

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 588**

21 Número de solicitud: 201631132

51 Int. Cl.:

A61K 33/24 (2006.01)

A61P 15/08 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

21.05.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.10.2017

71 Solicitantes:

OXOLIFE, S.L. (100.0%)

c/Nou, 53

08192 Sant Quirze del Vallés (Barcelona) ES

72 Inventor/es:

CANALS ALMAZÁN, Ignacio y

ARBAT BUGIÉ, Agnès

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

54 Título: **Uso de una sal de tungsteno (VI) para favorecer la fertilidad y la reproducción normal en un mamífero hembra no diabético**

57 Resumen:

Uso de una sal de tungsteno (VI) o un solvato de la misma, para la elaboración de un medicamento para favorecer la fertilidad y la reproducción normal en un mamífero hembra no diabético.

ES 2 639 588 A2

DESCRIPCIÓN

Uso de una sal de tungsteno (VI) para favorecer la fertilidad y la reproducción normal en un mamífero hembra no diabético

La presente invención se refiere al uso de sales de tungsteno (VI) para la preparación de un medicamento, en especial para favorecer la fertilidad y la reproducción normal en un mamífero hembra no diabético.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La fertilidad en mamíferos es un proceso multietápico que de forma natural no es totalmente eficiente. Factores como la edad, los hábitos alimenticios o el estilo de vida, entre otros, modulan el éxito de este proceso. Así, se conoce por ejemplo que la tasa de embarazo en mujeres de 20 a 24 años es de aproximadamente el 86%, mientras que en mujeres de 35 a 32 años decae hasta un 50% [*Management of the Infertile Woman* por Helen A. Carcio; *The Fertility Sourcebook* por M. Sara Rosenthal, ASAS Summary of FAIR 2012]. Otros factores, como el sobrepeso o el bajo peso, también son responsables de retrasos en la consecución de un embarazo de forma natural o incluso de la imposibilidad de su consecución [*Fertil Steril* 2013;100:631–7]. Se estima que aproximadamente un 66% de las parejas no conciben de forma natural durante los 3 primeros meses de relaciones sexuales sin protección. Esta cifra disminuye hasta el 15% de las parejas durante el decurso del primer año de relaciones sexuales no protegidas. Infertilidad se define (WHO, ASRM, NICE) como la incapacidad de concebir tras 12 meses de relaciones sexuales regulares no protegidas. También se ha acuñado, especialmente en Europa, el término “subfertilidad” para definir a aquellas parejas con alguna forma o grado de fertilidad reducida, que conlleva un retraso en la concepción [*Gnoth C et al Definition and prevalence of subfertility and infertility Human reproduction* 2005;20(5):1144-1147].

Las principales causas de infertilidad entre las mujeres incluyen disfunciones ovulatorias, patologías del tracto reproductivo, reducción en la calidad de los oocitos y la depleción folicular inherente al envejecimiento. Sin embargo, también existe un porcentaje considerable de mujeres con infertilidad inexplicada, también denominada infertilidad idiopática, de la que una de las posibles causas está relacionada con deficiencias en el proceso de implantación.

El desarrollo folicular, la ovulación, la migración del óvulo inmaduro (oocito), así como la posterior concepción e implantación del cigoto en la pared uterina se encuentra regulado por secreciones hormonales de ciertos órganos endocrinos como por ejemplo la hipófisis, el

hipotálamo y la glándula tiroides. Entre las múltiples causas biológicas de la infertilidad en la mujer se pueden destacar también las causas ligadas a desórdenes de los estímulos hormonales que regulan todo este proceso.

5 Se conocen diferentes tratamientos para la infertilidad femenina entre los que se encuentran la administración de medicamentos para tratar problemas hormonales que conllevan alteraciones de la ovulación. Asimismo se han postulado algunos efectos beneficiosos con numerosos tratamientos en base a la ingesta de suplementos vitamínicos, especialmente vitamina B, vitamina C, vitamina E y ácido fólico, suplementos minerales como sales o
10 complejos de hierro, zinc, o selenio, ácidos grasos esenciales (omega 3), así como extractos de plantas tales como Sauzgatillo (*Vitex agnus chastus*), Damiana, regaliz, flor de Trébol Rojo, Baya de Agnocasto, Cohosh Negro, Dong Quai (*Angelica sinensis*), Ñame o Camote Silvestre (*Dioscorea villosa*), Raíz de Unicornio Falso, té verde, Ortigas (*Urtica dioica*), Avena salvaje (*Avena sativa*), Diente de león (*Taraxacum officinale*), etc. aunque para
15 ninguno de estos tratamientos se ha podido demostrar claramente su eficacia.

