

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 150**

51 Int. Cl.:

A61P 15/08 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 31/4045 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2013 PCT/EP2013/073182**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072350**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2013 E 13788967 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2916914**

54 Título: **N-acetil-L-cisteína para su uso en la fertilización in vitro**

30 Prioridad:

09.11.2012 SE 1251274

09.11.2012 US 201261724573 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.03.2017

73 Titular/es:

IASOMAI AB (100.0%)
Torsvikssvängen 20
181 34 Lidingö, SE

72 Inventor/es:

LUNDEBERG, THOMAS;
PARASASSI, TIZIANA;
PITTALUGA, EUGENIA y
BRUNELLI, ROBERTO

74 Agente/Representante:

GARCÍA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro

ES 2 607 150 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

5 N-acetil-L-cisteína para su uso en la fertilización in vitro

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere al nuevo uso de N-acetil-L-cisteína en la fecundación in vitro

ANTECEDENTES

15 La fecundación in vitro (FIV) es un proceso mediante el cual un óvulo es fertilizado por espermatozoides fuera del cuerpo. La FIV in vitro es un tratamiento importante para la infertilidad cuando otros métodos de la tecnología de la reproducción asistida han fracasado. El procedimiento consiste en supervisar el proceso ovulatorio de una mujer, extrayendo el óvulo o los óvulos de los ovarios de la mujer y dejando que los espermatozoides los fertilicen en un medio fluido en un laboratorio. Cuando se supervisa el ciclo natural de una mujer para recolectar un óvulo (óvulo) naturalmente seleccionado para la fertilización, se conoce como ciclo natural FIV. El óvulo fecundado (cigoto) se transfiere entonces al útero de la paciente con la intención de alcanzar un embarazo exitoso. El primer nacimiento exitoso de un "bebé probeta", Louise Brown, ocurrió en 1978. Louise Brown nació como resultado del ciclo natural FIV. Robert G. Edwards, fisiólogo que desarrolló el tratamiento, recibió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2010. (S K Kalra et al. Fertility and Sterility Vol 95, no 6 p 1888-1889. In vitro fertilization and adverse Childhood outcomes: what we know, where we are going, and how we will get there. A glimpse into what lies behind and beckons ahead. B Almog et al. Fertility and Sterility Vol 94, No 6 p 2026-2028. Promoting implantation by local injury to the endometrium).

30 A pesar de los grandes avances en la tecnología de la reproducción asistida durante los últimos 25 años, la efectividad global incluso de los tratamientos más avanzados como la FIV/transferencia de embriones (FIV/TE) es relativamente baja, con un promedio de 20-30% de nacimientos vivos por ciclo de tratamiento (Nyboe-Andersen et al., Hum Reprod. 2009;24(6):1267-87).

35 La transferencia de embriones es un factor independiente que afecta al resultado del tratamiento. Entre los factores determinantes del éxito de la transferencia embrionaria se encuentran la calidad del (los) embrión(es), la receptividad uterina y la calidad del medio intrauterino (Cavagna and Mantese, Placenta. 2003; 24 Suppl B:S39-47).

40 Las contracciones uterinas constituyen los componentes más fundamentales de la receptividad uterina. La actividad contráctil del útero juega un papel importante en la implantación del embrión. Las contracciones uterinas excesivas pueden disminuir las tasas de implantación en los ciclos de FIV, ya que la actividad contráctil podría expulsar a los embriones del útero (Fanchin et al., Hum Reprod, 1998;13:1968-74). Hasta la fecha, no se ha demostrado que las estrategias de tratamiento para reducir las contracciones uterinas antes de la transferencia de los embriones, tales como el uso de agonistas beta o fármacos antiinflamatorios no esteroideos, proporcionen un beneficio suficiente; Moon et al., Fertil Steril 2004;82:816-20; Tsigotis et al. Human Reproduction and Embryology,, 25-28 de junio de 2000; Bolonia, Italia).

45 Los ciclos de tratamiento inducen un aumento abundante en las concentraciones de estradiol que son de alrededor de 10-20 nmol/l al final de la estimulación ovárica en comparación con menos de 2 nmol/l antes de la ovulación en el ciclo natural. Se supone que las concentraciones suprafisiológicas de estradiol inducen la producción local (endometrial) de oxitocina, la formación de receptores de oxitocina e, indirectamente, la formación /liberación de PGF2a que es de hecho similar al estado de parto. Además, tanto la oxitocina como la vasopresina están implicadas en la inducción y el mantenimiento de las contracciones uterinas durante el parto.

50 Se ha demostrado que la actividad contráctil uterina en los ciclos de FIV se incrementa aproximadamente 6 veces cuando se mide antes de la transferencia de embriones en comparación con la situación anterior a la ovulación en el ciclo natural. Las contracciones uterinas juegan un papel importante en la reproducción humana, estando implicadas en la transferencia rápida y focalizada de los espermatozoides y en la alta implantación de embriones en el fondo uterino.

60 En los tratamientos de FIV/TE, se observa una disminución progresiva de las contracciones uterinas después de la recogida de los óvulos, alcanzando casi un estado quiescente en el momento de la transferencia del blastocisto (5-6 días después de la recogida del óvulo) (Fanchin et al., Fertil Steril 2001;75:1136-40). Se cree que esta disminución de la actividad contráctil aumenta las tasas más altas de implantación conseguidas con las transferencias de

blastocistos. Sin embargo, la mayoría de los embriones siguen siendo transferidos al día 2 o 3 después de la fecundación, durante períodos de actividad contráctil uterina notable.

Se espera que el procedimiento de transferencia de embriones incremente por sí mismo la liberación local de oxitocina y prostaglandinas. Cualquier manipulación adicional de la vagina o cuello uterino, tal como el uso de un tenáculo, proporciona un estímulo adicional para la liberación de oxitocina/prostaglandina (Dorn et al. 1999), que se combina con aumentos en las contracciones uterinas). Mansour et al. demostraron que, en más de la mitad de las pacientes que tenían una transferencia simulada de embriones con colorante azul de metileno, se vio que el colorante se transportó a la vagina después del procedimiento (Mansour et al., Hum Reprod 1994;9:1257-9). También se demostró que menos del 50% de los embriones transferidos permanecieron en el útero 1 h después de la transferencia y alrededor del 15% de los embriones se pudieron encontrar en la vagina después de la transferencia del embrión (Poindexter et al. Fertil Steril, 1986;46:262-7).

