamina B6	1,0 mg/dosis	0,5 mg/dosis	3,0 mg/dosis
Vitamina B12	0,5 µg/dosis	0,25 µg/dosis	1,5 µg/dosis
Conservantes			
Sorbato de potasio	9 mg/dosis	4,5 mg/dosis	27 mg/dosis
Bensoato de sodio	9 mg/dosis	4,5 mg/dosis	27 mg/dosis

Además, la composición puede comprender otras sustancias siguientes que presentan puramente una función coadyuvante referida al peso de la composición de una dosis comercial de 3 g de principio activo.

Xilitol 700, 0,1-10%

Aroma de naranja 0,1-10%

Vainillina 0,05-0,5%

Fructosa 0,2-20%

Sacarosa 0,2-20%

Maltodextrinas 0,2-10%;

Aspartamo 0,03-0,3%

Zumo de naranja deshidratado puro 0,1 a 20%

Hidróxido de magnesio 0,1-1%

Sílice 0,1-20%

Los porcentajes se expresan en % en peso referidos al peso de la composición de una dosis comercial 3,12 g de principio activo. La composición está en forma de solución salina que contiene 9-11 ml/botella, o en forma de gránulos con 3 g de dosis de principio activo de D/L-aspartato y otros ingredientes que ascienden a un peso en seco total de 3,5 a 6,0 g.

La presente invención se describirá a continuación a modo ilustrativo, según las realizaciones preferidas de la misma, con referencia detallada a los dibujos adjuntos en donde:

La Figura 1 muestra el aumento de LH (hormona luteinizante) en el plasma humano después del tratamiento con la composición según la invención. Los valores indicados representan los valores medios y la desviación típica (S.D.) obtenidos de diez personas de 25-40 años de edad en el momento cero y 10, 20 y 30 días después del tratamiento (véase la bibliografía más adelante).

La Figura 2 muestra el aumento de testosterona en el plasma humano después del tratamiento con la composición según la invención. Los valores indicados representan los valores medios y la desviación típica (S.D.) obtenidos de diez personas de 25-40 años de edad en el momento cero y 10, 20 y 30 días después del tratamiento (véase la bibliografía más adelante).

La Figura 3 muestra el aumento del número de espermatozoides en el líquido seminal humano después del tratamiento con la composición según la invención (véase la bibliografía más adelante).

La Figura 4 muestra el aumento del número de espermatozoides en el líquido seminal humano después del tratamiento con la composición según la invención. Los valores indicados representan los valores medios y la desviación típica (S.D.) obtenidos de diez personas de 25-40 años de edad en el momento cero y 30, 60 y 90 días después del tratamiento (véase la bibliografía más adelante).

La Figura 5 muestra el análisis de HPLC de la muestra conocida que consiste en una mezcla típica de D-aspártico junto con la mezcla de L-aminoácido (véase la bibliografía más adelante).

Ejemplo 1: *Preparación de D-aspartato de sodio y la combinación de L-aspartato de sodio en forma de solución o en polvo*

Los ácidos D-aspártico y L-aspártico se encuentran disponibles en el mercado en forma de polvo insoluble en agua. Es necesario, por lo tanto, que la formación de la sal de sodio, potasio o magnesio disuelva el aminoácido. En la presente memoria se describe a continuación un ejemplo de preparación de D-aspartato de sodio a una concentración 2 M, que corresponde a 266 g de ácido D-aspártico/l que corresponde a su vez a 312 g de D-aspartato de sodio/l.

Ejemplo de preparación de un litro de mezcla acuosa que consiste en 80% D-aspartato de sodio y 20% L-aspartato de sodio y que se envasa en 10 ml/botella

Mezclar 212,8 g de ácido D-aspártico y 53,2 g de ácido L-aspártico en 250 ml de agua destilada. A continuación, en agitación continua, añadir en porciones 480 ml de NaOH 4 M (NaOH 4 M corresponde a 160 g/l) y la agitación se lleva a cabo con el fin de disolver el ácido D-aspártico y el ácido L-aspártico. Después de la disolución el pH de la solución será 6,0-7,0. Si el valor de pH es superior a 7,0, entonces ajustar a pH 6,0-7,0 con algunos ml de HCl 2 M, si por el contrario el pH es menor que 6,0-7,0, entonces añadir más NaOH hasta que el pH sea de nuevo 6,0-7,0. A continuación añadir 0,9 g de sorbato de potasio y 0,9 g de benzoato de sodio. Por último añadir agua destilada hasta

un volumen final de 1 litro. Filtrar a través de membranas de poro de 0,45 µm (Millipore) o papel 3 MM con el fin de separar el residuo insoluble y al mismo tiempo para esterilizar la solución. Sucesivamente distribuir en envases de 10 ml. Por último añadir en envase con tapón dosificador 2 mg de vitamina B6, 0,3 mg de ácido fólico, 1,5 µg de vitamina B12 y posiblemente aroma de naranja o fructosa u otro excipiente en la cantidad que se establezca en función del sabor deseado del fármaco. 10 ml de la solución contienen 2,49 g de D-aspartato de sodio y 0,63 g de L-aspartato de sodio (correspondiente a 2,128 g de ácido D-aspártico y 0,530 g de ácido L-aspártico, respectivamente).

Procedimiento alternativo

Alternativamente dicha preparación anterior puede obtenerse según el siguiente procedimiento que también es más práctico: Añadir a 750 ml de NaOH 2,66 M (solución de NaOH 2,66 M corresponde a 106,6 g de NaOH/l) en agitación 212,8 g de ácido D-aspártico y 53,2 g de ácido L-aspártico. Continuar la agitación hasta que se disuelva todo el aminoácido. Después de la disolución completa, comprobar el valor del pH que debe estar entre 6,0 y 7,0. Si el pH es superior a 7,0, entonces añadir algunos ml de HCl 2 M hasta que el pH esté entre 6,0 y 7,0. Si por el contrario el pH es inferior a 6,0, entonces añadir algunos ml de NaOH 2 M hasta pH esté entre 6,0 y 7,0. A continuación, añadir 0,9 g de sorbato de potasio y 0,9 g de benzoato de sodio. Por último añadir agua destilada hasta un volumen final de 1 litro. Filtrar a través de membranas de poro de 0,45 µm (Millipore) o papel 3 MM con el fin de separar el posible residuo insoluble y esterilizar la solución. Sucesivamente distribuir en envases de 10 ml. Por último añadir en envase con tapón dosificador 2 mg de vitamina B6, 0,3 mg de ácido fólico, 1,5 µg de la vitamina B12 y posiblemente aroma de naranja o fructosa u otro excipiente en la cantidad que se establezca en función del sabor deseado del fármaco. 10 ml de la solución contienen 2,49 g de D-aspartato de sodio y 0,63 g de L-aspartato de sodio (correspondiente a 2,128 g de ácido D-aspártico y 0,530 g de ácido L-aspártico, respectivamente).

Ejemplo de referencia de preparación de 1 l de solución acuosa de D-aspartato sódico solo

Mezclar 266 g de ácido D-aspártico en 250 ml de agua destilada. A continuación, en agitación, añadir 480 ml de NaOH 4 M (una solución de NaOH 4 M corresponde a 160 g/l) y agitar con el fin de disolver el ácido D-aspártico. Después de la disolución el pH de la solución debe estar entre 6,0 y 7,0. Si el pH es superior a 7,0, entonces ajustar el pH a 6,0-7,0 con algunos ml de HCl 2 M.

Si por el contrario el pH es inferior a 6,0-7,0, entonces añadir más NaOH hasta que el pH sea 6,0-7,0. A continuación añadir 0,9 g de sorbato de potasio y 0,9 g de benzoato de sodio. Por último añadir agua destilada hasta un volumen final de 1 litro. Filtrar a través de membranas de poro de 0,45 µm (Millipore) o papel 3 MM con el fin de separar el residuo insoluble y al mismo tiempo para esterilizar la solución. Sucesivamente distribuir en envases de 10 ml. Por último añadir en envase con tapón dosificador 2 mg de vitamina B6, 0,3 mg de ácido fólico, 1,5 µg de la vitamina B12 y posiblemente aroma de naranja o fructosa u otro excipiente en la cantidad que se establezca en función del sabor deseado del fármaco. 10 ml de la solución contienen 3,12 g de D-aspartato de sodio correspondiente a 266 g de ácido D-aspártico.

Como alternativa al procedimiento anterior la solución de D-aspartato de sodio se prepara de la siguiente manera: Añadir a 750 ml de NaOH 2,66 M (NaOH 2,66 M corresponde a 106,6 g de NaOH/litro) añadir en agitación 266 g de ácido D-aspártico. Agitar continuamente hasta que se disuelva todo el D-aspártico. Después de la disolución el pH de la solución debe estar comprendido entre 6,0 y 7,0. Si es superior a 7,0, a continuación, ajustar el pH entre 6,0 y 7,0 con algunos ml de HCl 2 M. Si por el contrario el pH es inferior a 6,0-7,0, entonces añadir más NaOH hasta que el pH sea 6.0-7.0. A continuación añadir 0,9 g de sorbato de potasio y 0,9 g de benzoato de sodio. Por último añadir agua destilada hasta un volumen final de 1 litro. Filtrar a través de membranas de poro de 0,45 µm (Millipore) o papel 3 MM con el fin de separar el residuo insoluble y, al mismo tiempo para esterilizar la solución. Sucesivamente distribuir en envases de 10 ml. Por último añadir en envase con tapón dosificador 2 mg de vitamina B6, 0,3 mg de ácido fólico, 1,5 µg de vitamina B12 y posiblemente aroma de naranja o fructosa u otro excipiente en la cantidad que se establezca en función del sabor deseado del fármaco. 10 ml de la solución contienen 3,12 g de D-aspartato de sodio correspondiente a 266 g de ácido D-aspártico.

Ejemplo de preparación de un litro de mezcla acuosa que consiste en 50% de D-aspartato de sodio y 50% de L-aspartato de sodio y envasado en envases de 10 ml.

Mezclar 133 g de ácido D-aspártico y 133 g de ácido L-aspártico en 250 ml de agua destilada. A continuación, en agitación continua, añadir 480 ml de NaOH 4 M (4 M = 160 g/l) y se agita con el fin de disolver el ácido D-aspártico y el ácido L-aspártico. Después de la disolución el pH de la solución estará entre 6,0 y 7.0. Si el valor de pH es superior a 7,0, entonces ajustar el pH entre 6,0 y 7,0 con algunos ml de HCl 2M. Si por el contrario el pH es menor que 6,0-7,0, entonces añadir más NaOH hasta que el pH sea de nuevo 6,0-7,0. A continuación añadir 0,9 g de sorbato de potasio y 0,9 g de benzoato de sodio. Por último añadir agua destilada hasta un volumen final de 1 litro. Filtrar a través de membranas de poro de 0,45 µm (Millipore) o papel 3 MM con el fin de separar el residuo insoluble y al mismo tiempo para esterilizar la solución. Sucesivamente distribuir en envases de 10 ml. Por último añadir en envase con tapón dosificador 2 mg de vitamina B6, 0,3 mg de ácido fólico, 1,5 µg de la vitamina B12 y posiblemente aroma de naranja o fructosa u otro excipiente en la cantidad que se establezca en función del sabor deseado del fármaco. 10 ml de la solución contienen 1,56 g de D-aspartato de sodio y 1,56 g de L-aspartato de sodio

(correspondiente a 1,33 g de ácido aspártico D y 1,33 g de ácido L-aspártico, respectivamente).