El porcentaje de embarazos conseguidos mediante los tratamientos mencionados anteriormente presentan limitaciones. Así, por ejemplo, se ha observado que el tratamiento de mujeres cuya ovulación es irregular o ausente mediante la administración de citrato de
20 clomifeno, un fármaco de la familia de los estilbenos, permite la restauración de la ovulación en un porcentaje elevado, pero la tasa de embarazo continua siendo baja, aproximadamente igual o inferior al 50%.

Los tratamientos de fecundación in vitro son muy efectivos en la etapa de fecundación del
25 oocito. Sin embargo, la tasa de implantación de los embriones en la pared uterina es baja. Esto promueve las transferencias múltiples de embriones por cada ciclo de fecundación in vitro, con la consecuencia de un porcentaje mayor de embarazos múltiples considerados de riesgo.

30 Por último, es conocido que las alteraciones metabólicas como la diabetes o la obesidad conllevan una limitación de la fertilidad. Se conoce que la recuperación parcial o total de la glucemia, la insulinemia y/o el peso corporal de ratones hembra diabéticos u obesos con la función reproductora dañada, comporta una mejora de la fertilidad.

35 Diferentes tratamientos farmacológicos, como la metformina o sales de tungsteno (VI), o incluso cambios en el estilo de vida, han demostrado mejorar la diabetes o alteraciones en la

insulina, como por ejemplo la deficiencia o la resistencia a la insulina, consiguiendo recuperar la función reproductora total o parcialmente, cuando la infertilidad es debida a la diabetes o alteraciones en la insulina.

- 5 En el caso concreto del tungstato sódico, se conoce que ratas con diabetes e insulinopenia inducida por la inyección de estreptozotocina, recuperan parcialmente los niveles de insulina circulantes tras un tratamiento prolongado (10 semanas) con tungstato sódico como consecuencia de revertir parcialmente la diabetes. Posteriormente, cuando las ratas hembras parcialmente recuperadas de la diabetes se aparean con machos sanos, se
10 observa que, de forma paralela a la recuperación parcial de la diabetes, han recuperado parcialmente su capacidad reproductora. En particular, se observa que el porcentaje de partos con respecto al número de raspados positivos en los ratones hembras que habían sido parcialmente recuperadas de la diabetes tras un tratamiento con tungstato sódico aumenta hasta el 66%, porcentaje inferior a las hembras que no padecían diabetes donde el
15 porcentaje es del 100%. (cf. J. Ballester y colaboradores, "Tungstate administration improves the sexual and reproductive function in female rats with streptozotocin-induced diabetes", Human Reproduction, 2007, vol. 22, pp. 2128-2135). No obstante, no se observó ni postuló efecto alguno de las sales de tungsteno (VI) en animales hembra no diabéticos.
- 20 El tungsteno se encuentra en cantidades traza en animales y plantas. Por ejemplo, en plantas se han descrito contenidos hasta un máximo de 100 mg/kg [*Gbaruko B.C. & Igwe J.C. Global Tungsten: Occurrence, Chemistry, Environmental and Health Exposure Issues. Journal of Environmental Research 2007;1(1):27-32*].
- 25 En vista de todo lo anterior, a pesar de la intensa investigación y los avances la comprensión y manejo del proceso reproductivo de los mamíferos y de los humanos en particular, todavía numerosas parejas no se benefician de las diferentes aproximaciones disponibles en la actualidad para incrementar la fertilidad por serles ineficaces. Por lo tanto, todavía hay una necesidad de encontrar nuevas alternativas para la mejora de la eficiencia reproductiva
30 natural y/o el tratamiento de infertilidad femenina que den una mayor eficacia.

RESUMEN DE LA INVENCION

- Se ha encontrado ahora que la administración de una sal de tungsteno (VI), o un solvato de dicha sal es efectiva para favorecer la fertilidad y la reproducción normal en un mamífero
35 hembra no diabético. A pesar de que era conocido que el tungstato sódico puede revertir parcialmente las alteraciones en la función reproductora en ratones hembras diabéticas

debido a que produce una normalización de los niveles de glucosa en sangre, no se ha descrito ni se ha sugerido que el tungstato sódico puede tener un efecto sobre la función del sistema reproductor femenino en mamíferos hembra no diabéticas, favoreciendo la fertilidad y la reproducción normal.

