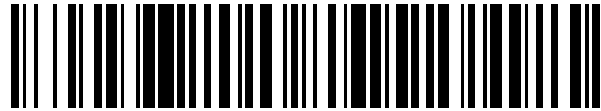


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 040**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2012 E 12780679 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2764361**

54 Título: **Prueba diagnóstica que comprende inositol para la evaluación de la capacidad de fertilización de los espermatozoides humanos**

30 Prioridad:

**04.10.2011 IT FI20110212**

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

**12.01.2016**

73 Titular/es:

**LO. LI. PHARMA S.R.L. (100.0%)  
Via dei Luxardo 33  
00156 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**UNFER, VITTORIO**

74 Agente/Representante:

**RUO, Alessandro**

**ES 2 556 040 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Prueba diagnóstica que comprende inositol para la evaluación de la capacidad de fertilización de los espermatozoides humanos

5

**Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere al campo de pruebas diagnósticas y, en particular, de las pruebas predictivas de la capacidad de fertilización de los espermatozoides humanos.

10

**Estado de la técnica**

[0002] Se ha estimado que la infertilidad afecta a aproximadamente 80 millones de personas en todo el mundo y que al menos un par de cada diez padece infertilidad primaria (sin hijos) o secundaria (con hijos).

15

[0003] Las causas de la infertilidad se deben tanto a trastornos tales como patologías del aparato reproductor masculino o femenino, que se amplifican si están presentes en los dos componentes de la pareja, y a factores ambientales y a estilos de vida que afectan a la salud reproductora. La disminución de la concentración de espermatozoides que se observa en la población masculina de todo el mundo estaba relacionada con el aumento de la liberación en el medio ambiente de sustancias contaminantes, como xeno-estrógenos y metales pesados. Adicionalmente, en los países industrializados, las condiciones sociales que han cambiado y el relativo bienestar impulsan a las nuevas parejas a someterse a un ciclo de reproducción a una edad cada vez más avanzada.

20

[0004] Si bien, desde un punto de vista biológico, el período de máxima fertilidad en las mujeres es de aproximadamente a los 20 años de edad, el transcurso de la formación y la consolidación de la carrera, a menudo llevan a las mujeres a buscar el embarazo a una edad de entre aproximadamente 33 - 35 años, una edad a la que el potencial reproductor ya está en franco declive. Por lo tanto, incluso en ausencia de disfunciones reproductoras específicas, solo el desplazamiento temporal de buscar el embarazo suele ser suficiente para amplificar las causas de subfertilidad que ya pueden estar presentes dentro de la pareja.

25

30

[0005] *In vivo*, se observó una reducción drástica en el número de espermatozoides después de la eyaculación en la vagina. De hecho, muchos permanecen atrapados dentro del coágulo que se forma en la vagina y solo aquellos con una motilidad progresiva, rápida, pueden atravesar el canal cervical, el útero y alcanzar, por tanto, la unión útero-tubárica, que, debido a su estrecho diámetro, es otra barrera natural para el ascenso de los espermatozoides en el oviducto. La última etapa en la selección representada por la zona pelúcida (capa del huevo), que permitirá penetrar a un solo espermatozoide en el ovocito, la más competente para la fertilización. La trompa almacena los espermatozoides y mantiene la capacidad de fertilización gracias a la adhesión y a la capacitación que modula este acontecimiento.

35

40

[0006] En los últimos 30 años, la investigación en el campo de la biología reproductiva ha proporcionado conocimientos fundamentales para la comprensión de los mecanismos que están en la base de la maduración de los gametos, la fecundación y el desarrollo embrionario. Este conocimiento sentó la base para el desarrollo de las biotecnologías que ahora se aplican a la procreación médicamente asistida.

45

[0007] El rendimiento de las técnicas de reproducción asistida, estrechamente vinculadas desde el punto de vista médico, con el número y con la calidad de los cigotos obtenidos, que depende de la calidad de los gametos utilizados para la fertilización.

50

[0008] Hoy en día, los criterios de diagnóstico que se utilizan para evaluar si un paciente con capacidad de espermatozoides normal se basan principalmente en el volumen del semen, el número total y la concentración de los espermatozoides, la motilidad total, la morfología de los espermatozoides y la viscosidad con preferencia siempre para el número total de espermatozoides (véase, por ejemplo, Bedaiwy et al. 2003).