Como alternativa al procedimiento anterior la preparación de la mezcla de D-aspartato de sodio y L-aspartato de sodio se lleva a cabo de la siguiente manera: Añadir a 750 ml de NaOH 2,66 M (NaOH 2,66 M = 106,6 g de NaOH/l) en agitación constante 133 g de ácido D-aspártico y 133 g de ácido L-aspártico. Continuar la agitación hasta que se disuelva todo aminoácido. Después de la disolución completa, comprobar el valor del pH que debe estar entre 6,0 y 7,0. Si el pH es superior a 7,0, entonces añadir algunos ml de HCl 2 M hasta que el pH esté entre 6,0 y 7,0. Si por el contrario el pH es inferior a 6.0-7.0, entonces añadir más NaOH 2 M hasta pH esté entre 6,0 y 7,0. A continuación añadir 0,9 g de sorbato de potasio y 0, 9 g de benzoato de sodio. Por último añadir agua destilada hasta un volumen final de 1 litro. Filtrar a través de membranas de poro de 0,45 µm (Millipore) o papel 3 MM con el fin de separar el posible residuo insoluble y esterilizar la solución. Sucesivamente distribuir en envases de 10 ml. Por último añadir en envase con tapón dosificador 2 mg de vitamina B6, 0,3 mg de ácido fólico, 1,5 µg de vitamina B12 y, posiblemente, aroma de naranja o fructosa u otro excipiente en la cantidad que se establezca en función del sabor deseado del fármaco. 10 ml de la solución contienen 1,56 g de D-aspartato de sodio y 1,56 g de L-aspartato de sodio (correspondiente a 1,33 g de ácido D-aspártico y 1,33 g de ácido L-aspártico).

Preparación D-aspartato de sodio y L-aspartato de sodio en forma de polvo

D-aspartato y L-aspartato en forma de sales de sodio, potasio o magnesio están disponibles en el mercado. La sal DL-aspartato de sodio, que consiste en la mezcla racémica DL-aspartato, es decir, 50% de D-aspartato de sodio y 50% de L-aspartato de sodio, está también disponible en el mercado. Por lo tanto, también es posible preparar bolsitas monodosis que contienen la dosis determinada de D-aspartato de sodio (3,12 g). A esta dosis se añaden a continuación 2 mg de vitamina B6, 0,3 mg de ácido fólico y 1,5 µg de vitamina B12 y posiblemente cantidades determinadas de aroma de naranja u otro, sacarosa u otros excipientes con el fin de tener una ingestión agradable al paladar. En esta preparación no se añaden ni benzoato de sodio ni sorbato de potasio estando el fármaco en polvo y por lo tanto no contaminable por microorganismos. A continuación, la bolsita se disuelve en agua potable y se ingiere.

Ejemplo 2: *Estudio sobre los efectos de una combinación de 80% de D-aspartato de sodio y 20% de L-aspartato de sodio en conejos*

El estudio se ha llevado a cabo en dos grupos de conejos (10 conejos por cada grupo) con el fin de probar el efecto del D-aspartato de sodio y del D-aspartato de sodio en combinación con una cantidad determinada de L-aspartato de sodio sobre la calidad de líquido seminal, es decir, en el número de espermatozoides/ml y sobre la movilidad progresiva rápida de los mismos.

El experimento consistió en la ingestión por un grupo de 10 conejos macho adultos, de 6 meses, de una cantidad de D-aspartato de sodio correspondiente a 0,250 g al día (1,6 µmol/conejo; 0,26 µmol/kg de peso corporal) durante 20 días. Prácticamente, el D-aspartato de sodio se mezcló con el alimento en una cantidad tal que el alimento diario ingerido por el conejo contenía 0,250 g de D-aspartato de sodio. De la misma manera, en un segundo experimento llevado a cabo en otro grupo de 10 conejos macho adultos de la misma edad, se administró una mezcla consistente en 0,2 g de D-aspartato de sodio y 0,05 g de L-aspartato de sodio (80% D-Asp:20% de L-Asp). Antes del inicio del experimento y al final de la ingestión de fármacos que dura 20 días, de cada conejo se ha recogido una muestra de semen obtenida por estimulación mediante una vagina artificial y se ha determinado el número total de espermatozoides/ml de semen y la movilidad de los mismos.

El número de los espermatozoides y la movilidad progresiva rápida se determinan según directrices de la OMS (Organización Mundial de la Salud) utilizando una cámara Makler para el recuento (Sefi Medtstl Instrument, Haifa, Israel) y en el mismo lugar se ha determinado la movilidad progresiva rápida. El semen de conejo se diluyó 1:10 en una solución isoosmótica debido a la concentración excesiva.

El resultado obtenido a partir de este estudio demostró que en el primer experimento, es decir, los conejos tratados con solo de D-aspartato de sodio, este aminoácido mejoró estadísticamente el número espermatozoides en el líquido seminal, es decir, la producción, por término medio, el 19,3%. A partir de un valor medio de 300.000.000 de espermatozoides/ml de líquido seminal para los conejos de referencia (conjunto antes del inicio del tratamiento) a un valor promedio de 358.000.000/ml después de la ingestión de D-aspartato de sodio durante 20 días, correspondiente a un aumento de 19,3% (Tabla 5; parte A; 1er grupo de 10 conejos). Por otra parte, en los mismos líquidos seminales de los conejos tratados, se ha detectado también una mejora de la movilidad progresiva rápida de los espermatozoides que varía entre 40% y 55%, es decir un aumento del 37% en comparación con los valores de referencia (Tabla 5, parte B, 1er grupo de conejos).

En el segundo experimento llevado a cabo con otros 10 conejos de la misma edad administrados con una dosis diaria consistente en 0,2 g de D-aspartato de sodio y 0,05 g de L-aspartato de sodio (80% de D-Asp:20% de L-Asp) y para el mismo tiempo, la calidad de líquido seminal ha mejorado aún más. En este caso, de hecho, el número de espermatozoides en el líquido seminal antes del tratamiento fue de 320.000.000 espermatozoides/ml como valor promedio, mientras que después del tratamiento con D-aspartato de sodio integrado en L-aspartato de sodio, era 410.000.000/ml de espermatozoides/ml de valor seminal, que se incrementa el 28,1% (Tabla 5; la parte A; 2° grupo

de conejos). Por otra parte, también la movilidad progresiva rápida de los espermatozoides mejoró estadísticamente. De hecho, los espermatozoides rápidos progresivos encontrados en el líquido seminal del primer grupo de conejos asciende al 40%, mientras que después del tratamiento con D-aspartato el valor medio del mismo fue de 55%, es decir aumenta en un 37%. Para los resultados después de la ingestión de la mezcla consistente en D-aspartato de sodio y L-aspartato de sodio véase la Tabla 5, parte B; 2° grupo de conejos. En segundo grupo de conejos administrados con D-Asp + L-aspartato el valor medio del número de espermatozoides rápidos varió desde el 39% al 58%, es decir aumentan un 48% (Tabla 5; parte B; 2 ° grupo de conejos).

Desde un punto de vista estadístico, las mejoras de los parámetros estudiados, tanto usando D-aspartato de sodio solo como usando una mezcla que consiste en D-aspartato de sodio integrado en L-aspartato de sodio, analizadas utilizando el test de la T de Student fueron significativas para P <0,01. Los resultados indicados anteriormente se muestran en la Tabla 5 publicada a continuación que muestra el efecto de D-aspartato de sodio y D-aspartato de sodio + L-aspartato de sodio en la mejora de número y calidad de los espermatozoides en el líquido seminal de conejo.

Tabla 5. Efecto del D-aspartato de sodio y del DL-aspartato de sodio sobre la mejora del número y calidad de los espermatozoides en el líquido seminal de conejo

Parte A

	Número de espermatozoides/ml del líquido seminal en conejos:			
	1er grupo de 10 conejos		2º grupo de 10 conejos	
	Antes del tratamiento	Después de la ingestión de 100% de D-aspartato	Antes del tratamiento	Después de la ingestión de 80% de D-aspartato + 20% de L-aspartato
	300.000.000/ml de líquido seminal	358.000.000/ml de líquido seminal	320.000.000/ml de líquido seminal	410.000.000/ml de líquido seminal
% incremento	-	19,3%	-	28,1

Parte B

	Número de espermatozoides/ml del líquido seminal en conejos:			
	1er grupo de 10 conejos		2º grupo de 10 conejos	
	Antes del tratamiento	Después de la ingestión de 100% de D-aspartato	Antes del tratamiento	Después de la ingestión de 80% de D-aspartato + 20% de L-aspartato
progresivo rápido	40%*	55%*	39%*	58%*
% incremento)	-	+37%	-	+48%
lento	30%*	27%*	28%*	28%*
inmóvil	30%*	18%*	33%*	14%*

Los resultados se refieren a los valores medios obtenidos en un grupo de 10 conejos adultos (de 6 meses) antes del tratamiento y 20 días después de la ingestión de 0,25 g de D-aspartato de sodio (1,60 µmol/conejo; 0,26 µmol/kg de peso corporal) y en un grupo de otros 10 conejos de la misma edad antes del tratamiento y 20 días después de la ingestión de una mezcla consistente en 0,2 g de D-aspartato de sodio y 0,05 g de L-aspartato de sodio diariamente y

durante 30 días (80 % de D-aspartato Na y 20% de L-aspartato Na).

Los valores indicados en la parte A de la tabla se refieren a número total de espermatozoides/ml de líquido seminal antes y después del tratamiento farmacológico respectivo. Entre paréntesis se indica el porcentaje de incremento del número de espermatozoides.

En la parte B de la tabla de los valores con asterisco se refieren a los valores porcentuales del número de espermatozoides progresivos rápidos, lentos e inmóviles sobre la base de 100. Los valores entre paréntesis se refieren al porcentaje de los incrementos de espermatozoides progresivos rápidos con respecto a los valores antes del tratamiento de farmacológico respectivo.

Los aumentos del número de espermatozoides y la movilidad en conejos tratados con D-aspartato de sodio y D-aspartato de sodio de sodio integrado en L-aspartato son todos significativos (T de Student ; P <0,01).

Ejemplo 3: *Estudio sobre los efectos de una combinación de 50% de D-aspartato de sodio y 50% de L-aspartato de sodio en los conejos*

El estudio conllevó la administración de una mezcla consistente en 0,125 g de D-aspartato de sodio + 0,125 g de L-aspartato de sodio (50% D-Asp:50% L-Asp) a un grupo de 10 conejos según el procedimiento del Ejemplo 2. El resultado obtenido demuestra que también en este caso se obtuvo una mejora de la calidad del semen en cuanto al número total de espermatozoides y la movilidad progresiva rápida en comparación con las referencias, pero este efecto fue poco menos eficiente con respecto al efecto de la utilización de la mezcla consistente en 80% de D-aspartato de sodio y 20% de L-aspartato de sodio. En este caso la producción del número de espermatozoides se incrementó en un 25% y la movilidad en un 55% en comparación con las referencias que muestran que también en este caso se obtuvo una mejora en comparación con D-aspartato solo pero fue menor que la mezcla consistente en 80% de D-aspartato y 20% de L-aspartato.

Ejemplo 4: *Estudio sobre los efectos de una combinación de 80% de D-aspartato de sodio y 20% de L-aspartato de sodio en el hombre*

Se han alistado grupos de voluntarios de 25-40 años de edad y se ha evaluado el efecto del D-aspartato de sodio solo y el efecto del D-aspartato de sodio complementado con L-aspartato de sodio en espermatogenia humana.