5 Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de una sal de tungsteno (VI) o un solvato de la misma, para la preparación de un medicamento para favorecer la fertilidad y la reproducción normal en un mamífero hembra no diabético.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION
Tal y como indicado anteriormente, de acuerdo con un primer aspecto la presente invención se refiere al uso de una sal de tungsteno (VI) o un solvato de la misma, para la preparación de un medicamento para favorecer y/o contribuir a la fertilidad y la reproducción normales en
15 un mamífero hembra no diabético.

El término “favorecer la fertilidad y la reproducción normal” o “contribuir a la fertilidad y la reproducción normal” se refiere a una contribución a la fertilidad y reproducción normales, o mejorar la fertilidad y la reproducción normal (reduciendo los tiempos para lograr un
20 embarazo), entendiendo por “fertilidad y reproducción normales” un estado de fertilidad en el cual se logra, siguiendo las definiciones proporcionadas previamente:

* en una situación de subfertilidad: un embarazo en un periodo de 12 meses de relaciones sexuales regulares y no protegidas; y

* en una situación de infertilidad: un embarazo tras un periodo 12 meses de relaciones sexuales regulares y no protegidas. Se incluyen aquí la necesidad de restaurar y/o potenciar la ovulación, mejorar la calidad del oocito y del embrión, aumentar la implantación del cigoto en la pared uterina, regular una alteración del eje hipotalámico-hipofisario-ovárico, incluyendo síndrome de ovario poliquístico, síndrome metabólico, hiperprolactinemia, endometriosis, hipotiroidismo, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso, cirrosis, artritis reumatoide, celiaquía, fallo renal crónico, causas idiopáticas y desórdenes alimentarios, tales como anorexia nerviosa y bulimia.
30

El mamífero hembra en el marco de la presente invención puede ser cualquier mamífero, incluyendo, pero no limitado a, humanos, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cobayas, hámsteres, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, etc.
35

De acuerdo con una realización particular, el mamífero hembra es humano.

De acuerdo con una realización particular más, la dosis máxima diaria será de 1000 mg/kg/día; de acuerdo con realizaciones particulares adicionales, la administración se realizaría en dosis de al menos 0,001 mg/kg/día, de al menos 0,01 mg/kg/día, de al menos 0,1 mg/kg/día, de al menos 0,5 mg/kg/día, de al menos 1 mg/kg/día, de al menos 10 mg/kg/día, de al menos 25 mg/kg/día, de al menos 50 mg/kg/día, de al menos 100 mg/kg/día, de al menos 200 mg/kg/día, de al menos 300 mg/kg/día, de al menos 400 mg/kg/día, de al menos 500 mg/kg/día, de al menos 600 mg/kg/día, de al menos 700 mg/kg/día, de al menos 800 mg/kg/día o de al menos 900 mg/kg/día.

En general, la sal de tungsteno comprende un anión de tungsteno (VI) y un catión dietéticamente o farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el catión es un catión alcalino o alcalinotérreo. Más preferiblemente, el catión se selecciona entre el grupo que consiste en sodio, potasio, magnesio, calcio y zinc. Según una realización particular, la sal de tungsteno (VI) es la sal sódica de tungsteno (VI).

Por su parte, el anión de tungsteno (VI) se selecciona preferiblemente del listado que consiste en WO_4^{2-} , HWO_4^- , $\text{W}_2\text{O}_7^{2-}$ y HW_2O_7^- . Preferiblemente, el anión es WO_4^{2-} .

De acuerdo con una realización particular, la sal está en forma de solvato; preferiblemente, el solvato es el hidrato, más concretamente el dihidrato.

Todas las características enumeradas de manera individual para diferentes elementos de la invención pueden ser combinadas entre sí, quedando todas las combinaciones posibles incluidas en el alcance de la presente invención. Así por ejemplo, según una realización preferida, el solvato de la sal de tungsteno (VI) es el dihidrato y el catión es un catión sódico.

Al igual, el resto de combinaciones posibles también se pretende estén incluidas en el alcance de la presente invención.