Teniendo en cuenta lo anterior, se ha sugerido que la actividad contráctil uterina en el momento de la transferencia de embriones y, en especial, las contracciones fundo-cervicales podrían expulsar los embriones del útero. Fanchin et al. Human Reprod 1998;13:1968-74, han estimado que aproximadamente el 30% de las pacientes sometidos a transferencia embrionaria tienen contracciones uterinas pronunciadas. En ese grupo, las tasas de éxito del tratamiento FIV/TE fueron hasta tres veces menos comparadas con la población de pacientes con útero "silencioso" (16% versus 53% de los embarazos clínicos). La diferencia fue independiente de la dirección de las contracciones uterinas observadas durante las evaluaciones. Esto podría implicar que la inhibición farmacológica del aumento de las contracciones en el momento de la transferencia de embriones podría ser un objetivo atractivo para un tratamiento potencial. Interferir con los sistemas PGF2a/oxitocina y posiblemente mejorar la perfusión endometrial podría ser un mecanismo por el cual las contracciones uterinas disminuirían y la receptividad uterina mejoraría.

La efectividad de la fertilización in vitro-transferencia de embriones (FIV-TE) por lo general no supera el 30% por ciclo de tratamiento (Nyboe Andersen A, Gianaroli L, Felberbaum R, de Mouzon J, Nygren K. Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE. Hum Reprod 2005;20:1158-76) y se reduce aún más en las mujeres mayores de 36 años. (Stolwijk A, Wetzels A, Braat D. Cumulative probability of achieving an ongoing pregnancy after in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection according to a woman's age, subfertility diagnosis and primary or secondary subfertility. Hum Reprod 2000;15:203-9).

La buena calidad de embriones y un ambiente intrauterino óptimo son los determinantes básicos del éxito de la TE, y de todo el procedimiento FIV-TE. Las condiciones intrauterinas ideales que permiten la implantación incluyen un estado endometrial apropiado, suficiente perfusión endometrial y ausencia de contracciones uterinas excesivas. En particular, el aumento de la actividad contráctil uterina puede expulsar los embriones del útero. (Mansour R, Aboulghar MA, Serour GI, Amin YM. Dummy embryo transfer using methylene blue dye. Hum Reprod 1994;9:1257-9) (Poindexter A, Thompson D, Gibbons W. Residual embryos in failed embryo transfer. Fertil Steril 1986;46:262-7)

Las tasas de implantación y embarazo están inversamente correlacionadas con la frecuencia de las contracciones uterinas y la síntesis de prostaglandinas (síntesis PG). En alrededor de un tercio de las pacientes se observa una alta actividad contráctil uterina en TE (cinco o más contracciones por minuto), y en estas mujeres las tasas de embarazo clínico alcanzan el 13% por ciclo, en contraste con el 53% de embarazos exitosos en mujeres con menor actividad uterina (tres o menos contracciones por minuto) (Fanchin R, Righini C, Olivennes F, Taylor S, de Ziegler D, Frydman R. Uterine contractions at the time of embryo transfer alter pregnancy rates after in-vitro fertilization. Hum Reprod 1998;13:1968-74.) Además, la irritación del cuello uterino por el catéter TE es probable que induzca síntesis adicional de PG y reflejos contráctiles, disminuyendo aún más las posibilidades de implantación exitosa de embriones (Lesny P, Killick S, Tetlow R, Robinson J, Maguiness S. Embryo transfer-can we learn anything new from the observation of junctional zone contractions? Hum Reprod 1998;13:1540-6.)

Sin embargo, la actividad contráctil uterina, un componente importante de la receptividad uterina, no es actualmente materia de diagnóstico o tratamiento específico en receptores de TE. La suplementación con progesterona, incluso cuando actúa sobre la receptividad uterina, mejorando el estado endometrial y disminuyendo las contracciones uterinas, no muestra beneficios para las tasas de embarazo después de la FIV-TE. (Fanchin R, Righini C, de Ziegler D, Olivennes F, Ledee N, Frydman R. Effects of vaginal progesterone administration on uterine contractility at the time of embryo transfer. Fertil Steril 2001;75:1136-40.)

Los estudios que evaluaron la eficacia de piroxicam (inhibidor de la ciclooxigenasa) y ritodrina (agonista de β_2 -adrenorreceptor) han mostrado un efecto positivo en las tasas de embarazo. (Moon H, Park S, Lee J, Kim K, Joo B. Treatment with piroxicam before embryo transfer increases the pregnancy rate after in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil Steril 2004;82:816-20 ; Tsirigotis M, Pelekanos M, Gilhespie S, Gregorakis S, Pistofidis G. Ritodrine use during the peri-implantation period reduces uterine contractility and improves implantation and pregnancy rates post-implantation. Presentado en la decimosexta reunión anual de la Sociedad Europea de Reproducción Humana

y Embriología; 25-28 de Junio, 2000; Bolonia, Italia). Los fármacos mencionados anteriormente no se han incorporado al uso clínico rutinario debido a cuestiones de seguridad.

Recientemente, Moraloglu et al. Treatment with oxytocin antagonists before embryo transfer may increase implantation rates after IVF. *Biomedicina Reproductiva* en línea 09/2010;21(3):338-43 informaron de un ensayo aleatorizado, controlado con placebo, con un total i.v. dosis de 37,5 mg de atosiban (antagonista de oxitocina) infundido antes y hasta 2 h después de la transferencia de embriones en 160 pacientes. Los autores observaron una mejora significativa tanto en las tasas de implantación como en los embarazos clínicos. Las tasas de implantación por embrión transferido fueron 20,4% frente a 12,6% y las tasas de embarazo clínico por ciclo fueron 46,7% frente a 28,9% (atosibán versus placebo). Menos abortos tempranos se observaron en el grupo de estudio (16,7% versus 24,4%, atosibán versus placebo).

La N-acetil-L-cisteína (denominada en lo sucesivo NAC) es un fármaco bien conocido, que se ha usado principalmente como agente mucolítico y en el tratamiento de la intoxicación por paracetamol. En los últimos años también se ha reconocido que tiene otras propiedades beneficiosas, tales como ser anti-inflamatorio y anti-proliferativo, y ha sido sugerido para el tratamiento de una variedad de diferentes trastornos y síntomas, además de la endometriosis también la esquizofrenia, la diabetes y el cáncer.

Hasta la fecha, la NAC no se ha considerado un fármaco en el tratamiento de fertilidad aunque se ha usado para el tratamiento oral de la endometriosis como se describe en el documento EP 2305238. En ese estudio no se formularon conclusiones sobre los embarazos. Al contrario, cuando se trataba la endometriosis, no se esperaba que pudieran ocurrir embarazos. Aunque no se ha revelado antes, al analizar los datos los inventores se dieron cuenta de que una persona que había tomado NAC oralmente para la endometriosis experimentó un tratamiento exitoso de FIV. También, que dos ensayos de FIV anteriores habían fracasado y resultaron en un aborto. Esta fue una de las razones por las que los presentes inventores comenzaron a investigar si la NAC se podría utilizar en relación con la FIV.