El estudio conlleva la ingestión oral (después del desayuno o la comida principal) por un grupo de 10 personas de 25-40 años de edad de una dosis diaria que consiste en 3,12 g de D-aspartato de sodio (19,2 µmoles de D-aspartato de sodio; 0,27 µmol/kg de peso corporal para una persona de 70 kg) durante 30 días. Otro grupo de 10 personas de 25-40 años de edad (después del desayuno o la comida principal) ingirió una dosis diaria de una mezcla consistente en 2,49 g de D-aspartato de sodio y 0,63 g de L-aspartato de sodio (80% de D-aspartato de sodio y 20 % de L-aspartato de sodio) para el mismo período.

Antes del inicio del estudio y en el suero obtenido de sangre recogida después de 10, 20 y 30 días de tratamiento se han determinado los valores de LH, testosterona y el número y la movilidad progresiva rápida de los espermatozoides.

Se han llevado a cabo ensayos hormonales de LH y testosterona utilizando kits comerciales específicos para el uso químico clínico.

Se ha recogido líquido seminal mediante masturbación después de 3-5 días de abstinencia. El número de espermatozoides y la movilidad progresiva rápida de los mismos se han determinado según las directrices de la OMS (Organización Mundial de la Salud) utilizando una cámara Makler para el recuento (Sefi Medtstl Instrument, Haifa, Israel) y en el mismo lugar se ha determinado la movilidad progresiva rápida .

Debe señalarse que este estudio se ha llevado a cabo en individuos seleccionados que tienen un número de espermatozoides en el líquido seminal de 15.000.000 a 20.000.000/ml, es decir valores umbral mínimos dentro del intervalo normal. Este expediente se ha basado en estudios preliminares que indican que el efecto del D-aspartato en la mejora de la espermatogenia se apreció con mayor evidencia en individuos que producen un número de espermatozoides no demasiado elevado. Probablemente esto resulta del hecho de que los individuos que producen un número relativamente bajo de espermatozoides, también tienen un % mayor de espermatozoides que no alcanzan la maduración y se degradan durante la espermatogenia. En este caso, por tanto, la acción del D-aspartato estimula su maduración a espermatozoides vitales.

El resultado obtenido indicaba que el uso de D-aspartato de sodio mejoraba estadísticamente los valores de las hormonas LH y testosterona (hormonas específicas involucradas en la espermatogenia) y el número y la movilidad progresiva rápida de los espermatozoides. Específicamente el tratamiento diario con 3,12 g de D-aspartato de sodio produjo un aumento medio de los valores hemáticos de LH del 25,6%. Desde un valor promedio de 4,3 mUI/ml para las referencias, se obtuvo un valor de 5,4 mUI/ml en las personas después de la ingestión de D-aspartato (P <0,01). El mismo efecto se observó para la testosterona pasando de un valor sérico de 4,8 ng/ml antes del tratamiento a un valor sérico de 6,3 ng/ml después del tratamiento, es decir un aumento del 31,2% (P <0.01) (Tabla 6, parte A, 1er

grupo de personas). Por otra parte, también el número y la movilidad progresiva de los espermatozoides han aumentado significativamente en comparación con las referencias. En este caso, de hecho, el número total de espermatozoides encontrados antes de la ingestión de D-aspartato era de 18.000.000 y después del tratamiento con D-aspartato 23.000.000, tanto como promedio, por lo tanto, un aumento del 27% (Tabla 6, parte B; primer grupo de 10 personas). Por otra parte, también la movilidad se ha incrementado significativamente en un 28% después del tratamiento con D-aspartato en comparación con los valores antes del tratamiento (Tabla 6, parte B, 1er de grupo de 10 personas) (P <0,01).

Curiosamente, se ha observado, además, que como para los conejos (véase anteriormente), también para el hombre el tratamiento con una mezcla que consiste en D-aspartato de sodio integrado en D-aspartato de sodio produjo una mejora ulterior en comparación con el uso de D-aspartato de sodio solo tanto para las hormonas hemáticas (LH y testosterona) como para la calidad de líquido seminal. En este segundo experimento, de hecho, se observó que el grupo de personas que había asumido la dosis diaria consistente en 2,49 g de D-aspartato de sodio y 0,63 g de L-aspartato de sodio (80% de D-Asp; 20% de L-Asp) mejora aún más el rendimiento de la fecundidad en comparación con la referencia. El valor medio de LH aumentó un 38,6% en comparación con la referencia (las mismas personas antes del tratamiento) en comparación con un incremento de 25,6% observado usando solo D-aspartato de sodio (Tabla 6, parte A; 2° grupo de 10 personas). El mismo fenómeno se produce para la testosterona. Esta hormona esteroidea, de hecho, después del tratamiento con D-aspartato integrado en L-aspartato se incrementa en un 47,8% en comparación con la referencia (las mismas personas antes del inicio de la terapia), mientras que usando D-aspartato solo el incremento fue de 31,2 % (Tabla 6, parte A; segundo grupo de 10 personas). Por otra parte, también mejoraron el número y la movilidad de los espermatozoides. Desde un valor promedio de 19.500.000/ml antes de la terapia hasta un valor de 28.000.000/ml, una mejora de un 43% (Tabla 6, parte B; 2° grupo de 10 personas). Además, con el último tratamiento, se obtuvo también una mejora de la calidad de los espermatozoides. De hecho, el número de espermatozoides progresivos rápidos obtenidos con el uso de D-aspartato de sodio coadyuvado con L-aspartato de sodio pasó de los valores del 34% al 50% antes y después del tratamiento, respectivamente, es decir un aumento del 47% (Tabla 6, la parte B; 2° grupo de 10 personas).La Tabla 6 muestra el efecto del D-aspartato de sodio y D-aspartato de sodio + L-aspartato de sodio en la mejora de las hormonas LH y testosterona y en el número y la calidad de los espermatozoides en el líquido seminal humano.

Tabla 6. Efecto del D-aspartato de sodio y de la mezcla consistente en 80% de D-aspartato de sodio y 20% de L-aspartato de sodio en el aumento de las hormonas LH y testosterona en el suero humano y en el número y la calidad de los espermatozoides en el líquido seminal humano

Parte A

Concentración de LH y testosterona en el suero humano

	1er grupo de 10 conejos		2º grupo de 10 conejos	
	Antes del tratamiento	Después de la ingestión de 100% de D-aspartato	Antes del tratamiento	Después de la ingestión de 80% de D-aspartato + 20% de L-aspartato
LH (mUI/ml suero)	4,3	5,4	4,4	6,1
% incremento	-	+25,6%	--	+38,6%
Testosterona (ng/ml suero)	4,8	6,3	4,6	6,8
% incremento	-	+31,2%	--	+47,8%

Parte B

Número y calidad de espermatozoides en el líquido seminal humano

	1er grupo de 10 seres humanos		2º grupo de 10 seres humanos	
	Antes del tratamiento	Después de la ingestión de 100% de D-aspartato	Antes del tratamiento	Después de la ingestión de 80% de D-aspartato + 20% de L-aspartato
Nº total de espermatozoides/ml líquido seminal	18.000.000	23.000.000 +27%	19.500.000	28.000.000 +43%
Espermatozoides progresivos rápidos	35%*	45%*	34%*	55%*
Espermatozoides lentos	30%*	25%*	28%*	29%*
Espermatozoides inmóviles	35%*	30%*	38%*	21%*

Los resultados se refieren a valores medios de una serie de 10 pacientes de 25-40 años de edad antes del tratamiento y después de la ingesta diaria durante 30 días de 3,0 g de D-aspartato de sodio/día (1er grupo de 10 personas) y un grupo de 10 individuos de la misma edad antes del tratamiento y después de la ingestión diaria durante 30 días de 2,49 g de D-aspartato de sodio y 0,63 g de L-aspartato de sodio (80% de D-aspartato de sodio y 20% de L-aspartato de sodio). Los valores entre paréntesis en la parte A de la tabla se refieren al % de incremento de LH y testosterona antes y después del tratamiento respectivo. Los valores con asterisco de la parte B de la tabla se refieren al valor en % del número de espermatozoides progresivos rápidos, lentos e inmóviles sobre la base de 100.

Los valores entre paréntesis de la parte B de la tabla se refieren al % de incrementos de espermatozoides totales y rápidos progresivos.

Los aumentos de todos los valores entre paréntesis (LH, testosterona, número total y espermatozoides progresivos rápidos) son todos significativos (T de Student; $p < 0,01$).

Los resultados obtenidos de estos experimentos demostraron que los valores de LH y la testosterona aumentan significativamente durante los días de tratamiento y hasta aproximadamente 30 días de tratamiento en comparación con el valor inicial (antes del tratamiento). Sucesivamente dicho aumento permanece constante si el tratamiento se prolonga durante un período ulterior de tiempo. Por el contrario el número de los espermatozoides en el líquido seminal continúa aumentando progresivamente hasta el día 90° del tratamiento.

En las figuras 1 y 2 se presenta el diagrama de los valores aumentados de LH y testosterona en la sangre humana antes y después de tratamiento con la composición según la invención (80% de D-aspartato de sodio y 20% de L-aspartato de sodio).

En las Fig. 3 y 4 se presenta el diagrama del aumento de los valores del número de espermatozoides y su movilidad progresiva rápida antes y después del tratamiento con la composición según la invención.

Determinación del ácido D-aspártico en el líquido seminal humano

2 ml de líquido seminal ellos obtenidos de cada paciente se diluye en 10 ml de TCA 0,2 M (ácido tricloroacético) para desproteneización y se centrifuga a 10.000 rpm durante 30 min. El sobrenadante que contiene el ácido D-aspártico y otros aminoácidos, se purificó en una columna de intercambio catiónico (1x4 cm) como se describe en la Ref. 18-21. En resumen, a una columna de resina de intercambio iónico 2x4 AG-50W-X8; malla 200-400, Bio-Rad, se añadió el sobrenadante en TCA de líquido seminal obtenido anteriormente. Después de la absorción de la muestra, la columna se lavó con 10 ml de HCl 0,001 M y a continuación se eluyó con 10 ml de hidróxido de amonio 4 M. Este eluido, que contiene los aminoácidos purificados, se secó en una placa caliente para eliminar el amoníaco y el

residuo se disolvió en 2 ml de agua destilada y el ácido D-aspártico se determinó por HPLC o un método colorimétrico basado en la utilización de D-aspartato oxidasa (purificada de riñón bovino) como se describió en nuestro artículo (Ref: 18-21).

La Figura 5 muestra un ejemplo de análisis por HPLC de una muestra típica que consiste en una mezcla típica de D-aspártico junto con mezcla de L-aminoácido.

El panel izquierdo muestra el análisis por HPLC de una mezcla típica que consiste en D-Asp y otros L-aminoácidos. El diagrama representa un ejemplo de un cromatograma obtenido usando 10 picomoles de D-Asp y 20 picomoles de los siguientes otros aminoácidos: Glu, Asn, Gln, Ser, Thr, His, Gly, Arg, Ala, Taurina, GABA, Tyr, Val, Met, Leu, Ile, Phe y Lys. e D-Asp se eluye en 5,2 min seguido de L-Asp y otros L-aminoácidos.

El panel derecho se refiere a la misma muestra, pero después del tratamiento con D-aspartato-oxidasa. En este caso la enzima D-aspartato oxidasa que es específica para la oxidación de D-Asp solamente eliminó el pico en un tiempo de elución de 5,2 min confirmando así que este pico realmente provenía del ácido D-aspártico.

Análisis estadístico

Los datos se expresan en media ± SD utilizando la prueba de la t de Student. P <0,05 se ha considerado estadísticamente significativa.