De acuerdo con una realización particular, el mamífero hembra no diabético se selecciona del grupo que consiste en mamíferos hembra que necesitan restaurar y/o potenciar la ovulación, mejorar la calidad del oocito y del embrión, aumentar la implantación del cigoto en la pared uterina, regular una alteración del eje hipotalámico-hipofisario-ovárico, incluyendo síndrome de ovario poliquístico, síndrome metabólico, hiperprolactinemia, endometriosis, hipotiroidismo, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso, cirrosis, artritis reumatoide, celiaquía, fallo renal crónico, causas idiopáticas y desórdenes alimentarios, tales como anorexia nerviosa y bulimia.

De acuerdo con otra realización particular, el mamífero hembra no diabético se selecciona del grupo que consiste en mamíferos hembra que presentan insulínresistencia (también conocida como resistencia a la insulina o resistencia insulínica); la insulínresistencia, cuando se presenta junto con una hiperglicemia, puede conducir al desarrollo de diabetes, no obstante la insulínresistencia sola no conduce a un estado diabético. Preferiblemente, los mamíferos hembra que presentan insulínresistencia se seleccionan del grupo que consiste en hembras mamíferos que presentan una o más de las siguientes condiciones: Obesidad o sobrepeso, Síndrome metabólico, Prediabetes, Síndrome del ovario poliquístico, Hipertensión, Enfermedad coronaria, Hiperlipidemias o dislipemia, Hipertiroidismo, Hiperparatiroidismo, Hiperleptinemia o resistencia a la leptina, Sedentarismo, Desórdenes alimentarios, Síndrome de la apnea obstructiva del sueño, Malnutrición fetal, Síndrome de Prader Willi, Síndrome de Rabson-Mendenhall, Esteatosis hepática, Leprechaunism, Patologías asociadas al exceso de secreción de glucocorticoides (p.ej acromegalia), insulínresistencia causada por tratamientos farmacológicos (p.ej glucocorticoides, diuréticos tiazídicos , betabloqueantes), Estrés o Menarquía Precoz [Egas Béjar, Daniela et.al *Insulinorresistencia / Insulin resistance. Medicina (Guayaquil)*;10(2):159-166, abr. 2005; Graves, Thomas K. *WHY ISN'T THIS INSULIN WORKING? Western Veterinary Conference 2013 (SA113)*; Ximena Gaete V. *Adelanto de la pubertad en Chile y el mundo. Rev Chil Pediatr* 77 (5); 456-465, 2006; Leszek Szablewski *Glucose Homeostasis and Insulin Resistance* (eISBN: 978-1-60805-) Bentham e-books]. Muchas de estas indicaciones se ha descrito que no están relacionadas con la infertilidad, incluyendo la prediabetes [Acta Diab. Latina 4, 507, 1967].

A continuación se incluyen una serie de ejemplos ilustrativos, no limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. DESCRIPCIÓN DEL MODELO ANIMAL (RATONES HEMBRAS IRS2 -/-)

El modelo de ratón empleado para determinar la actividad de sales de tungsteno (VI) para favorecer la fertilidad y la reproducción normales, es el ratón IRS2^{-/-}, un knock-out del gen *Irs2* [Burks y colaboradores, "IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis", *Nature*, 2000, vol. 407, pp. 377-382]. La delección del gen *Irs2* se traduce en un claro dimorfismo sexual en relación a la fertilidad y al metabolismo de los carbohidratos. Los machos de este modelo presentan resistencia a la insulina y una severa hiperglicemia iniciada desde edades tempranas. Por contra, en edades tempranas, las hembras se mantienen relativamente euglicémicas y desarrollan una ligera insulín-resistencia, que se

mantiene hasta edades avanzadas (4-5 meses). Las hembras IRS2^{-/-} en edades tempranas, alrededor de 10 semanas de edad, muestran un bajo desarrollo folicular y una anovulación persistente, acompañada de la ausencia del ciclo estral en la mayoría de los ratones. La tasa de embarazos de los ratones hembra IRS2^{-/-} es del 9% frente a una tasa del 100% en ratones hembra IRS2^{wt} (IRS-2^{+/+} wild type). Dado que en estas edades las hembras se mantienen euglicémicas y que únicamente desarrollan una ligera insulín-resistencia, la profunda alteración en la fertilidad, no es una consecuencia directa de las anomalías en el metabolismo de la glucosa.