De hecho, en ratones, se confirmó que la NAC fomentaba la implantación de embriones. En el modelo animal, la tasa de implantación de embriones disminuyó cuando se administró oxitocina a los ratones. La NAC, en función de la dosis, restauró las tasas de implantación en los ratones tratados con oxitocina, lo que proporcionó evidencia de la participación de la oxitocina en la implantación del embrión.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Antecedentes de la técnica, que describen el efecto molecular de la NAC en el tratamiento del cáncer, incluyen: T. Parasassi, et al. *Cell Death and Differentiation* (2005), Vol. 12, No. 10, páginas 1285-1296; E. K. Krasnowska et al. *Free Radicals Biology and Medicine* 2008, 45(11):1566-72; A. C. Gustafsson et al. *BMC Cancer* (2005), 5:75. La NAC en el tratamiento de la endometriosis se describe en Pittaluga et al. More than an antioxidant: N-acetyl-L-Cysteine in a murine model of endometriosis. *Fertil & Steril* 2010;94(7):2905-8. Además, C.H. Kim et al. (Resúmenes de la vigésimosegunda reunión anual de la SERHE, Praga, República Checa, 18-21 de Junio 2006, P-463) describen el tratamiento con N-acetil-cisteína para mejorar la sensibilidad a la insulina. El documento WO2006116034 se refiere al uso de amida de N-acetil-cisteína como medio de cultivo para oocitos y embriones tempranos, pero también administrada a un mamífero en un rango de dosis oral de 25-500 mg.

El documento WO2007003007 describe el uso de un agente antioxidante, del cual se proporciona NAC de entre una lista, para mejorar el resultado del embarazo. No se proporciona ninguna divulgación con respecto a la dosificación.

En EP 12710062.6 se describen formulaciones que contienen N-acetil-L-cisteína (NAC) como tal o junto con (ii) selenio en forma de selenometionina y/o (iii) melatonina y/o sales de la misma fisiológicamente aceptables. Tales formulaciones pueden usarse también para el tratamiento de FIV.

OBJETOS DE LA INVENCION

Ya desde el inicio de la FIV ha sido un problema que el resultado clínico en el tratamiento de FIV sea bajo. Como el costo de la FIV es alto y el tratamiento normalmente sólo ofrece 20-30% de nacidos vivos por ciclo de tratamiento, muchos tratamientos diferentes han sido probados con el fin de alcanzar un mayor porcentaje de nacidos vivos. Ahora se ha descubierto inesperadamente que la administración de NAC preferiblemente unos días antes del tratamiento de FIV proporciona un mayor porcentaje de nacidos vivos. Además, en los casos en que muchos tratamientos anteriores de FIV no habían tenido éxito, la administración previa de NAC en relación con un nuevo tratamiento de FIV ha dado lugar a nacidos vivos.

El resultado clínico del tratamiento con NAC en la fecundación in vitro (FIV), tal como se define en las reivindicaciones de la presente solicitud no ha sido determinado en el estado de la técnica, hasta donde alcanza el

conocimiento de los inventores, no habiéndose tampoco propuesto un régimen de dosificación eficaz para el tratamiento de FIV o el uso de la NAC para el tratamiento de las indicaciones asociadas con FIV.

- 5 Por lo tanto, el objeto general de la presente invención es proporcionar una solución al problema de proporcionar una composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína (NAC) para el tratamiento de FIV e indicaciones asociadas con FIV en seres humanos y mamíferos.

RESUMEN DE LA INVENCION

- 10 De acuerdo con la presente invención, se usa una composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína (NAC) para administración intravenosa y/u oral. La formulación contiene N-acetil-L-cisteína (NAC) como tal o junto con (ii) selenio en forma de selenometionina y/o (iii) melatonina y/o sales de la misma fisiológicamente aceptables.

- 15 La formulación con NAC como tal contiene entre 70 y 150 mg/kg de peso corporal de NAC y se administra una vez al día durante 1-3 días en relación con el tratamiento de FIV. También es posible administrar una sola vez, es decir, el día de la administración de la FIV. En ese caso, la administración tiene lugar aproximadamente 1 hora antes de la FIV.

EJEMPLOS

- 20 Embriotoxicidad

- 25 La eventual ocurrencia de embriotoxicidad por NAC fue estudiada con carácter previo. Para verificar la embriotoxicidad de la NAC se utilizó la aplicación de dos pruebas de embriotoxicidad - bioensayo de embrión de conejo y bioensayo de motilidad del esperma humano (véase Pierzynski et al., 2007a). En ninguno de los dos casos se pudo detectar un efecto embriotóxico de la NAC en concentraciones de hasta 50 veces las concentraciones terapéuticas en sangre. Se demostró que la NAC no afecta a la supervivencia de los embriones de conejo de 1 célula, así como que no disminuye el porcentaje de blastocistos de conejo eclosionados. Las pruebas realizadas en espermatozoides humanos tampoco mostraron una influencia adversa.

- 30 Prueba de toxicidad - Bioensayo de motilidad del esperma humano

- 35 Las evaluaciones de la motilidad del esperma humano se realizaron en muestras frescas tomadas de 3 donantes sanos con buenos parámetros seminales incluyendo motilidad y velocidad del esperma. La migración o "Swim-up" en el medio de preparación del esperma humano se aplicó a seleccionar espermatozoides móviles. Después de la selección cada muestra de semen se dividió en 3 alícuotas transferidas a tubos Eppendorf. Además de un tubo de control, dos tubos tenían NAC añadido en concentraciones de 100 y 1.000 nM. Los tubos se incubaron en un ambiente con 5% de CO₂, en condiciones de temperatura y humedad constantes durante 24 horas. La motilidad espermática se evaluó utilizando un microscopio de fase de contraste a un aumento de 400 veces después de 1 y 24 horas de exposición a NAC. La evaluación se realizó en un intervalo de tiempo fijo de 2 minutos. Se evaluaron nueve muestras de motilidad y velocidad de esperma en 36 mediciones (2 mediciones a 1 y 24 h por muestra).

- 45 En las evaluaciones del bioensayo de la motilidad espermática humana, no se detectaron efectos de la NAC sobre la motilidad o velocidad del esperma humano en comparación con los controles. Sin embargo, la duración del experimento influyó en la motilidad, detectada como una disminución gradual de la actividad y la velocidad de los espermatozoides. Esta disminución se observó tanto en los controles como en los tratados con NAC y no difirió entre grupos. No se encontraron interacciones entre tiempo y concentración, por lo que el efecto del tiempo no difirió significativamente en los 2 grupos de concentraciones 100 y 1.000.