Ejemplo 5: *Estudio sobre los efectos de una combinación de 50% de D-aspartato de sodio y 50% de L-aspartato de sodio en el hombre*

Se ha llevado a cabo otro estudio que implica el tratamiento de otro grupo de 10 personas de 25-40 años de edad con una mezcla consistente en 1,56 g de de D-aspartato de sodio + 1,56 g de L-aspartato de sodio (50% de D-Asp:50% de L-Asp) como dosis diaria durante 30 días. Los resultados obtenidos indicaron que también en este caso se obtuvo una mejora tanto de los valores hemáticos de LH y de testosterona como la calidad del líquido seminal, pero menos eficiente en comparación con el uso de la mezcla consistente en 80% de D-aspartato de sodio y 20% de L-aspartato de sodio. En este caso, de hecho, los valores de testosterona y LH aumentaron significativamente es decir, en un 30% y 38%, respectivamente, en comparación con los valores básicos. Por otra parte, también el número de espermatozoides y la movilidad progresiva rápida de los mismos se incrementaron significativamente en un 45% en comparación con las referencias (datos no mostrados en la tabla). Por lo tanto también utilizando D-Asp + L-Asp se observó una mejora muy significativa de los parámetros espermáticos, pero menor que utilizando 80% de D-Asp y 20% de L-Asp.

En conclusión, como se observa para los conejos, también para el hombre el tratamiento con D-aspartato de sodio integrado con D-aspartato de sodio produce una mejora significativa tanto de los valores de LH y testosterona en la sangre como en el número de espermatozoides y la movilidad en el líquido seminal en comparación con el tratamiento que consiste en el uso de D-aspartato de sodio solo .

Ejemplo 6: *Preparación de alimento para conejos que contiene varias combinaciones de ácidos D-aspártico y L-aspártico.*

Ejemplo 6A: Preparación de alimento que contiene una combinación de 80% de ácido D-aspártico y 20% de ácido L-aspártico.

2 kg de alimento para conejos en 4 litros de agua destilada se homogeneizan en un mezclador a 60-70ºC hasta la formación de una mezcla homogénea. A continuación, se añaden 9,12 g de ácido D-aspártico y 2,28 g de ácido L-aspártico (11,4 g en total) y la mezcla se homogeneiza de nuevo para obtener una dispersión homogénea de ácidos D-aspártico y L-aspártico en el alimento amasado. Por último el agua se evapora por calentamiento en la estufa hasta que el alimento endurece de nuevo. El alimento se enfría, se corta en cubos de 5-10 g y se utiliza para alimentación animal.

De esta manera, 1 g de alimento contendrá 4,56 mg de ácido D-aspártico y 1,14 mg de ácido L-aspártico.

Ejemplo 6B: Preparación de alimento que contiene una combinación de 50% de ácido D-aspártico y 50% de ácido L-aspártico.

2 kg de alimento para conejos en 4 litros de agua destilada se homogeneizan en un mezclador a 60-70ºC hasta la formación de una mezcla homogénea. A continuación, se añaden 5,7 g de ácido D-aspártico y 5,7 g de ácido L-aspártico (11,4 g en total) y la mezcla se homogeneiza de nuevo para obtener una dispersión homogénea de ácido D-aspártico y ácido L-aspártico en el alimento amasado. Por último el agua se evapora en la estufa o por calentamiento con poco fuego hasta que el alimento endurece de nuevo. El alimento se enfría, se corta en cubos de 5-10 g y se utiliza para alimentación animal.

De esta manera, 1 g de alimento contendrá 2,85 mg de ácido D-aspártico y 2,85 mg de ácido L-aspártico.

Ejemplo 6C: Preparación de alimento que contiene una combinación de 99,5% de ácido D-aspártico y 0,05% de ácido L-aspártico.

2 kg de alimento para conejos o ratas en 4 litros de agua destilada se homogeneizan con un mezclador de cocina a 60-70ºC hasta la formación de una mezcla homogénea. A continuación, se añaden 11,43 g de ácido D-aspártico y 0,570 g de ácido L-aspártico (11,4 g en total) y la mezcla se homogeneiza de nuevo para obtener una dispersión homogénea de ácido D-aspártico y ácido L-aspártico en el alimento amasado. Por último el agua se evapora por en la estufa o por calentamiento con poco fuego hasta que el alimento endurece de nuevo. El alimento se enfría, se corta en cubos de 5-10 g y se utiliza para alimentación animal.

De esta manera, 1 g de alimento contendrá 5,67 mg de ácido D-aspártico y 0,03 mg de ácido L-aspártico.

Ejemplo 6D de referencia: Preparación de alimento que contiene sólo ácido D-aspártico o solo ácido L-aspártico

2 kg de alimento para conejos o ratas en 4 litros de agua destilada se homogeneizan con un mezclador a 60-70ºC hasta la formación de una mezcla homogénea. A continuación, se añaden 11,4 g de ácido D-aspártico o 11,4 g de ácido L-aspártico y la mezcla se homogeneiza de nuevo para obtener una dispersión homogénea de ácido D-aspártico o de ácido L-aspártico en el alimento amasado. Por último el agua se evapora por calentamiento en la estufa o con poco fuego hasta que el alimento vuelve a endurecer. El alimento se enfría, se corta en cubos de 5-10 g y se utiliza para alimentación animal.

De esta manera, 1 g de alimento contendrá 5,7 mg de ácido D-aspártico o 5,7 mg de ácido L-aspártico.

Ejemplo 7: *Estudio sobre los efectos de una combinación de 80% de ácido L-aspártico y 20% de D-aspártico en el número y la movilidad de los espermatozoides de conejo*.

El estudio se ha llevado a cabo en dos grupos de conejos. Un primer grupo compuesto por 10 conejos de 6 meses de edad (aproximadamente 5 kg de peso corporal) alimentados durante 20 días con la mezcla de alimentos que contienen la mezcla de 80% de ácido L-aspártico y 20% de ácido D-aspártico (véase anteriormente: "Ejemplo de preparación de alimento que contiene una combinación de 80% de ácido D-aspártico y 20% de ácido L-aspártico "). Un segundo grupo de 10 conejos de la misma edad que representa un grupo de referencia (o placebo) se alimentó durante 20 días con el mismo tipo de alimento preparado anteriormente, pero sin la adición de la mezcla de ácidos D-aspártico yL-aspártico. Los experimentos se han llevado a cabo en una granja de cría de conejos ("Potenza Breeders' Association", Potenza, Italia). Antes del inicio y al final del experimento se ha recogido una muestra de semen de cada conejo por estimulación con una vagina artificial (véase el artículo: "G. Macchia *et al.*, DL-aspartic acid administration improve semen quality in rabbit bucks, publicado. en "*Animal Reproduction Science*, 118, 337-343, 2010) y se ha determinado el número total de espermatozoides/ml de eyaculado y la movilidad de los mismos.

El número de espermatozoides y la movilidad progresiva rápida se determinan según las directrices de la OMS (Organización Mundial de la Salud) utilizando una cámara Makler para el recuento (Sefi Medtstl Instrument, Haifa, Israel) y en el mismo lugar se ha determinado la movilidad progresiva rápida. El semen de conejo de diluyó 1:10 en una solución isoosmótica debido a la excesiva concentración y a continuación se analizó (nota: cada conejo pesó aproximadamente 5 kg y consumió aproximadamente 200 g de alimento al día. Dado que 1 g de alimento contenía 4,56 mg de ácido D-aspártico y 1,14 mg de ácido L-aspártico resultó que en un día el conejo suponía un total de 912 mg de ácido D-aspártico y 228 mg de ácido L-aspártico).

El resultado obtenido en este estudio demostró que la ingestión de la mezcla de 80% de ácido D-aspártico y 20% de ácido L-aspártico mejoró estadísticamente el número de espermatozoides en el líquido seminal, es decir, la producción, por término medio, un 22%. Desde un valor medio de 320.000.000 espermatozoides/ml de líquido seminal para los conejos antes del tratamiento hasta un valor promedio de 358.000.000/ml después de la ingestión de la mezcla de ácidos D-aspártico y L-aspártico (Tabla 7; parte A; 1er grupo de 10 conejos). Por otra parte, en los mismos líquidos seminales de los conejos tratados, se observó también una mejora de la movilidad progresiva rápida de los espermatozoides que varía desde el 38% (este porcentaje se refiere al número de espermatozoides progresivos rápida de un número total de 100 espermatozoides observados al microscopio) hasta el 54%, ambos como valor medio, es decir un aumento de 1,42 veces con significación P <0,01 (Tabla 7, parte B, 1er grupo de conejos).

En el grupo de conejos, es decir, el grupo de referencia (o placebo), no se observó ninguna mejora estadísticamente significativa tanto del número total de espermatozoides/ml de líquido seminal (Tabla 7, parte A, 2° grupo de conejos) como de la movilidad de los mismos (Tabla 7, parte B, 2° grupo de conejos).

Tabla 7. Efecto de una mezcla consistente en 80% de ácido D-aspártico y 20% de ácido L-aspártico sobre el aumento del número y la calidad de los espermatozoides en el líquido seminal de conejo

Parte A: Efecto del número de espermatozoides en el líquido seminal

	1er grupo de conejos		2º grupo de conejos	
	Tratamiento		Referencia	
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento 80% ácido D-aspártico 20% ácido L-aspártico	Antes del tratamiento	Después del tratamiento con placebo
	320.000.000/ml de líquido seminal	390.000.000/ml de líquido seminal	310.000.000/ml de líquido seminal	315.000.000/ml de líquido seminal
% incremento		+22%		+1,6%

Parte B: Efecto sobre la cantidad de espermatozoides

	1er grupo de conejos		2º grupo de conejos	
	Tratamiento		Referencia	
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento 80% ácido D-aspártico 20% ácido L-aspártico	Antes del tratamiento	Después del tratamiento con placebo
Movilidad rápida	38%	56%	37%	38%
Incremento		+42%		+2%
Movilidad lenta	25%	27%	27%	28%
Inmóvil	37%	17%	36%	34%

Los resultados indican valores promedio para un grupo de 10 conejos adultos (6 meses de edad: aproximadamente 5 kg de peso corporal) antes del tratamiento y 20 días después de la ingestión de la mezcla de ácidos D-aspártico y L-aspártico. La cantidad de aminoácidos ingeridos diariamente por el conejo fue de 912 mg de ácido D-aspártico y 228 mg de ácido L-aspártico.

Los valores indicados en la parte A de la tabla se refieren al número medio de espermatozoides/ml de líquido seminal antes del tratamiento farmacológico y después de 20 días de tratamiento.

Los valores indicados en la parte B de la tabla se refieren a la movilidad de los espermatozoides por lo que respecta a los espermatozoides rápidos, lentos e inmóviles sobre la base de 100.

Los aumentos de número de espermatozoides y de su movilidad en los conejos tratados con la mezcla de ácidos D-aspártico y L-aspártico son todos significativos . (t de Student = P <0,01).

Ejemplo 8: *Estudio de los efectos de una combinación de 50% de ácido D-aspártico y 50% de ácido L-aspártico en el número y la movilidad de los espermatozoides de conejo.*

También este estudio se ha llevado a cabo en dos grupos de conejos de la misma edad y peso tal como se utiliza para el estudio anterior. Como diferencia en este caso al grupo de conejos tratado se administró un alimento que contenía una mezcla de 50% de ácido D-aspártico y 50% de ácido L-aspártico durante 20 días (véase la preparación anterior: "Ejemplo de preparación de alimento que contiene una combinación de 50% de ácido D-aspártico y 50% de

ácido L-aspártico "), y se utilizó como referencia un segundo grupo de 10 conejos. También en este caso el líquido seminal se ha recogido antes y después del experimento y luego se examinó el número de espermatozoides y la movilidad de los mismos.