55

[0009] Los datos en la bibliografía han demostrado que, en el plasma seminal existen concentraciones altas de mioinositol; además, su papel en la homeostasis del calcio, es crucial en el mantenimiento de un metabolismo mitocondrial eficiente.

60

[0010] En la solicitud de patente italiana publicada RM2010A000300, en nombre del mismo solicitante, se presenta el inositol, solo o en combinación con otras sustancias, que permite mejorar las cualidades de los espermatozoides *in vitro*.

65

[0011] Sin embargo, a pesar de las evidentes ventajas que ofrece la solución propuesta en la solicitud mencionada anteriormente, todavía no es posible tener una prueba predictiva que permita evaluar la capacidad de fertilización de los espermatozoides, la oportunidad de someter a los espermatozoides a tratamiento con inositol como se ha mencionado anteriormente y los métodos relacionados, y el porcentaje de éxito del tratamiento.

**Sumario de la invención**

5 [0012] Se describe una prueba diagnóstica en la que se utiliza inositol que permite evaluar la capacidad de fertilización de los espermatozoides humanos y el establecimiento de una terapia específica para el paciente en caso de que sea necesario aumentar la viabilidad de los espermatozoides.

**Descripción detallada de la invención**

10 [0013] Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que el inositol, posiblemente en combinación con otras sustancias, se puede utilizar en pruebas predictivas de la capacidad de concepción y, además, en pruebas predictivas del éxito de un tratamiento con inositol de los espermatozoides para aumentar su vitalidad.

[0014] En particular, se puede utilizar inositol en combinación con antioxidantes, medios de cultivo, o tampones.

15 [0015] De acuerdo con la presente invención, la prueba se realiza en muestras de semen obtenido de donantes humanos de acuerdo con las directrices de la OMS y se permite licuar durante un tiempo necesario (normalmente 10' - 20'); después:

- se mide la motilidad de los espermatozoides sobre una parte alícuota de dicha muestra;
- 20 – se añade inositol a la muestra, mediante la incubación durante el tiempo requerido (típicamente 20' - 40');
- se obtiene una muestra de la parte alícuota de la solución que contiene inositol y se mide la motilidad de los espermatozoides;

25 [0016] La diferencia en el número de espermatozoides con motilidad progresiva antes y después del tratamiento permite calcular el porcentaje de incremento de los espermatozoides con motilidad progresiva debido al tratamiento con inositol y, por lo tanto, establecer la siguiente clasificación del semen:

- Respondedores bajos, cuando la tasa de aumento en el número de espermatozoides con motilidad progresiva está entre 0 y 30 %;
- 30 Respondedores medios cuando la tasa de aumento en el número de espermatozoides con motilidad progresiva está entre 31 y 60 %;
- Respondedores altos, cuando la tasa de aumento en el número de espermatozoides con motilidad progresiva está entre 61 y 100 % (o mayor).

35 [0017] En particular, de acuerdo con la invención, el inositol se utiliza a una concentración final comprendida entre 1 - 50 mg / ml, preferiblemente 0,5 - 10 mg / ml.

40 [0018] Por inositol, se entiende uno de los nueve estereoisómeros diferentes: mio-inositol, D-qui-ro-inositol, L-qui-ro-inositol, escilo-inositol, muco-inositol, neo-inositol, alo-inositol, epi-inositol y cis-inositol; de acuerdo con una realización particular de la invención, el inositol utilizado es mio-inositol.

**Ejemplo 1:**

45 [0019] La muestra formada por el semen obtenido de donantes se dejó licuar durante 15 minutos y, después de agitarla (para evitar que los espermatozoides sedimenten), se toman dos alícuotas de 10 µl y se procede al recuento, que se realiza utilizando un portaobjetos y un cubreobjetos.

[0020] El volumen de semen y el tamaño del cubreobjetos deben normalizarse, por lo que el análisis se lleva a cabo en una preparación con una profundidad fija de 20 µm que permite que los espermatozoides se muevan libremente.

50 [0021] Después, la suspensión de 10 µl se coloca, se obtienen muestras como se ha mencionado anteriormente de la muestra resuspendida, sobre un portaobjetos y se cubre con un cubreobjetos de 22 mm x 22 mm para crear una cámara de aproximadamente 20 µm de profundidad. El peso del cubreobjetos extenderá la muestra.

55 [0022] Para cada parte alícuota, el portaobjetos examina con un microscopio de contraste de fase con un aumento de x200 o x400.