- 50 In vitro

- 55 Las integrinas se expresan de forma altamente regulada en la interfase materno-fetal durante la implantación. Sin embargo, no se entiende completamente la importancia de los ligandos de la matriz extracelular (MEC) durante la fijación del embrión mediada por integrina al endometrio. Por lo tanto, se estudió la distribución de fibronectina en el útero de rata y blastocisto en el momento de la implantación. La fibronectina estaba ausente en las células epiteliales del lumen uterino pero se expresó intensamente en las células trofoblásticas y la masa celular interna sugiriendo que la fibronectina secretada del blastocisto puede ser un ligando puente posible para las integrinas expresadas en la interfase materno-fetal. Se usó un péptido Arg-Gly-Asp (RGD) para bloquear los sitios de reconocimiento de RGD en integrinas, y se examinó el efecto sobre la fijación de blastocistos de rata a células de Ishikawa. Hubo una reducción significativa en la fijación de blastocistos cuando los blastocistos o las células de Ishikawa se pre-incubaron con el péptido bloqueante de RGD. Por lo tanto, la unión exitosa del embrión al endometrio requiere la interacción de las integrinas tanto en el endometrio como en el blastocisto con la secuencia RGD de los ligandos MEC, tales como la fibronectina. El pretratamiento tanto de los blastocistos como de las células

de Ishikawa con el péptido RGD también inhibió la fijación del blastocisto, pero no completamente, lo que sugiere que los ligandos de puente MEC que no contienen la secuencia RGD también están implicados en la fijación del embrión (Kaneko Y, Murphy CR, Day ML. Extracellular matrix proteins secreted from both the endometrium and the embryo are required for attachment: A study using a co-culture model of rat blastocysts and Ishikawa cells. J Morphol. 2013;274(1):63-72)

Experimento 1

Los presentes experimentos se llevaron a cabo para dilucidar si el tratamiento con NAC influye en las proteínas de unión (adhesión) incluyendo la integrina/fibronectina.

Ensayo de Adhesión Celular. Se saturaron siete μg / ml de fibronectina humana (Sigma Aldrich Chem Co) con albúmina de suero bovino (ASB) al 2% durante 30 min a 37°C y se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (STF). Las células Jurkat se sembraron a continuación sobre los pocillos durante 2 h a 37°C; Después, se aspiraron células no adherentes y se enjuagaron los pocillos con STF. Las células adherentes se fijaron durante la noche con formaldehído al 2% y se tiñeron con eosina Y durante 30 minutos. La eosina Y se extrajo luego por adición de una mezcla de 1% de ácido acético glacial y 50% de etanol, y se midió la absorbancia a 540 nm.

Expresión de la integrina alfa-4 (VLA-4). La expresión del antígeno VLA-4 se detectó en células Jurkat mediante inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal anti-VLA-4 (clon HP1/7) y citometría de flujo. La tinción de las células se realizó de acuerdo con los protocolos estándar y el análisis de citometría de flujo se realizó mediante el uso de un citómetro FACS-Calibur (Becton Dickinson).

Resultados con referencia a la Fig. 1

La NAC aumenta las adherencias de las células Jurkat sobre la fibronectina. El ensayo de adhesión se realizó usando células de Jurkat tratadas con NAC (5 mM durante 2 h). Las células se fotografiaron después de tinción con eosina Y. La incubación de las células, después del tratamiento con NAC, con anticuerpo anti-VLA-4, inhibió la adhesión. Luego se cuantificó la adhesión celular mediante tinción de las células unidas a placas recubiertas de proteína de unión con eosina Y y lectura de la absorbancia en un lector de microplacas. Como se muestra en la Fig. 1, el pretratamiento NAC aumentó la adhesión celular en casi un 35%, un efecto que fue abolido por anti-VLA-4.

Se solubilizaron las células y se cuantificó la eosina Y y la absorbancia a 540 nm. Ningún anticuerpo, ilustrado por barras negras; anti-VLA - 4 (10 ng / ml) ilustrado por barras grises; Y anti - VLA - 4 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ilustrado por barras negras. Los datos son medias $\pm$ SE (n = 3).*, P menor que 0.01 frente a control. De la fig. 1 se puede concluir que el tratamiento NAC aumenta la adhesión (moléculas de la proteína de la unión).

Experimento 2

Los presentes experimentos se llevaron a cabo para dilucidar si el tratamiento con NAC influye sobre la integrina y la expresión del gen de la fibronectina mediante el análisis de la expresión génica utilizando la plataforma Affymetrix GeneChip.

Se llevó a cabo un análisis de expresión de genes basado en micro matrices de los queratinocitos epidérmicos humanos normales 1 y 12 horas después de la adición de NAC, en comparación con muestras no tratadas (es decir, muestras de control en los mismos puntos temporales). Los datos obtenidos del análisis de GeneChip se procesaron usando el enfoque de análisis de ARN y las muestras se normalizaron a sus controles correspondientes. El filtrado se realizó sobre la base de dos criterios (p-valor $<0,1$ y $> 1,5$ expresión aumentada o $> 0,5$ expresión disminuida) para cada punto temporal. El etiquetado y la hibridación se realizaron por duplicado.

Una hora después del tratamiento con NAC, la integrina alfa 2, se encontró regulada positivamente. A las 12 horas se encontró que la fibronectina estaba regulada positivamente. Estos resultados sugieren que el tratamiento con NAC da lugar a una adhesión aumentada mediante la regulación positiva secuencial de la integrina y la fibronectina y que algunos de los efectos ya son visibles una hora después del tratamiento.

Experimento 3

En ratones, se confirmó que la NAC promueve la implantación de embriones. En el modelo animal, la tasa de implantación de embriones disminuyó cuando se administró oxitocina a los ratones. La NAC, en función de la dosis, restauró las tasas de implantación en los ratones tratados con oxitocina, lo que proporcionó evidencia de la participación de la oxitocina en la implantación del embrión.

Para verificar la embriotoxicidad de la NAC se utilizó la aplicación de dos técnicas de embriotoxicidad: el bioensayo de embrión de conejo y el bioensayo de motilidad del esperma humano. Ninguno detectó un efecto embriotóxico de

la NAC en concentraciones de hasta 50 veces las concentraciones sanguíneas terapéuticas. Se demostró que la NAC que no afecta a la supervivencia de los embriones de conejo de 1 célula, así como tampoco disminuye el porcentaje de blastocistos de conejo eclosionados. Las pruebas realizadas en espermatozoides humanos tampoco mostraron una influencia adversa.

Experimento 4

Modelo animal que muestra que la NAC disminuye las contracciones del útero

Diseño experimental

Los animales se mantuvieron a 22°C, se alojaron 3 por jaula y se alimentaron ad libitum. Se utilizaron úteros aislados de ratas Wistar vírgenes (200-280 g) en celo, que se determinó mediante el examen de un frotis vaginal diario.

Reactivos

Se disolvieron sulfato de protamina (SP) y NAC en agua pura.

Estudios en baño para órganos aislados

Todas las ratas se sacrificaron por dislocación cervical. Los cuernos uterinos se escindieron, se limpiaron cuidadosamente y se montaron verticalmente en un baño de órganos de 10 ml de volumen que contenía solución de De Jalon (NaCl 154 mM, KCl 5,6 mM, CaCl₂ x 2H₂O 0,41 mM, NaHCO₂ 5,9 mM y glucosa 2,8 mM) bajo 1 g de tensión, aireada con 95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono a 37°C. Después de un período de equilibrio (de 45 min), cuando el útero mostró contracciones estables (espontáneas o inducidas por ion calcio), se añadió indometacina (1 µg/ml) antes de SP. Después de 10 min se añadieron concentraciones crecientes de SP hasta que se observó el cese total de las contracciones.