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que usando también una mezcla que consiste en 50% de ácido D-aspártico y 50% de ácido L-aspártico se obtuvo una mejora de la producción, es decir, del número de espermatozoides en el líquido seminal y en la movilidad de los mismos (véase la tabla 8). De hecho, como se indica en la tabla 8, con este tratamiento se han obtenido un incremento de 16% del número de espermatozoides, significativo para P<0,01, y también un incremento de la movilidad de los mismos de 1,27 veces, una vez más significativo para P<0,01. En la tabla 8 se detallan los resultados obtenidos.

Tabla 8. Efecto de una mezcla consistente en 50% de ácido D-aspártico y 50% de ácido L-aspártico sobre el aumento del número y la calidad de los espermatozoides en el líquido seminal de conejo

Parte A: Efecto del número de espermatozoides en el líquido seminal

	1er grupo de conejos		2º grupo de conejos	
	Tratamiento		Referencia	
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento 50% ácido D-aspártico 50% ácido L-aspártico	Antes del tratamiento	Después del tratamiento con placebo
	305.000.000/ml de líquido seminal	355.000.000/ml de líquido seminal	310.000.000/ml de líquido seminal	308.000.000/ml de líquido seminal
% incremento		+16,4%		-0,7%

Parte B: Efecto sobre la cantidad de espermatozoides

	1er grupo de conejos		2º grupo de conejos	
	Tratamiento		Referencia	
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento con placebo
Movilidad rápida	37%	47%	37%	36,5%
Incremento		+27%		-0,2%
Movilidad lenta	26%	26%	27%	28%
Inmóvil	37%	27%	36%	34%

Los resultados indican los valores medios obtenidos para un grupo de 10 conejos adultos (6 meses de edad: aproximadamente 5 kg de peso corporal) antes y después del tratamiento de 20 días por ingestión de la mezcla de ácidos D-aspártico y L-aspártico. Las cantidades de aminoácidos administradas a conejos diariamente fue de 570 mg de ácido D-aspártico y 570 mg de ácido L-aspártico.

Los valores indicados en la parte A de la tabla se refieren al número medio de espermatozoides/ml de líquido seminal antes del tratamiento farmacológico y después de 20 días de tratamiento.

Los valores indicados en la parte B de la tabla se refieren a la movilidad de los espermatozoides por lo que respecta a los espermatozoides rápidos, lentos e inmóviles sobre la base de 100.

Los aumentos del número de espermatozoides y de la movilidad de los mismos en conejos tratados con la mezcla

de ácido D-aspártico y ácido L-aspártico son todos significativos (t de Student = P <0,01).

Para los conejos de referencia se hace referencia al mismo grupo de conejos indicado en la tabla 7.

Ejemplo 9: *Estudio sobre los efectos de una combinación de 99,5% de ácido D-aspártico y 0,05% de ácido L-aspártico en el número y la movilidad de los espermatozoides en conejos*.

También este estudio llevado a cabo en conejos se ha realizado de la misma manera que los anteriores. Como diferencia en este caso al grupo de conejos tratado se administró un alimento que contenía una mezcla de ácido D-aspártico y ácido L-aspártico en la relación 99,5: 0,05 (véase anteriormente).

Ejemplo 3: "Preparación de alimento que contiene una combinación de 99,5% de ácido D-aspártico y 0,05% de ácido L-aspártico"). También en este caso la cantidad total de D-Asp + L-Asp ingerida diariamente por conejos era aproximadamente 1,140 g.

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que también utilizando la mezcla consistente en 99,5% de ácido D-aspártico y 0,05% de ácido L-aspártico se obtuvieron una mejora de la producción del 18,6%, es decir, del número de espermatozoides en el líquido seminal y un aumento del 31% (+1,31) de movilidad rápida de los mismos (véase la tabla 9).

Tabla 9. Efecto de una mezcla consistente en 99,5% de ácido D-aspártico y 0,05% de ácido L-aspártico sobre el aumento del número y la calidad de los espermatozoides en el líquido seminal de conejo

Parte A: Efecto del número de espermatozoides en el líquido seminal

	1er grupo de conejos		2º grupo de conejos	
	Tratamiento		Referencia	
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento 99,5% ácido D-aspártico 0,05% ácido L-aspártico	Antes del tratamiento	Después del tratamiento con placebo
	295.000.000/ml de líquido seminal	350.000.000/ml de líquido seminal	310.000.000/ml de líquido seminal	315.000.000/ml de líquido seminal
% incremento		+18,6%		+1,6%

Parte B: Efecto sobre la cantidad de espermatozoides

	1er grupo de conejos		2º grupo de conejos	
	Tratamiento		Referencia	
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento 99,5% ácido D-aspártico 0,05% ácido L-aspártico	Antes del tratamiento	Después del tratamiento con placebo
Movilidad rápida	35%	46%	37%	38%
Incremento		+31%		+2%
Movilidad lenta	26%	26%	27%	28%
Inmóvil	37%	27%	36%	34%

Los resultados indican los valores medios obtenidos para un grupo de 10 conejos adultos (6 meses de edad: aproximadamente 5 kg de peso corporal) antes del tratamiento y después de la ingestión durante 20 días de la mezcla de ácido D-aspártico y ácido L-aspártico. La cantidad del aminoácido ingerido por conejo a diario ascendió a 570 mg de ácido D-aspártico y 570 mg de ácido L-aspártico.

Los valores indicados en la parte A de la tabla se refieren al número medio de espermatozoides/ml de líquido seminal antes del tratamiento farmacológico y después de 20 días de tratamiento.

Los valores indicados en la parte B de la tabla se refieren a la movilidad de los espermatozoides por lo que respecta a los espermatozoides rápidos, lentos e inmóviles sobre la base de 100.

Los aumentos del número de espermatozoides y de la movilidad de los mismos en conejos tratados con la mezcla de ácido D-aspártico y ácido L-aspártico son todos significativos. (t de Student = P <0,01)

Ejemplo 10 de referencia: *Estudio sobre los efectos del ácido L-aspártico en el número y la movilidad de los espermatozoides en conejos*.

En la bibliografía se indica que el ácido D-aspártico en los tejidos animales, incluido el hombre se encuentra en varios tejidos en alta concentración en las glándulas endocrinas: hipófisis y testículos, se sintetiza en el organismo mediante la enzima denominada D-aspartato racemasa que tiene la propiedad de sintetizar ácido D-aspártico mediante la conversión del ácido L-aspártico (Referencias 21-26 y tabla 10).

Tabla 10. Concentración de D-aspartato racemasa en varios tejidos de rata

Tejidos	D-aspartato racemasa (L-asp → D-asp (Unidades de enzima/g de tejido)
Testículos	40 U/g de tejido
Glándula pituitaria	30 U/g de tejido
Cerebro	22 U/g de tejido
Hígado	15 U/g de tejido
Riñones	8 U/g de tejido
Suero	0,2 U/g de tejido

La actividad enzimática se determina por incubación de 1 ml de mezcla de reacción consistente en L-Asp 10 mM 10 en tampón borato 0, M pH 8,0 a 37°C durante 60 min, con 1 ml de homogeneizado de tejido 1:10 en tampón borato, 0,1 M pH 8,0. Después de la incubación se ha determinado por HPLC la cantidad de ácido D-aspártico sintetizado (véase ref. 23).1 unidad enzimática se define como la cantidad de enzima adecuada para convertir 1 µmol de L-Asp en D-Asp en las condiciones de la prueba enzimática.

Dado que la racemización es una reacción de equilibrio, si por la dieta se ingiere una cantidad de ácido L-aspártico, una cantidad determinada del mismo se convertirá en ácido D-aspártico que a su vez será recogido por los testículos dando como resultado una mejora de la producción de testosterona y de la calidad del líquido seminal, por lo que respecta al número y movilidad de los espermatozoides. Basándose de este concepto los inventores han llevado a cabo un experimento en conejos similares a los de los experimentos anteriores, pero administrando un alimento que contiene ácido L-aspártico (preparado como se ha descrito anteriormente), pero usando ácido L-aspártico en lugar del ácido D-aspártico. Además en este caso la cantidad total de ácido L-aspártico ingerida diariamente por el conejo fue de aproximadamente 1,1 g.

El resultado obtenido a partir de este estudio demostró que también alimentando los conejos con alimentos que contienen ácido L-aspártico en lugar de ácido D-aspártico, se obtuvo una mejora de la producción, es decir, del número, de espermatozoides en el líquido seminal, no del mismo grado que para la mezcla D-Asp/L-Asp, pero aún significativa. En este caso los incrementos de número de espermatozoides del 14,5% y la movilidad rápida de los espermatozoides del 18% en comparación con los valores respectivos en el semen antes de haberse observado el tratamiento (véase la tabla 11)

Tabla 11. Efecto del ácido L-aspártico sobre el incremento del número y calidad de los espermatozoides en el líquido seminal de conejo

Parte A: Efecto del número de espermatozoides en el líquido seminal

	1er grupo de conejos		2º grupo de conejos	
	Tratados		Referencia	
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento con ácido L-aspártico	Antes del tratamiento	Después del tratamiento con placebo
	276.000.000/ml de líquido seminal	316.000.000/ml de líquido seminal	282.000.000/ml de líquido seminal	286.000.000/ml de líquido seminal
% incremento		+14,5%		+1,4%

Parte B: Efecto sobre la cantidad de espermatozoides

	1er grupo de conejos		2º grupo de conejos	
	Tratados		Referencia	
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento con ácido L-aspártico	Antes del tratamiento	Después del tratamiento con placebo
Movilidad rápida	35%	41%	37%	37,5%
Incremento		+17%		+1,3%
Movilidad lenta	26%	30%	27%	28%
Inmóvil	37%	29%	36%	34,5%

Los resultados indican los valores medios obtenidos en un grupo de 10 conejos adultos (6 meses de edad: aproximadamente 5 kg de peso corporal) antes del tratamiento y después de la ingestión durante 20 días de D-aspártico de la mezcla de ácido D-aspártico y ácido L-aspártico. La cantidad del aminoácido ingerido por conejo diariamente ascendió a aproximadamente 1,14 g. Los valores indicados en la parte A de la tabla se refieren al número medio de espermatozoides/ml de líquido seminal antes del tratamiento farmacológico y después de 20 días de tratamiento.

Los valores indicados en la parte B de la tabla se refieren a la movilidad de los espermatozoides por lo que respecta a los espermatozoides rápidos, lentos e inmóviles sobre la base de 100.

Los aumentos del número de espermatozoides y la movilidad de los mismos en conejos tratados con alimento que contiene ácido L-aspártico son todos significativos para la t deStudent, ($P<0,01$).

Conclusión sobre los resultados obtenidos sobre el efecto de la utilización del ácido D-aspártico y el ácido L-aspártico en la mejora del líquido seminal de conejo.

El estudio llevado a cabo en conejos sobre el efecto del ácido D-aspártico coadyuvado con L-aspártico demostró que este aminoácido además del ácido D-aspártico utilizado solo o en combinación con ácido L-aspártico, no neutralizado necesariamente por iones sodio, presenta una capacidad en la mejora de la actividad espermática en animales de experimentación que es análoga a la utilización de D-aspartato de sodio solo o en combinación con L-aspartato de sodio.

Sin embargo, es interesante señalar que cuando se utilizan D-aspartato de sodio y L-aspartato de sodio, también la

utilización de ácido D-aspártico en combinación con ácido L-aspártico en la proporción de 80% de D-aspártico y 20% de L-aspártico, es la fórmula de la dosis se presenta un mejor efecto sobre la actividad espermática (véase la comparación de la Tabla 7, 8 y 9).