EJEMPLO 2. ESTUDIO DE OVULACIÓN, IMPLANTACIÓN Y EMBARAZO

A. Animales

10 ratones hembra IRS2^{-/-} de edades comprendidas entre 6 y 8 semanas.

6 ratones macho "wild-type" (IRS2^{wt}) de edades comprendidas entre 6 y 8 semanas.

Los ratones hembras y machos se estabularon por separado en condiciones normales, es decir ciclo luz/oscuridad 12h y temperatura y humedad controladas. Los animales se alimentaron a voluntad (también denominado *ad libitum*) con dieta de pienso estándar.

B. Método

Fase de pre-tratamiento

Tras un periodo de aclimatación, los ratones hembra IRS2^{-/-} se estabularon en grupos de 4-6 ratones/jaula. Durante la fase de pre-tratamiento (2 semanas), a los animales se les administro el agua de bebida sin sal de tungstato.

Fase de tratamiento

El tungstato sódico fue administrado en el agua de bebida (*ad libitum*) mediante una solución de 2 mg/ml de tungstato sódico dihidrato (comercializado por Carlo Erba) en agua destilada tras la fase de pre-tratamiento (día 0 de tratamiento) y hasta 4 semanas antes del sacrificio de los animales. La dosis diaria de tungstato sódico ingerida por los ratones fue aproximadamente de 180 mg/kg de peso corporal.

Cruce

Tras las tres primeras semanas de tratamiento, los ratones hembra IRS2^{-/-} se estabularon en jaulas por parejas junto a un ratón macho IRS2^{wt} de forma continua.

Los ratones se observaron diariamente en busca de signos de embarazo o parto.

Tras 4 semanas se intercambiaron los machos entre las jaulas y se mantuvieron durante 4 semanas más.

La administración de tungstato se mantuvo durante las 8 semanas en las que machos y hembras se estabularon conjuntamente. Tras estas 8 semanas se retiró el tratamiento y se mantuvo la estabulación conjunta de machos y hembras durante 4 semanas adicionales.

5 Sacrificio

Transcurrido este periodo, las hembras fueron sacrificadas y biopsiadas en busca de indicios de embarazo.

C. Resultados

10 Resultados del Estudio de ovulación

Durante el periodo de pre-tratamiento y durante las 3 primeras semanas de tratamiento se realizaron frotis vaginales a 6 ratones hembras elegidos al azar en los días -8; -5; -2; -1; 7; 8; 14; 15 y 22, para determinar la fase del ciclo estral en que se encontraban.

15 Se introdujo en la vagina de los ratones entre 1 y 2 ml de solución salina con una pipeta pasteur. Con la misma pipeta se recogió el exudado vaginal y se extendió en un portaobjetos. Una vez secado al aire, se fijó y se tiñó con la técnica de Papanicolau.

La técnica de Papanicolau comprende realizar la tinción de los frotis vaginales fijados en el
20 portaobjetos de la siguiente manera:

- 10 inmersiones en alcohol 50 % v/v;
- Sumergir en solución de hematoxilina de Harris durante 3 minutos;
- Enjuagar con agua corriente;
- 10 inmersiones en Alcohol Acido (1% Ac. Clorhídrico);
- 25 - Enjuagar con agua corriente;
- 10 inmersiones en Alcohol 95 % v/v;
- Sumergir en solución OG-6 durante 30 segundos;
- 10 inmersiones en alcohol 96 % v/v;
- Sumergir en solución de eosina durante 1 minuto;
- 30 - 10 inmersiones en alcohol 96 % v/v;
- 10 inmersiones en alcohol 86 % v/v; y
- 10 inmersiones en xilol

Las preparaciones se analizaron por personal entrenado y utilizando una codificación y a ciego simple para eliminar el sesgo del observador.

35

Las muestras se identificaron en las siguientes fases: diestro, proestro, estro, metaestro, anestro o no evaluable. La ciclicidad de las cuatro fases en periodos de 4 a 6 días, son indicadores de un ciclo estral normal, mientras que la ausencia de esta ciclicidad y la persistencia en fases anestro, diestro o proestro son indicadores de la ausencia del ciclo estral.

De los 10 ratones hembra sometidos a estudio, en la Tabla 1 se resumen las fases del ciclo estral de los frotis vaginales realizadas a 6 de estos ratones hembras IRS2^{-/-}.