La tensión miometrial se registró isométricamente con un baño de órganos y un transductor.

Análisis de datos y procedimientos estadísticos

Los efectos de los tratamientos sobre las contracciones uterinas se calcularon como porcentajes en relación con las condiciones de control, no tratadas y de contracción. Cada valor de datos se expresa como la media ± SEM. Las diferencias entre los grupos se analizaron por dos vías ANOVA. Los valores de EC50 se compararon usando ANOVA de una sola vía.

Resultados

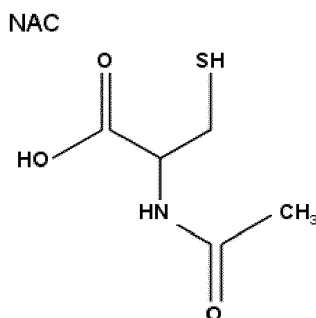
SP causó relajación, en función de la dosis, del útero espontáneamente activo. El pretratamiento con NAC (1 µg/ml) aumentó la relajación inducida por SP. SP también causó relajación, en función de la dosis, de las contracciones uterinas inducidas por iones calcio. El pre-tratamiento con NAC moduló la relajación de las contracciones uterinas inducida por SP y modificó las curvas de relajación inducida por SP.

Se analizaron los valores de EC50 para el útero tratado con SP. Se encontraron diferencias significativas en los valores de CE50 en relación con el tipo de contracción utilizada y al tratamiento utilizado. La EC50 fue menor en útero espontáneamente activo que en útero inducido por ion calcio. Los valores de CE50 para el útero espontáneamente activo pretratado con indometacina (1 µg/ml) fueron significativamente más bajos que los otros dos valores EC50 obtenidos. Sin embargo, el útero activo inducido por ión calcio pretratado con indometacina presentó valores de EC50 más altos en comparación con el útero tratado con SP.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

NAC en general

N-acetil-L-cisteína (NAC) es un fármaco farmacéutico de bajo peso molecular bien conocido, con la fórmula química



Las características de la NAC se relacionan principalmente con su grupo tiol, lo que la hace efectiva en la mayoría de las vías bioquímicas donde actúa el tripéptido glutatión (GSH), presente en todos los tejidos humanos en concentraciones relativamente altas, incluso por encima de 10 mM. La cisteína está, de hecho, entre los tres aminoácidos que componen GSH, por lo que la NAC se considera un precursor de GSH con su cisteína desacetilada. La NAC ha sido y sigue siendo ampliamente utilizada como un agente mucolítico, donde el modo de acción se atribuye generalmente a la rotura redox de los puentes de disulfuro sensibles a la cisteína en las proteínas del moco. De hecho la NAC participa en el ciclo redox complejo de grupos tiol, donde actúan varias enzimas. De hecho, de extrema importancia fisiológica es la formación de disulfuro y el ciclo de rotura, un mecanismo común mediante el cual se regula la actividad proteica y la señalización celular. Las enzimas tales como las tirosina-fosfatasas de la proteína y las tirosina-quinasas, por ejemplo, juegan papeles cruciales en el control del ciclo celular, la proliferación y la diferenciación celular, y muchas de ellas están reguladas por el estado redox de sus cisteínas.

En general, aunque los mecanismos de acción detallados no han sido finalmente concretados, la NAC parece actuar en todas las vías bioquímicas donde lo hace GSH. Las enzimas y las proteínas cuya actividad es modulada por GSH operan en varios procesos ya sea directamente o a través de una red de vías de transducción de señales. En este panorama, la NAC puede tener una acción paralela a GSH, o puede ser incluso más eficaz que GSH.

Por ejemplo, GSH se conjuga normalmente con metabolitos reactivos formados por paracetamol y ayuda a desintoxicarlos. Cuando hay una sobredosis de paracetamol, GSH está sin embargo agotado y los metabolitos del paracetamol comienzan a reaccionar con las proteínas celulares, conduciendo eventualmente a la muerte celular. En el tratamiento de la insuficiencia hepática fulminante después de envenenamiento con paracetamol, la NAC actúa en lugar de GSH en la desintoxicación de metabolitos de paracetamol. Se cree que la NAC está virtualmente ausente de efectos secundarios no deseados, lo que también resulta indicado por las dosis altas de NAC que se usan en el tratamiento del envenenamiento por paracetamol, estimadas, para un individuo de 70 kg, en aproximadamente 40 g/día.

Al contrario que el tripéptido GSH, que puede degradarse ya en el estómago, la molécula NAC simple se difunde libremente en casi todos los tejidos y células. Los estudios farmacocinéticos de la NAC determinaron una concentración máxima en plasma alcanzada en aproximadamente una hora, con una vida media de aproximadamente tres horas. La separación total ocurre entre seis y doce horas.

NAC como agente diferenciador antiproliferativo

Los inventores han descubierto recientemente que la N-acetil-L-cisteína (NAC) posee un marcado efecto antiproliferativo sobre células cancerígenas de origen epitelial (Cell Death and Differentiation 2005,12(10):1285-1296).

Se utilizó la NAC para detener la proliferación e inducir la diferenciación en dos líneas celulares de adenocarcinoma y en células de queratinocitos normales primarias, todas de origen epitelial. En estos sistemas, la diferenciación se caracterizó morfológicamente, bioquímicamente y mediante el análisis de la expresión génica (el análisis de la expresión génica ampliamente tratado en BMC Cancer 2005,5:75).

El efecto antiproliferativo de la NAC, en el estudio del cáncer, no se relacionó con la muerte celular ni con la toxicidad, sino que se debió a la activación de una vía de diferenciación fisiológica, que puede considerarse como una normalización de las funciones celulares hacia el tejido de origen.

Además de la disminución de la proliferación, la morfología de las células cancerígenas tratadas con NAC también se alteró. In vitro, las células epiteliales bajo proliferación activa muestran una morfología irregular (una morfología mesenquimal) y a menudo forman varias capas de células múltiples. Por el contrario, cuando las células se someten a un proceso de diferenciación, hacia la estructura y función de su tejido objetivo final, cesan la proliferación, su morfología se vuelve regularmente poligonal, cada célula a veces más gruesa, y forman una sola capa de células adyacentes. Este proceso se acompaña de un aumento de las uniones célula-célula y célula-sustrato, en consonancia con un cambio de mesénquima proliferante a un fenotipo adhesivo, menos motil y diferenciado.