Además otros estudios llevados a cabo utilizando también solamente ácido L-aspártico, han demostrado que en cualquier caso se ha obtenido una mejora de los parámetros seminales aunque no tan alta como cuando se utiliza ácido D-aspártico, se obtiene una mejora de los parámetros seminales que también son significativos (véase la tabla 11). La razón de esto, evidentemente resulta de la transformación del ácido L-aspártico en D-aspártico por la racemasa.

Ejemplo 11: Estudio sobre el hombre - Efectos de una combinación de 80% de ácido D-aspártico y 20% de ácido L-aspártico en la fecundidad masculina.

Este estudio se ha llevado a cabo a fin de saber si, además de D-aspartato/L-aspartato, también una mezcla que consiste en ácido D-aspártico en combinación con el ácido L-aspártico puede dar lugar a mejoras significativas del incremento de la hormona sexual masculina y a la mejora de líquido seminal, ya que se produce utilizando aspartato de sodio como el indicado en la primera parte de la presente patente.

El experimento se ha llevado a cabo en diez varones voluntarios de 25 a 40 años de edad seleccionados por la calidad de líquido seminal que es normal o casi normal.

El estudio implicaba la ingestión oral por las personas de la prueba de una dosis consistente en 1,6 g de ácido D-aspártico y 0,4 g de ácido L-aspártico (2,0 g total) después del almuerzo y una dosis similar después de la cena. Por lo que se refiere al porcentaje en la composición la mezcla consistía en 80% de ácido D-aspártico y 20% de ácido L-aspártico. Como procedimiento de la ingestión, la mezcla de ácido D-aspártico y L-aspártico preferiblemente se dispersó en un vaso medio lleno que contenía agua o zumo de frutas fresco o almacenado (naranja, manzana, pera, etc.), después se agitó y se ingirió.

Antes del inicio del estudio y después de 20 días de tratamiento por la mañana se ha recogido sangre de cada individuo y se ha determinado la concentración de LH (hormona luteinizante) y de testosterona en el suero obtenido de dicha sangre. Además, se ha recogido también líquido seminal de cada individuo para determinar la movilidad progresiva rápida junto con el número total de espermatozoides/ml de semen.

El líquido seminal se ha recogido por masturbación después de 3-5 días de abstinencia. El número de espermatozoides y la movilidad progresiva rápida se han determinado según las directrices de la OMS (Organización Mundial de la Salud) utilizando una cámara Makler para el recuento (Sefi Medtstl Instrument, Haifa, Israel) y en el mismo lugar se ha determinado la movilidad progresiva rápida.

El resultado obtenido de este estudio indicó que en 8 de cada 10 personas sometidas al tratamiento se produjo un aumento en el suero de las hormonas LH y testosterona (hormonas específicas que intervienen en la espermatogenia humana) para los valores antes del tratamiento y después de 20 días de tratamiento y dicho aumento fue significativo para la t de Student $p<0,01$. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 10. Como se deduce de esta tabla, el tratamiento con dos dosis diarias de ácidos D-aspártico y L-aspártico produjo un incremento medio de los valores hemáticos de LH del 34%. Desde un valor promedio de 4,1 ± 1,2 mUI/ml en los individuos en el momento cero hasta un valor medio de 5,5 ± 1,5 mUI/ml en los mismos individuos después de 20 días de tratamiento, significa un aumento del 34%. Un efecto análogo se ha observado para la testosterona. En este caso, de hecho, desde un valor medio de testosterona de 3,4 ± 0,9 mUI/ml en los individuos en el tiempo cero hasta un valor medio de 5,8 ± 1,6 mUI/ml en los mismos individuos después de 20 días de tratamiento (aumento del 70%), $p<0,01$ (Tabla 10, parte A). Además del efecto hormonal, el estudio puso de manifiesto que, como resultado del tratamiento con la mezcla de ácido D-aspártico y L-aspártico, también el número de espermatozoides del líquido seminal y la movilidad progresiva los mismos aumentaron significativamente en comparación con la referencia (Tabla 11). De hecho, como se presenta en la Tabla 10 en 9 de cada 10 individuos, el número total de espermatozoides en el líquido seminal como resultado del tratamiento se incrementa significativamente con un incremento promedio del 51,4% (Tabla 11). Es de destacar el observar también que un individuo no respondió en absoluto a la estimulación con fármacos (muestra 4 en la tabla). Evidentemente, muy probablemente, esto es resultado de la aparición en el individuo de un trastorno no metabólico, pero obstructivo de los conductos seminíferos. Además del aumento del número de espermatozoides, se ha observado también un aumento significativo de la movilidad los mismos. En efecto el fármaco también provocó una activación significativa de la movilidad progresiva de los espermatozoides. También en este caso, de hecho, todos los individuos (n. excluidos 4) presentaron una mejora significativa de la movilidad de los espermatozoides (del 67,6%) en comparación con los mismos individuos antes del tratamiento (Tabla 11).

Tabla 12. Efecto del ácido D-aspártico (80%) y del ácido L-aspártico (20%) sobre el incremento de LH y testosterona en el suero humano y en el número y la calidad de los espermatozoides en el líquido seminal humano.

Parte A

Concentración de LH y testosterona en el suero

	Antes del tratamiento	Después del tratamiento con una mezcla de 80% de D-Asp y 20% de L-Asp
LH (mUI/ml)	4,1 ± 1,2	5,5 ± 1,5
% de incremento		34%
Testosterona (ng/ml)	3,4 ± 0,9	5,8 ± 1,6
% de incremento		70%

Parte B

Número de espermatozoides en el líquido seminal

Individuos	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	% de incremento
1º	$15,3x10^6$	$19,5x10^6$	27%
2º	$8,0x10^6$	$15,4x10^6$	92%
3º	$22,0x10^6$	$38,4x10^6$	72%
4º	$4,0x10^6$	$5,0x10^6$	25%
5º	$18,0x10^6$	$23,4x10^6$	27%
6º	$35,4x10^6$	$46,5x10^6$	31%
7º	$2,5x10^6$	$6,8x10^6$	172%
8º	$24,5x10^6$	$34,7x10^6$	42%
9º	$14,2x10^6$	$19,0x10^6$	34%
10º	$35,2x10^6$	$49,0x10^6$	14%
% de incremento			+53,6% ± 47,91

Parte C

Movilidad progresiva rápida de los espermatozoides

Individuos	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	% de incremento
1º	20%	35%	75%
2º	10%	20%	100%
3º	25%	38%	52%
4º	4%	4%	0%
5º	25%	35%	40%
6º	35%	46%	31%
7º	6%	12%	100%
8º	22%	55%	150%
9º	12%	25%	108%
10º	30%	36%	20%
% de incremento			+35,6 ± 9,05

Nota: Cada valor de la movilidad se refiere a la muestra de líquido seminal del mismo individuo como se indicó en la parte B. Movilidad de los espermatozoides significa velocidad progresiva determinada sobre la base del tiempo de desplazamiento del campo ocular y se expresa en porcentaje de espermatozoides progresivos rápidos de 100

espermatozoides observados. Los incrementos medios de hormonas, el número y la movilidad de los espermatozoides son todos significativos para la t de Student; P <0,01.

Se señalan además que se han llevado a cabo otros experimentos en grupos de 10 personas utilizando las combinaciones de 50% de ácido D-aspártico y 50% de ácido L-aspártico y 99,5% de ácido D-aspártico y 0,05% de ácido L-aspártico tal como se utiliza para los experimentos en conejos. Además se han obtenido resultados estadísticamente positivos en el hombre en cuanto al aumento de las hormonas sexuales y la calidad del semen. En este caso sin embargo, la mejora de actividad fue menor a la de la combinación de 80% de ácido D-aspártico y 20% de ácido L-aspártico, pero sin embargo estadísticamente significativa. El siguiente experimento y los resultados mostrados en la tabla 13 están destinados solamente a formar parte de la descripción y no abarcan la invención reivindicada. Por último en el hombre se ha llevado a cabo el experimento con el uso de ácido L-aspártico solo en lugar de las combinaciones D-Asp/L-Asp como se ha indicado anteriormente. En este caso, las hormonas hemáticas LH y testosterona antes y después del tratamiento estaban inalteradas, pero los parámetros del líquido seminal mejoraron estadísticamente (véase la tabla 13). De hecho, como se muestra en dicha tabla, el número de espermatozoides en el líquido seminal de los individuos tratados con ácido L-aspártico aumento significativamente el 22,7% antes y después de tratamiento con ácido D-aspártico.

Tabla 13. Efecto del ácido L-aspártico sobre la calidad del líquido seminal humano.

Parte A

Número de espermatozoides en el líquido seminal

Individuos	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	% de incremento
1º	$16x10^b$	$18x10^b$	12%
2º	$5x10^6$	$8x10^6$	26%
3º	$25x10^6$	$35x10^6$	40%
4º	$5x10^6$	$6x10^6$	20%
5º	$15,0x10^6$	$20x10^6$	33%
6º	$30x10^6$	$41x10^6$	36%
7º	$2x10^6$	$3x10^6$	15%
8º	$30x10^6$	$34x10^6$	13%
9º	$45x10^6$	$51x10^6$	13%
10º	$21x10^6$	$25x10^6$	19%
% de incremento			+22,7% ± 10,41

Parte B

Movilidad progresiva rápida de los espermatozoides

Individuos	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	% de incremento
1º	18%	25%	38%
2º	15%	19%	26%
3º	24%	35%	45%
4º	12%	18%	50%
5º	32%	40%	25%
6º	35%	25%	28%
7º	16%	22%	37%
8º	19%	27%	42%
9º	25%	35%	40%
10º	31%	39%	25%
% de incremento: Media ± S.D.			+35,6% ± 9,05

Nota: Cada valor de la movilidad se refiere a la muestra de líquido seminal del mismo individuo como se indicó en la parte B. Movilidad de los espermatozoides significa velocidad progresiva, determinada sobre la base del tiempo de

desplazamiento del campo ocular y se expresa en porcentaje de espermatozoides progresivos rápidos de 100 espermatozoides observados. Los incrementos medios de hormonas, el número y la movilidad de los espermatozoides son todos significativos para la t de Student; P<0,01.

Preparación de complemento y combinación con excipientes

En cuanto a la ruta de ingestión del complemento hay que señalar que los ácidos D-aspártico y L-aspártico son ambos disolventes acuosos apenas solubles. Por lo tanto 2 gramos de la dosis sugerida (2 gramos 2 veces al día, véase anteriormente) mezclados con un vaso medio lleno de agua o jugo de fruta no se disuelven completamente. Sin embargo además si la dosis se ingiere en forma de mezcla semiinsoluble, se diluye en el estómago con líquido abundante y jugos gástricos y por lo tanto solubles y absorbibles por los intestinos. El recurso de utilizar el complemento en dos dosis, conteniendo cada una 2 g, en las dos comidas principales produce una mejor eficacia que el empleo de la dosis diaria.

En cuanto a la posibilidad de añadir excipientes (vitaminas, coenzima Q-10, sales minerales, etc.) a dicho fármaco durante la preparación comercial, la adición de una dosis adecuada de los siguientes complementos podría ser útil para la mejora de fármacos por lo que respecta a la eficiencia: óxido de cinc en cantidad de 5-10 mg/dosis de fármaco (cinc se produce en el líquido seminal y se cree que afecta positivamente a la regulación de la testosterona en la próstata). La coenzima Q-10 en una cantidad de 10-20 mg/dosis de fármaco (la coenzima Q-10 es un importante agente anti-oxidante y protege las células contra los radicales libres) y otros excipientes útiles con el fin de mejorar la aceptabilidad de fármacos como por ejemplo vitaminas, ácido fólico, etc. en las cantidades aceptadas para uso alimentario.