Tabla 1

<u>Nº</u> <u>Ratón</u>	<u>Tiempo (días)</u>								
	<u>-8</u>	<u>-5</u>	<u>-2</u>	<u>-1</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>14</u>	<u>15</u>	<u>22</u>
<u>72</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>E-M</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>A</u>
<u>898</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E-M</u>	<u>M</u>	<u>M</u>
<u>926</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>E-M</u>	<u>E-M</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>P</u>
<u>928</u>	<u>D-P</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E-M</u>	<u>M</u>	<u>A</u>
<u>942</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>E-M</u>	<u>E-M</u>	<u>A</u>	<u>D</u>
<u>972</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>:</u>	<u>P</u>	<u>M</u>	<u>M</u>	<u>:</u>	<u>D</u>	<u>D</u>

Las fases del ciclo estral son las siguientes: A: Anestro; D: diestro; P: Proestro; E: Estro; y M: metaestro.

Las fases del ciclo estral encontrados en los frotis vaginales de los ratones hembras IRS2^{-/-} de la Tabla 1 muestran que durante el periodo de pre-tratamiento todos los ratones se encontraban en fase proestro (P) o diestro (D), es decir en ausencia de ciclo estral.

Mientras que tras el inicio de la administración de tungstato, se observa que los ratones hembras IRS2^{-/-} se encuentran en fases tardías del ciclo estral, estro (E) y metaestro(M), lo que es indicador de la recuperación del ciclo estral normal.

Estos resultados indican que la administración de una sal de tungsteno (VI) permite la recuperación rápida (al séptimo día de tratamiento) del ciclo estral en ratones hembra infértiles IRS2^{-/-} no diabéticas en el 100% de ratones analizados.

5 Resultados del Estudio de implantación y embarazo

Transcurrido el periodo de cruce del método del apartado B, las hembras fueron sacrificadas y se llevaron a cabo biopsias en busca de indicios de embarazo.

En la tabla 2 se resume la edad en el momento del tratamiento, si hubo embarazo y el número de embriones por hembra.

Tabla 2

Nº Ratón	Edad (meses) al inicio del		Embarazo	Número de embriones Implantados o crías nacidas
	tratamiento	cruce		
72	10	12	SI	1 cría
942	10	12	SI	8 crías
928	10	12	SI	7 embriones
931	10	12	SI	3 crías
898	10	12	SI	7 embriones
900	10	12	NO	-
921	10	12	SI	6 embriones
926	10	12	SI	8 crías
972	8	10	NO	-
973	8	10	SI	7 embriones

Los resultados de la Tabla 2 muestran que mientras que la tasa de embarazo de los ratones hembra IRS2^{-/-} sin tratar es del 9%, la tasa de embarazo de los ratones hembra IRS2^{-/-} tratados con tungstato se incrementa hasta el 80%.

Además, estos resultados también muestran que la media de crías/embriones implantados por ratón hembra embarazo es de aproximadamente 5, número que se puede considerar comparable al número de crías de un ratón hembra.

- 5 Así, los resultados de las Tablas 1 y 2 demuestran que una sal de tungsteno (VI) es un tratamiento eficaz para la recuperación de la ovulación y/o el aumento de la implantación del oocito. Así, la administración de una sal de tungsteno (VI) tal y como se define en la presente invención es eficaz para el tratamiento de la infertilidad en mamíferos hembras no diabéticos.

10

EJEMPLO 3. ESTUDIO DE GLUCEMIA Y PESO CORPORAL

A. Animales

6 ratones hembra IRS2^{-/-} de edades comprendidas entre 6 y 8 semanas.

Los ratones hembras se estabularon en condiciones normales, es decir ciclo luz/oscuridad

- 15 12h y temperatura y humedad controladas. Los animales se alimentaron a voluntad (también denominado *ad libitum*) con dieta de pienso estándar.

B. Método

Fase de tratamiento

Tras un periodo de aclimatación, el tungstato sódico fue administrado en el agua de bebida (*ad libitum*) mediante una solución de 2 mg/ml de tungstato sódico dihidrato (comercializado por Carlo Erba) en agua destilada tras la fase de pre-tratamiento (día 0 de tratamiento) y durante 12 días.