En su conjunto, una serie compleja de cambios metabólicos se detectaron después de la suplementación de NAC a las células cancerígenas, todos convergentes en la detención de la proliferación incontrolada y en la inducción de su diferenciación terminal. En particular, el tratamiento con NAC indujo un aumento considerable en los complejos de adhesión célula-célula y célula-sustrato. La proliferación incontrolada puede considerarse como una condición en la que las células han perdido la inhibición por contacto y su capacidad para responder a las señales de diferenciación. Las células que entran en la vía de diferenciación exhiben un notable aumento en los complejos de unión célula-célula, y el proceso también se indica generalmente como inhibición por contacto. Varias evidencias indican que las señales para que las células entren en el punto final de diferenciación se originan a partir de los componentes de los propios complejos célula-célula. Estas uniones son también un medio para la difusión de señales entre células.

Régimen de dosificación

A partir del estudio del tratamiento con NAC en líneas celulares de adenocarcinoma y células de queratinocitos normales primarias (Cell Death and Differentiation 2005,12(10):1285-1296), se concluyó que la dosis efectiva de NAC para la inducción de la actividad antiproliferativa-diferenciadora varió y fue dependiente del tipo celular. El tejido de origen dicta así la concentración efectiva de NAC requerida para observar un bloque completo de proliferación, y tiene que determinarse para cada tejido. Además, la dosis de NAC también se relacionó con la malignidad celular. En detalle, mientras que las células normales requerían una dosis baja para detener la proliferación y comenzar a diferenciarse, las células de carcinoma con un peor pronóstico característico requerían una mayor concentración de NAC.

Para el propósito de la presente invención, se desarrolló un régimen de dosificación de la NAC para el tratamiento de la FIV en un mamífero, incluyendo humanos, basado en los siguientes criterios:

1) una dosis de NAC por día que está de acuerdo con otros tratamientos clínicos actuales y se considera sin efectos secundarios indeseables;

2) dada la disminución conocida del nivel de NAC en el plasma después de tratamientos prolongados (Pendyala L, Creaven PJ. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.1995;4:245-51), se consideró la suspensión del tratamiento durante aproximadamente la mitad de cada semana para una óptima respuesta biológica en un tratamiento de dos meses o más.

La composición de la presente invención de acuerdo con una realización comprende NAC para el tratamiento de la FIV para ser administrada por vía intravenosa en una dosis de entre aproximadamente 50 y 150 mg/kg/día. Se ha demostrado que el límite inferior es eficaz en FIV y se sabe que el límite superior no tiene prácticamente efectos secundarios.

En otra realización de la presente invención, la composición comprende NAC para su administración por vía oral en una dosis de aproximadamente 30-45 mg/kg/día. Sorprendentemente, esta dosis baja ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la endometriosis y también produce efectos en relación con la FIV.

En una realización, la composición oral debe administrarse durante un período de tiempo de dos meses o más, preferiblemente de tres meses o más. Para contrarrestar una disminución del nivel de NAC en el plasma después de un tratamiento prolongado, se puede administrar NAC en la dosis prescrita de manera intermitente, es decir, régimen/tratamiento de dosificación intermitente. Por administración o tratamiento intermitente se entiende que el tratamiento se interrumpe en períodos, es decir, que la composición farmacéutica se administra durante un período de tiempo, por ejemplo, unos pocos días, seguido de una interrupción en la administración, donde no se administra ninguna composición farmacéutica durante un período de tiempo, por ejemplo, durante unos pocos días. El tratamiento intermitente puede ser regular, por ejemplo, tratamiento durante un número fijo de días o semanas, seguido de interrupción durante un número fijo de días o semanas. Los ejemplos incluyen esquemas repetidos con tratamiento durante 4 días seguido de interrupción durante 3 días cada semana o tratamiento durante 2 semanas seguido de interrupción durante 1 semana. Un caso especial de tratamiento intermitente regular es el tratamiento pulsado, es decir, con un tratamiento y una duración de interrupción regulares, por ejemplo, administración en días alternos o administración durante dos días seguida de dos días de interrupción, etc. También se pueden concebir

esquemas de tratamiento intermitente irregular que no se repiten regularmente o que tienen un esquema de repetición más complejo, es decir, que dependen de la respuesta al tratamiento. En diferentes realizaciones ejemplificadoras de la presente invención, la dosis prescrita de NAC se administra durante 3-5 días consecutivos seguida de 2-4 días de interrupción, o se administra durante 1-3 días consecutivos seguido de 1-2 días de interrupción.

En una realización, por referencia a un peso corporal de aproximadamente 60 kg, la dosis de NAC está en un intervalo de entre 1,2 y 5,4 g/día, preferiblemente de entre 1,8 y 3,6 g/día.

La dosis se puede dividir en dos o más, preferiblemente tres o cuatro, administraciones diarias de una o dos dosis (por ejemplo píldoras) cada una, donde cada dosis puede comprender, por ejemplo, 0,15-2,7 g de NAC o preferiblemente 0,6-1,2 g de NAC. El tratamiento incluye la administración de las dosis anteriormente mencionadas pulsadas o intermitentemente, por ejemplo, en días alternos o durante tres a cuatro días consecutivos cada semana, con una suspensión de cuatro a tres días, respectivamente. La duración total mínima del tratamiento es de dos meses, sin duración máxima. Para pacientes con otros pesos, por ejemplo, personas con sobrepeso o bajo peso, la dosis diaria debe ajustarse en consecuencia.

En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica para el tratamiento de FIV NAC en una dosis de 150-5400 mg debe administrarse en dos o más tomas al día, durante un período de al menos 2 meses, tal como al menos 3 meses. En una realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica comprende NAC en una dosis de 230-3600 mg para administrarse en dos o más tomas por día, durante un período de al menos 2 meses, tal como un máximo de al menos 3 meses. El tratamiento incluye la administración de las dosis anteriormente mencionadas pulsadas o intermitentemente, por ejemplo, en días alternos o durante tres a cuatro días consecutivos cada semana, con una suspensión de cuatro a tres días, respectivamente.

El NAC también se puede administrar junto con selenio en forma de selenometionina y/o melatonina. Dichas combinaciones se describen adicionalmente en el documento EP 12710062.6.

Formulaciones farmacéuticas

Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede preparar de una manera conocida per se por un experto en la técnica farmacéutica. La composición puede comprender una cantidad eficaz de NAC, de acuerdo con la invención, así como un soporte o excipiente adecuado que sirve como vehículo o medio para el principio activo. Tales vehículos o excipientes son conocidos en el estado de la técnica. La composición farmacéutica es preferiblemente para administración intravenosa. También son concebibles otras formas, tales como comprimidos, cápsulas, supositorios, suspensiones, jarabes o similares. La invención requiere una evaluación estricta de la calidad farmacéutica de la preparación de la NAC para obtener la dosis eficaz. Por lo tanto, tiene que utilizarse la marca o preparados genéricos certificados. La NAC no es una molécula estable, su residuo activo de tiol puede ser oxidado fácilmente por oxígeno, luz y otras radiaciones, de modo que no se alcanzaría la dosis efectiva. Por ello, la preparación se protege preferiblemente de la luz, en tabletas solubles, con carbonato de hidrógeno sódico, lo que ayuda a una eliminación parcial del oxígeno del agua durante la disolución.