[0023] Aproximadamente se evalúan 200 espermatozoides por duplicado con el fin de definir los porcentajes de las diferentes categorías de la motilidad.

60 [0024] Las dos partes alícuotas utilizadas en el ejemplo tenían de media un número de espermatozoides móviles igual a 60.

65 [0025] A 0,5 ml de la muestra de partida se añade mio-inositol hasta una concentración final de 2 mg / ml y se deja incubar a 37 °C durante 30 minutos.

[0026] Se obtienen muestras de dos alícuotas de 10 µl y se procede con un nuevo recuento de espermatozoides móviles de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

5 [0027] Las dos alícuotas de muestra tenían, de media, un número de espermatozoides móviles igual a 90. En este ejemplo a continuación, en vista de que:

10 El número de espermatozoides móviles después del tratamiento con mio-inositol (90), menos el número de espermatozoides móviles antes del tratamiento con mio-inositol (60), da 30, es decir, 50 % más que los datos de partida, el semen se clasifica como respondedor medio de acuerdo con la clasificación establecida anteriormente.

[0028] Para validar la prueba, se reclutó a 50 varones cuyo semen se analizó dos veces al mes durante tres meses como se describe en el Ejemplo 1.

15 [0029] Solo se reclutaron voluntarios cuyo esperma tenía valores límite con respecto a los criterios de la OMS, pero aún así definibles como capacidad normal de espermatozoides.

20 [0030] Además, se pidió a los voluntarios reclutados que no realizaran ningún tratamiento destinado a mejorar la calidad del semen.

[0031] Mediante la ejecución de la prueba diagnóstico con mio-inositol como se ha descrito anteriormente, se identificaron tres clases de pacientes que diferían en la entidad de la respuesta: bajos, medios, altos.

25 [0032] Por tanto, los voluntarios considerados fueron respondedores bajos (n = 11) y respondedores altos (n = 15).

[0033] Después de un año de relaciones sexuales sin protección, se vio cómo: Los clasificados como respondedores altos no habían podido concebir (0 de 15), mientras que los voluntarios clasificados como respondedores bajos pudieron conseguir un embarazo (8 de 11).

30 [0034] Por lo tanto, se ha demostrado que la prueba de acuerdo con la invención puede predecir la probabilidad de fertilización de los espermatozoides.

35 [0035] Una ventaja adicional de la prueba descrita es que permite, en base al resultado obtenido, establecer una terapia específica para el paciente en caso de que sea necesario aumentar la vitalidad de los espermatozoides, por ejemplo, mediante la aplicación de un tratamiento como se describe en la solicitud de patente italiana publicada RM2010A000300, mencionada anteriormente.

40 [0036] De hecho, por ejemplo, para un paciente sano que está clasificado como respondedor bajo se puede decidir usar solo la terapia oral o *in vitro*, mientras que para los respondedores medios y altos se puede decidir combinar las terapias.

**REIVINDICACIONES**

1. Pruebas para la predicción de la capacidad de concepción de los espermatozoides humanos, en las que:
- 5           – se recogen y se licuan muestras de esperma:  
          – se mide la motilidad de los espermatozoides  
          – se añade inositol a la muestra y se incuba durante un tiempo necesario;  
          – se vuelve a medir la motilidad de los espermatozoides después del tratamiento con inositol;  
          – se calcula el incremento en la motilidad de los espermatozoides.
- 10       **2.** Prueba de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el inositol tiene una concentración final de 1 - 50 mg / ml, preferiblemente 0,5 - 10 mg / ml.
- 15       **3.** Prueba de acuerdo con las reivindicaciones 1 – 2, en la que el inositol es uno de los nueve estereoisómeros diferentes: mio–inositol, D–quiro–inositol; L–quiro–inositol, escilo–inositol, muco–inositol, neo–inositol, alo–inositol, epi–inositol y cis–inositol.
- 20       **4.** Prueba de acuerdo con las reivindicaciones 1 – 3, en la que dicha prueba se utiliza para predecir el éxito de un tratamiento de espermatozoides humanos con inositol para aumentar su vitalidad.
- 5.** Uso de inositol en una prueba predictiva para la evaluación de la capacidad de concepción de espermatozoides humanos.
- 25       **6.** Uso de inositol en una prueba predictiva para la evaluación del éxito de un tratamiento de espermatozoides humanos con inositol para aumentar su vitalidad.