Bibliografía

(1(D'Aniello A. y Giuditta A. Identification of D-aspartic acid in the brain of Octopus vulgaris. *J. of Neurochemistry*. 29, 1053-1057, 1977.

(2) D'Aniello A. y Giuditta A. Presence of D-aspartate in squid axoplasm and in other regions of the cephalopod nervous system. *J. of Neurochemistry*. 31, 1107-1108, 1978.

(3) D'Aniello A. Di Cosmo A., Di Cristo C. y Fisher G. D-aspartate in the male and female reproductive system of *Octopus vulgaris* Lam. *General and Comparative Endocrinology*. 100, 69-72, 1995.

(4) D'Aniello A., Spinelli P., De Simone A., D'Aniello S., Branno B., Aniello F., Fisher G., Di Fiore MM. y Rastogi KK. Occurrence and neuroendocrine role of D-aspartic acid and NMDA in Ciona Intestinalis. *FEBS letters*. 552, 193-198, 2003.

(5) Di Fiore MM., Assisi, L., Botte, V. y D'Aniello A. D-Aspartic acid is implicated in the control of testosterone production by the vertebrate gonad. Studies on the female green frog *Rana esculenta*. *J. of Endocrinology*. 156, 199-207, 1998.

(6) D'Aniello A., Nardi G., De Santis A., Vetere A., Di Cosmo A., Marchelli R., Dossena A. y Fisher G. Free L-amino acids and D-aspartate content in the nervous system of cephalopoda. A comparative study. *Comp. Biochem. Physiol*. 112, 661-666, 1995.

(7) Raucci F., Santillo A., D'Aniello A., Chieffi P., Chieffi G. Baccari . D-Aspartate modulates trascriptional activity in harderian gland of frog, *Rana esculenta*: Morphological and Molecular Evidence. *J. of Cell. Physiol.*: 204, 445-454, 2005.

(8) Assisi L., Botte V., D'Aniello A. y Di Fiore MM. Enhancement of aromatase activity by D-aspartic acid in the ovary of lizard Podarcis sicula. *Reproduction*. 121, 803-808, 2001.

(9) Neidle A., y Dunlop DS. Developmental changes of free D-aspartic acid in the chicken embryo and in the neonatal rat. *Life Science*. 46, 1517-1522, 1990.

(10) D'Aniello A., D'Onofrio G., Pishetola M., D'Aniello G., Vetere A., Petrucelli L. y Fisher G. Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase. Effects of D-amino acids. *J. Biol. Chem.*: 268, 26941-26949, 1993.

(11) Hashimoto A., Nishikawa T., Oka T., Hayashi T. y Takahashi K. Widespread distribution of free D-aspartate in rat periphery. *FEBS Letters*. 331, 4-8, 1993.

(12) Boni R., Santillo R., Macchia G., Spinelli P., Ferrandino G. y D'Aniello A. D-aspartate and reproductive activity in sheep. *Theriogenology*. 65, 1265-1278, 2006.

(13) Dunlop DS., Neidle A., McHale D., Dunlop DM. y Lajtha A. The presence of free D-Aspartic acid in rodents and man. *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 142, 27-32, 1986.

(14) Fisher GH., D'Aniello A., Vetere A., Padula L., Cusano C, Man EH. Free D-aspartate and D-alanine in normal

and Alzheimer brain. *Brain Res. Bull.*: 26, 983-985, 1991.

(15) Hashimoto A., Kumashiro S., Nishikawa T., Oka T., Takahashi K., Mito T., Takashima S., Doi N., Mizutani Y., Kaneco T. y Ootomo E. Embryonic development and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex. *J. Neurochem*. : 61, 348-351, 1993.

(16) D'Aniello A. D-Aspartic acid: An endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. *Brain. Research Review*. 53, 215-234, 2006.

(17) D'Aniello A., Di Cosmo A., Di Cristo C, Annunziato L., Petrucelli L. y Fisher GH. Involvement of D-aspartic acid in the synthesis of testosterone in rat testes. *Life Science*. 59, 97-104, 1996.

(18) D'Aniello A., Di Fiore MM., Fisher GH., Milone A., Seleni A., D'Aniello S., Perna A. e Ingrosso D. Occurrence of D-Aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in rat neuroendocrine tissues and their role in the modulation of luteinizing hormone and growth hormone release. *FASEB J.* 14, 699-714, 2000.

(19) D'Aniello G., Tolino A., D'Aniello A., Fisher GH. y Di Fiore MM. The role of the D-aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in the regulation of prolactin release. *Endocrinology*. 141, 3862-3870, 2000.

(20) D' Aniello G., Ronsini S., Guida F., Spinelli P. y D'Aniello A. Occurrence of D-aspartic acid in human seminal plasma and spermatozoa: Possible role in reproduction. Fertility and Sterility. 84, 1444-1449, 2005.

(21) D'Aniello S, Spinelli P., Ferrandino G., Peterson G., Tsesarskia T., Fisher G. y D'Aniello A. Cephalopod vision involves dicarboxylic amino acids: D-aspartate, L-aspartate and L-glutamate. *Biochem. J*. 386, 331-340, 2005.

(22) Shibata, K., Watanabe, T., Yoshikawa, H., Abe, K., Takahashi, S., Kera, Y. y Yamada, R. H. (2003) . Purification and characterization of aspartate racemase from the bivalve mollusk Scapharca broughtonii. *Comp . Biochem. Phys . B*. 134, 307-314.

(23) D'Aniello, S., Spinelli, P., Ferrandino, G., Peterson, K., Tsesarskaja, M., Fisher, G. y D'Aniello, A. (2005). Cephalopod vision involves dicarboxylic amino acids: D-aspartate, L-aspartate and L-glutamate. *Biochem. J*. 386, 331-340.

(24) Spinelli, P., Brown, E., Ferrandino, G., Branno, M., Montarolo, P. G., Rastogi, R. K., D'Aniello, B., Chieffi, G., Fisher, G. y D'Aniello, A. (2006). D-Aspartic acid in the nervous system of Aplysia limacina: Possible role in neurotransmission. *J. Cell. Physiol.* 206, 672-681.

(25) Wolosker, H. A., D'Aniello, A., y Snyder, S. H. (2000) . D-aspartate disposition in neuronal and endocrine tissues: ontogeny, biosynthesis and release. *Neuroscience* 100, 183-189.

(26)Topo E, Soricelli A., D'Aniello A., Ronsini S., D'Aniello G. The role and molecular mechanism of D-aspartic acid in the release and synthesis of LH and testosterone in humans and rats. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 7, 120-131 (2009)

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende o que consiste en la combinación de los ácidos D-aspártico y L-aspártico o uno o más de sus correspondientes sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, estando dichos principios activos posiblemente en combinación con uno o más excipientes y/o coadyuvantes farmacéuticamente aceptables, para su utilización en el tratamiento de la esterilidad masculina.

2. Composición según la reivindicación 1 que comprende o consiste en la combinación de ácidos D-aspártico y L-aspártico o una o más de sus correspondientes sales de metales alcalinos o alcalinotérreos para su uso en el tratamiento de la esterilidad masculina, en donde la concentración de ácido D-aspártico o una de sus sales es del 50% al 99,5% y la concentración de ácido L-aspártico o una de sus sales es del 0,05% al 50%, estando referidos dichos porcentajes al peso total de ácidos D-aspártico y L-aspártico o de una de sus sales.

3. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para su uso en el tratamiento de la esterilidad masculina, en donde la concentración de ácido D-aspártico o una de sus sales es del 50% al 80% y la concentración de ácido L-aspártico o una de sus sales es del 20% al 50%, estando referidos dichos porcentajes al peso total de los ácidos D-aspártico y L-aspártico o de una de sus sales.

4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en el tratamiento de la esterilidad masculina, en donde dichos coadyuvantes se seleccionan del grupo consistente en aminoácidos, cetoácidos, vitaminas, minerales, hormonas estimulantes de la función reproductora, calicreína, antibióticos, agentes antiinflamatorios, antiandrógenos, andrógenos, pentoxifilina, gonadotropina, hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), estimuladores adrenérgicos, complementos dietéticos, antioxidantes y cetoácidos.

5. Composición según la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de la esterilidad masculina, en donde los aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en alanina, arginina, carnitina, cisteína, glutamina, glicina, leucina, lisina, isoleucina, metionina, ornitina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina y serina.

6. Composición según la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de la esterilidad masculina, en donde las vitaminas se seleccionan del grupo que consiste en vitamina A, C, D3, E, K, B1, B2, B6, B12, PP, biotina (H), ácido fólico, ácido lipoico y coenzima Q10.

7. Composición según la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de la esterilidad masculina, en donde los minerales se seleccionan del grupo que consiste en magnesio, potasio, cinc, manganeso, molibdeno, cromo, selenio, calcio, hierro, cobre, yodo, fósforo y flúor.

8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en el tratamiento de la esterilidad masculina, en donde las concentraciones de las vitaminas son variables como se indica a continuación: vitamina A de 0,0048% a 0,024%, vitamina C de 0,36% a 3,6%, vitamina D3 de 0,00003 % a 0,00015%, vitamina E de 0,06% a 0,6%, vitamina K de 0,00042% a 0,0021%, vitamina B1 de 0,0084 a 0,042%, vitamina B2 de 0,0096% a 0,048%, vitamina B6 de 0,012% a 0,06%, vitamina B12 de 6.10^{-6}% a 3.10^{-5}%, vitamina PP de 0,108% a 0,54%, biotina de 0,0009% a $4,4.10^{-5}$%, ácido fólico de 0,0012% a 0,006%, estando dichos porcentajes en % en peso referidos al peso total de la composición.

9. Composición según cada una de las reivindicaciones precedentes para su uso en el tratamiento de la esterilidad masculina, en donde las concentraciones de minerales son variables según los porcentajes siguientes: magnesio de 3,2% a 9%, potasio de 0,4% a 4%, cinc de 0,09 % a 0,45%, manganeso de 0,02% a 0,07%, molibdeno, cromo o selenio de 0,0003% a 0,002%, pantotenato de calcio de 0,04% a 0,15%, hierro de 0,084% a 0,021%, cobre de 0,02% a 0,1%, yodo de 0,0009% a 0,0045%, fósforo de 2,5% a 20%, flúor de 0,005% a 0,02%, calcio de 3,24% a 16,2%, estando dichos porcentajes en % en peso referidos al peso total de la composición.

10. Composición según cada una de las reivindicaciones precedentes para su uso en el tratamiento de la esterilidad masculina, en donde la concentración de aminoácidos, además de los ácidos D-aspártico y L-aspártico es desde el 0,6% en peso hasta el 10% en peso referido al peso total de la composición.

11. Composición según cada una de las reivindicaciones precedentes para su uso en el tratamiento de la esterilidad masculina, en donde dicha composición comprende además ácido fólico, vitamina B6, vitamina B12 y conservantes sorbato de potasio y benzoato de sodio.

12. Composición según la reivindicación 15 para su uso en el tratamiento de la esterilidad masculina, en donde la concentración de ácido fólico es de 0,002% a 0,006%, la concentración de vitamina B6 es de 0,02% a 0,06%, la concentración de vitamina B12 es de 1.10^{-5}% a 3.10^{-5}%, la concentración de sorbato de potasio es de 0,02 a 0,008%, la concentración de benzoato de sodio es 0,002 a 0,008%.