Se ha observado que altas dosis orales de NAC pueden causar dolor abdominal. Para superar esto en casos de administración oral, una opción es proporcionar NAC en una formulación con protección gástrica, adecuada para prevenir la liberación/solubilidad del NAC en el estómago. Tales formulaciones son bien conocidas en el estado de la técnica y pueden usarse con la presente invención. Por ejemplo, pueden utilizarse revestimientos de los comprimidos que sean resistentes a los fluidos gástricos y permitan la liberación del fármaco sólo en el intestino, después de su tránsito a través del estómago. Las formulaciones utilizadas habitualmente incluyen polímeros tales como derivados de celulosa, copolímeros de aminoéster de metacrilato. El revestimiento protege el núcleo del comprimido de la desintegración en el medio ácido del estómago empleando un polímero sensible al pH, que se hincha o se solubiliza después de haber pasado a través del estómago, en respuesta a un aumento del pH, para liberar el fármaco.

Otra opción es reducir la dosis de NAC que entra en el torrente sanguíneo al mismo tiempo. La administración de NAC tres o más veces al día puede ser difícil de observar para el paciente. Sin embargo, puede ser deseable una administración repetida para conseguir una concentración sérica casi constante de NAC. Para superar estos problemas, una administración de una o dos veces al día podría ser más fácil de manejar para el paciente, por ejemplo mañana y noche. Una opción es proporcionar NAC en una formulación de liberación lenta (también denominada liberación sostenida o liberación controlada). Al ser capaces de reducir la velocidad de difusión y absorción de NAC en el torrente sanguíneo, dicha formulación permite la administración de una dosis mayor a intervalos más largos. La dosis se distribuye a continuación en la sangre durante un tiempo prolongado en pequeñas cantidades, por ejemplo, más de 12+12 horas en el caso de un esquema de régimen de dos veces al día. Muchas tecnologías y formulaciones diferentes para la liberación lenta se conocen desde hace mucho tiempo en la técnica y

pueden aplicarse con la presente invención. En tales tecnologías, el principio activo se encapsula, por ejemplo, en un revestimiento o matriz que es insoluble o menos soluble en el fluido corporal en el que se administra.

5 También son posibles formulaciones que tienen un efecto combinado de liberación lenta y protección gástrica y se pueden usar dentro de la presente invención.

EJEMPLOS EN HUMANOS

Administración en relación con el tratamiento de FIV

10 Recientemente se documentó el primer caso de aplicación clínica de NAC antes de la transferencia de embriones. La NAC se administró en una concentración de 50 mg/kg a una paciente de 42 años de edad que había sido sometida previamente a cinco transferencias de embriones con un total de 8 embriones de buena calidad. Inmediatamente antes de la transferencia de embriones, se confirmó por ultrasonido la presencia de un incremento de la actividad contráctil uterina. NAC 50 mg/kg de peso corporal se administró en infusión intravenosa durante 60 min. La transferencia de embriones se llevó a cabo 60 minutos después de los 60 minutos de administración de NAC 50 mg/kg de peso corporal. Tanto antes de conectar la infusión como directamente antes de la transferencia de embriones, se realizó un registro de exploración sagital transvaginal. En su virtud, fue posible confirmar que las contracciones uterinas disminuyeron de 10 contracciones por 3 minutos a cinco contracciones por 3 minutos, así como registrar una disminución aparente en su amplitud. El éxito terapéutico fue confirmado por el parto de una hija sana.

Administración pulsada

25 A continuación se muestran los resultados de la administración pulsada de NAC a 15 pacientes, 8 de las cuales se quedaron embarazadas.

Según esto, la NAC se administró a pacientes por vía oral durante 3 meses o más según el siguiente esquema: 600 mg tres veces al día, tres días consecutivos a la semana. La adopción de este procedimiento se basó en las siguientes consideraciones: (1) la dosis diaria total de NAC de 1,8 mg está prácticamente libre de efectos secundarios y ya se consideró para otras indicaciones clínicas [K. R. Atkuri, J. J. Mantovani, L. A. Herzenberg, and L. A. Herzenberg, "N-acetylcysteine-a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency," Current Opinion in Pharmacology, vol. 7, no. 4, pp. 355-359, 2007.]; (2) dividir la dosis total en 3 es simple para los pacientes y, con referencia a la conocida farmacocinética de NAC [L. Pendyala and P. J. Creaven, "Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of N-acetylcysteine, a potential chemopreventive agent during a phase I trial," Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention, vol. 4, no. 3, pp. 245-251, 1995.], favorece un nivel plasmático casi constante del fármaco; (3) el intervalo sin medicación de cuatro días proporciona un período de lavado útil para limitar la disminución conocida del nivel plasmático de NAC observado durante tratamientos prolongados.

40 RESULTADOS

	Paciente	meses de intento de embarazo	embarazo tras meses después del tratamiento con NAC	tipo de embarazo (1º o 2º)
45	1	12	1	1
	2	12	1	1
50	3	60	19	1
	4	1	8	1
	5	6	6	1
55	6	48	0	2
	7	1	14	1
60	8	12	3	1