13. Composición según cada una de las reivindicaciones precedentes para su uso en el tratamiento de la esterilidad masculina, en donde la esterilidad masculina no es la esterilidad masculina obstructiva caracterizada por oligo y/o astenozoospermia con o sin hipogonadismo hipogonadótropo.

14. Composición según cada una de las reivindicaciones precedentes para su uso en el tratamiento de la esterilidad masculina, en donde la dosis diaria de dicha composición es de 0,001 g/día a 10 g/día.

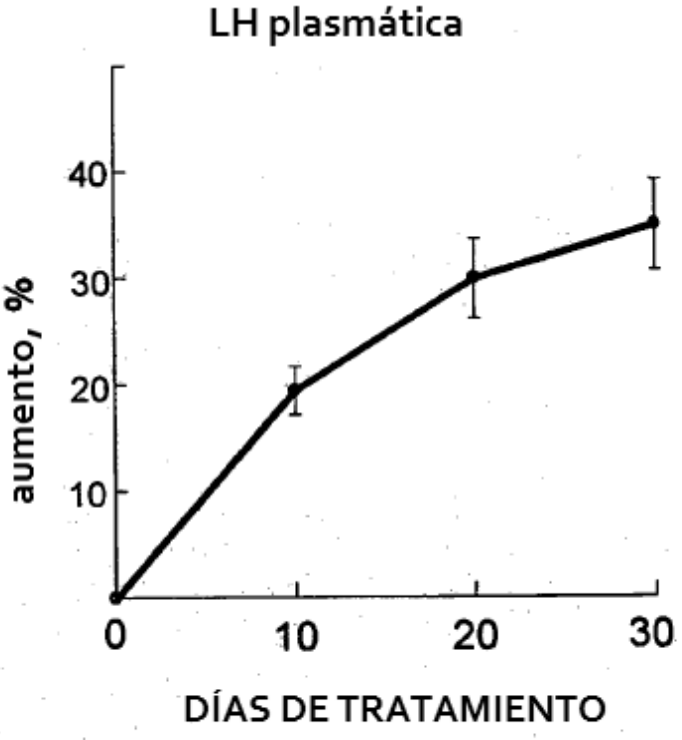
LH plasmática
aumento, %
40
30
20
10
0
10
20
30
DÍAS DE TRATAMIENTO

Fig.1

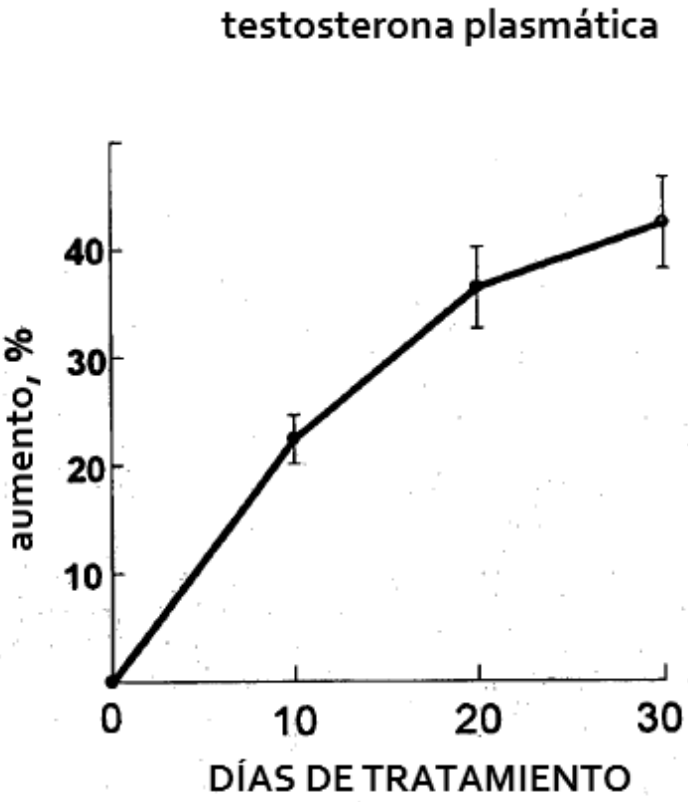
testosterona plasmática
aumento, %
40
30
20
10
0
10
20
30
DÍAS DE TRATAMIENTO

Fig.2

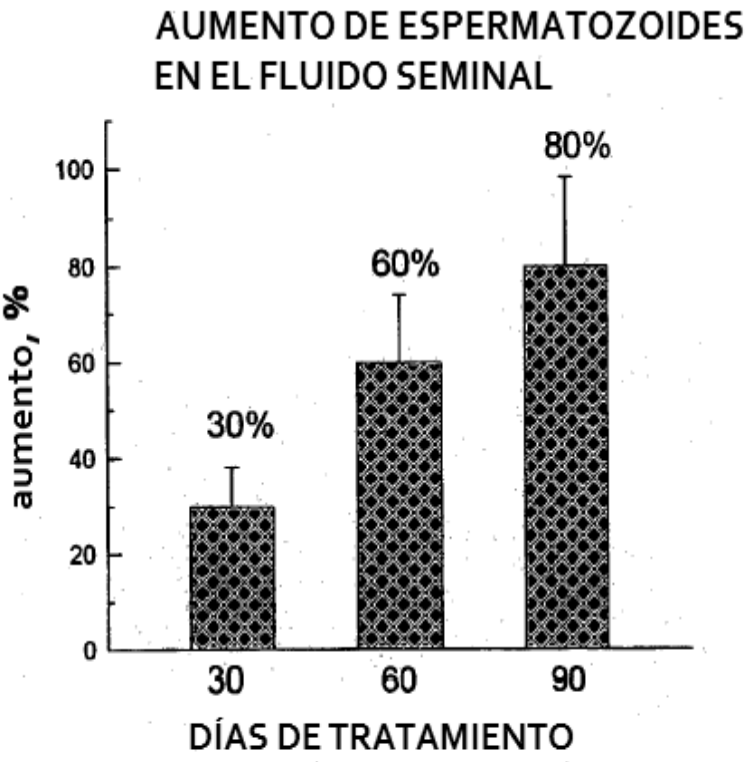
AUMENTO DE ESPERMATOZOIDES
EN EL FLUIDO SEMINAL
aumento, %
100
80
60
40
20
0
30%
60%
80%
30
60
90
DÍAS DE TRATAMIENTO

Fig.3

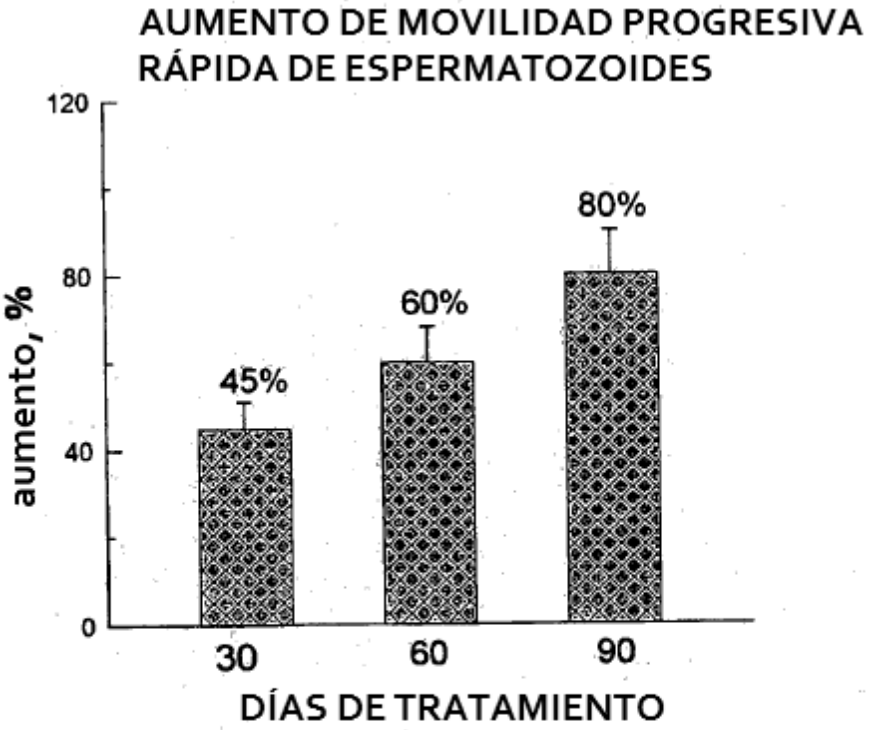
AUMENTO DE MOVILIDAD PROGRESIVA
RÁPIDA DE ESPERMATOZOIDES
120
80
40
0
aumento, %
45%
60%
80%
30
60
90
DÍAS DE TRATAMIENTO

Fig.4

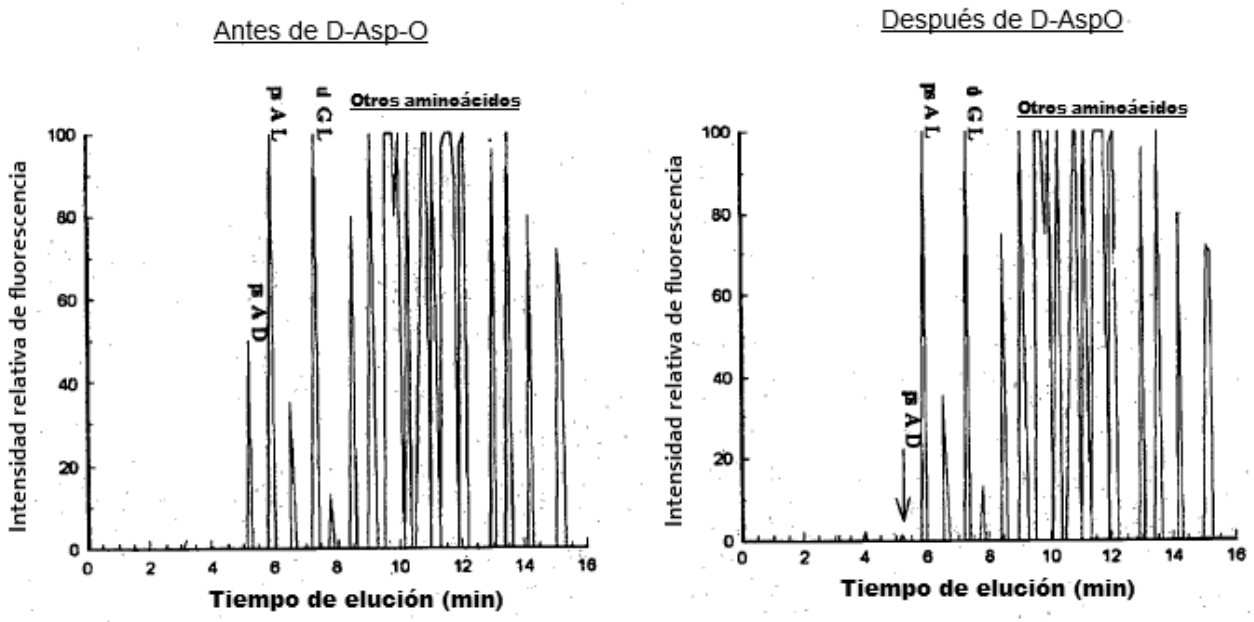
Antes de D-Asp-O
Intensidad relativa de fluorescencia
Tiempo de elución (min)
Otros aminoácidos
D-Asp
D-Val
D-Glu
Después de D-AspO
Intensidad relativa de fluorescencia
Tiempo de elución (min)
Otros aminoácidos
D-Asp
D-Val
D-Glu

Fig.5