Formulaciones a utilizar en relación con la invención

- 5 En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína (NAC) para administración intravenosa entre 50-150 mg/kg de peso corporal de NAC una vez al día durante 1-3 días en relación con el tratamiento FIV.
- Un aspecto es una composición farmacéutica que comprende NAC para uso en una dosis de 150 mg/kg durante 1-3 días.
- 10 Otro aspecto es una composición farmacéutica que comprende NAC para su uso sólo el mismo día que el tratamiento de FIV.
- En otra realización de la presente invención, la composición comprende NAC para ser administrado oralmente a una dosis de aproximadamente 30-45 mg/ kg/día.
- 15 Cuando se combina la NAC con selenio y/o melatonina se administra la NAC a una dosis de 5-45 mg/kg/día, selenio, en forma de selenometionina, para administración de una dosis de 0,4-1,2 µg/kg/día y melatonina para la administración de una dosis de 0,02-0,08 mg/kg/día. El producto médico es, en una realización, una composición farmacéutica que comprende NAC, selenio en forma de selenometionina y melatonina.
- 20 También la administración oral pulsada o intermitente, durante un periodo de tiempo de tres meses, de una dosis de N-acetil-L-cisteína que está entre 20 y 90 mg/kg/día en los días en que se administra tendrá efectos beneficiosos en el éxito de la FIV. En ese caso, la composición es para administración continua durante tres meses o más, o 3-5 días consecutivos seguidos por 2-4 días de interrupción. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende
- 25 N-acetil-L-cisteína es para administración durante 1-3 días consecutivos, seguido por 1-2 días de interrupción.
- De acuerdo con los ejemplos descritos en la memoria descriptiva, 15 pacientes fueron tratadas con administración pulsada de N-acetil-L-cisteína para su uso en FIV por vía oral en una dosis de 600 mg tres veces al día durante tres días consecutivos seguidos de cuatro días de interrupción durante 3 meses o más.
- 30 Otros posibles regímenes de administración tales como los siguientes se describen en EP 2305238.
- En una realización, la composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína para el uso mencionado anteriormente, donde la composición es para administración de una dosis de N-acetil-L-cisteína que está entre 30 y
- 35 60 mg/kg/día en los días en que se administra. En otra realización, la composición farmacéutica es para la administración de una dosis de N-acetil-L-cisteína que está entre 30 y 45 mg/kg/día en los días en que se administra.
- En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína para el uso descrito anteriormente, en el que la composición farmacéutica está protegida de la luz. En otra realización, la composición farmacéutica es un comprimido soluble en agua. En aún otra realización, la composición farmacéutica contiene carbonato de hidrógeno sódico. En una realización, la composición farmacéutica es una formulación de liberación lenta y/o una formulación para protección gástrica.
- 40 En un aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento de un mamífero en relación con la FIV, que comprende administrar por vía intravenosa una composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína (NAC) a dicho mamífero entre 50-150 mg/kg de peso corporal de NAC una vez al día durante 1-3 días en relación con el tratamiento de FIV.
- 45 Un aspecto es un método que comprende la administración intravenosa de NAC en una dosis de 150 mg/kg durante 1-3 días.
- Otro aspecto es un método que comprende la administración intravenosa de NAC solamente el mismo día que el
- 55 tratamiento de FIV.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína (NAC) como tal o junto con (ii) selenio en forma de selenometionina y/o (iii) melatonina y/o sales fisiológicamente aceptables de la misma para uso terapéutico en el tratamiento de FIV de un mamífero, **caracterizada porque** se administra una dosis de 50-150 mg/kg de peso corporal de NAC una vez al día durante 1-3 días por vía intravenosa o en una dosis de 30-45 mg/kg de peso corporal de NAC una vez al día por vía oral o, alternativamente, 600 mg de NAC se administra tres veces al día
10 oralmente en tres días consecutivos a la semana seguidos de cuatro días sin medicación para una duración total de tres meses o más antes del tratamiento de FIV.
- 15 **2.** Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende N-acetil-L-cisteína para uso terapéutico en el tratamiento de FIV de un mamífero, **caracterizada porque** se administra una dosis de 50-150 mg/kg de peso corporal una vez al día durante 1-3 días por vía intravenosa u por vía oral a una dosis de 30-45 mg/kg de peso corporal una vez al día.
- 20 **3.** Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende N-acetil-L-cisteína para uso terapéutico en FIV de un mamífero, **caracterizada porque** la composición es para administración intravenosa de una dosis de N-acetil-L-cisteína que está entre 50 -150 mg/kg de peso corporal una vez al día durante 1-3 días junto con el tratamiento de FIV.
- 25 **4.** Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende N-acetil-L-cisteína de un mamífero, **caracterizada porque** se administra una dosis de 600 mg de N-acetil-L-cisteína por vía oral tres días consecutivos a la semana seguidos de cuatro días sin medicación durante tres meses o más antes del tratamiento de FIV.
30
- 35 **5.** Composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada porque** está en una dosis de 30-45 mg/kg para administración oral durante 1-3 días.
- 40 **6.** Composición farmacéutica que comprende N-acetil-L-cisteína en una dosis de 50 mg/kg para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** es para administración el mismo día que el tratamiento de FIV.
- 7.** Composición farmacéutica según la reivindicación 6, **caracterizada porque** se administra 1 hora antes del tratamiento de FIV.

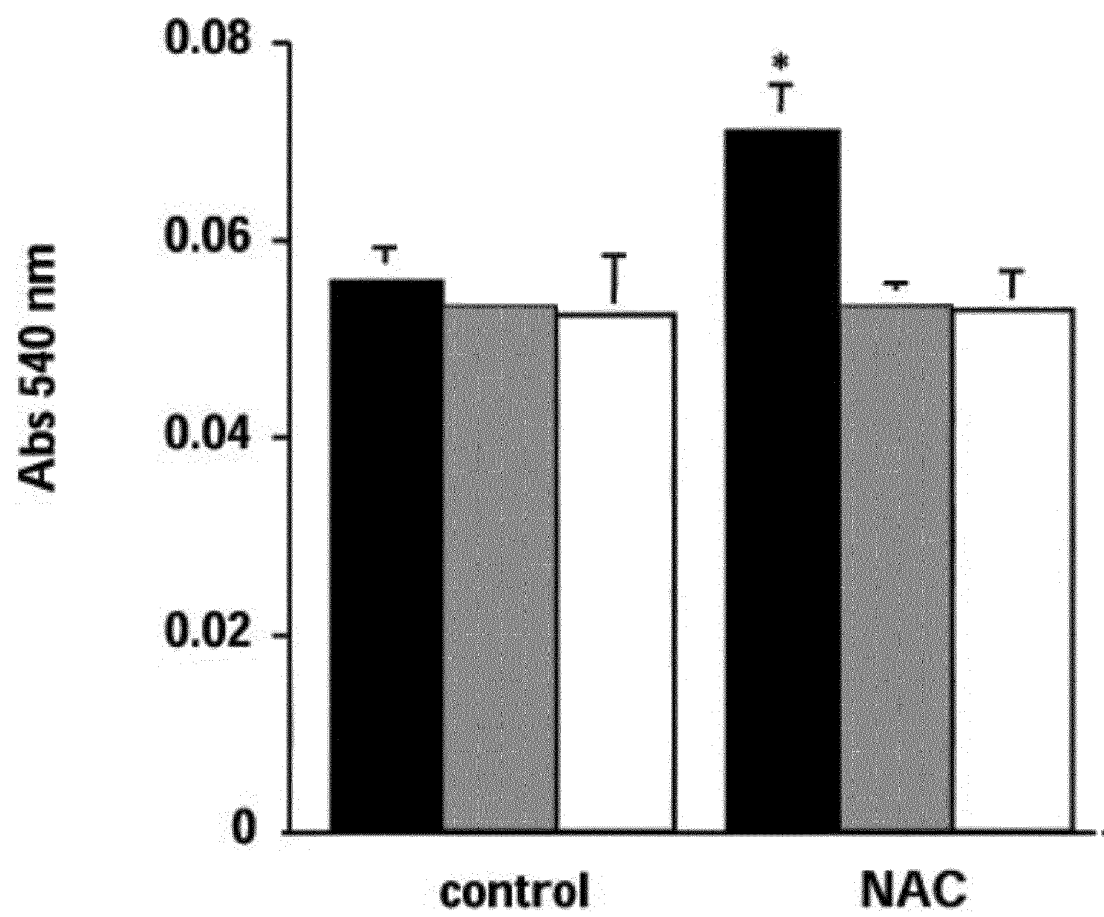


FIG 1