20

C. Resultados

- 25 En los días 0, 2, 5, 7, 9 y 12 del período de tratamiento se monitorizó el peso corporal, y tras las 6 horas de ayuno de cada uno de los días mencionados anteriormente se determinó la glucosa en sangre, mediante la extracción de sangre de la vena caudal y con un sensor de glucosa (AccuTrend glucose sensor Roche. Mannheim, Germany).

- 30 En la tabla 3 se resumen los niveles de glucemia expresados en mg/dl, y en la tabla 4 se resume el peso corporal de los ratones en estudio expresada en gramos.

Tabla 3

Glucemias (mg/dl)	R1327	R1345	R1347	R1354	R1376	R1381	Promedio
-------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	----------

Día 0	146	129	115	126	141	112	128,17
Día 2	136	128	118	110	105	107	117,33
Día 5	125	142	114	111	137	105	122,33
Día 7	140	110	106	89	133	135	118,83
Día 9	125	153	109	108	131	125	125,17
Día 12	136	116	111	86	123	141	118,83

Tabla 4

Peso corporal (g)	1327	1345	1347	1354	1376	1381	Promedio
Día 0	22,7	15,33	18,21	16,5	13,99	15,45	17,03
Día 2	22,9	14,84	18,98	17,01	14,18	16,04	17,33
Día 5	22,61	14,89	18,2	16,61	13,79	15,72	16,97
Día 7	22,42	15,07	17,81	16,35	13,74	15,66	16,84
Día 9	22,85	15,56	17,9	16,89	14,5	16,39	17,35
Día 12	23,15	15,91	18,24	17,19	14,92	16,89	17,72

Los resultados de la Tabla 3 y 4 muestran que durante la administración de tungstato sódico no se observan variaciones en el peso corporal ni en la glucemia en los primeros 12 días de tratamiento, el mismo período durante el cual a partir del 7 día de tratamiento ya se consigue restablecer la ovulación en los ratones hembras ensayados (cf. Tabla 1).

Así, los resultados de las Tablas 1 a 4 demuestran que una sal de tungsteno (VI) es un tratamiento eficaz para la recuperación de la ovulación y/o el aumento de la implantación del oocito, de manera independiente de cambios en el peso corporal y cambios en el metabolismo de los carbohidratos. Así, se demuestra que la administración de una sal de tungsteno (VI) tal y como se define en la presente invención o una composición que contiene tal sal de tungsteno (VI) tiene un efecto directo sobre el sistema reproductor femenino y por lo tanto es eficaz para favorecer la fertilidad y la reproducción normal en mamíferos hembra no diabéticos.

EJEMPLO 4. ESTUDIO DE LA ADHERENCIA EMBRIONARIA EN EL ENDOMETRIO

A. Modelo

Para determinar el efecto del tungstato sódico sobre la receptividad endometrial, se utilizó un modelo de adhesión embrionaria humano-humano “in vitro”, compuesto de la línea celular endometrial HEC1-A y la línea celular de trofoectodermo humano JEG-3.

5

La línea JEG-3, línea celular que simula las células del trofoectodermo de un embrión humano, son células que se crecen en monocapa en el laboratorio, usando placas de baja adherencia, son capaces de formar esferoides que simulan al embrión humano; esta es una de las líneas celulares más usadas para realizar ensayos de adhesión embrionaria in vitro

10 B. Método

Las líneas celulares se adquirieron comercialmente (American Type Culture Collection (ATCC); Rockville, MD, USA) para realizar los experimentos de adherencia embrionaria en el endometrio. Se descongelaron y expandieron durante 4 pases para disponer de suficientes células para realizar todos los ensayos.

15

Las células HEC1-A se plantaron en placas de 24 pocillos y cultivaron con medio de cultivo McCoy 5A, suplementado con 10% suero fetal bovino y 0,1% de antibióticos (fungizona y penicilina), hasta llegar a una confluencia del 90%. Tras alcanzar la confluencia se añadió al medio de cultivo tungstato sódico, a una concentración final de $10\mu M$, así como Withaferin A (como control, compuesto que evita la adhesión embrionaria) o medio de cultivo (datos de adhesión basal), sin ningún componente adicional, durante 24 horas.

20

Las células JEG-3 se plantaron en placas de baja adhesividad con medio de cultivo ‘Eagle’s minimal essential medium’ (EMEM), suplementado con 10% suero fetal bovino y 0,1% de antibióticos (fungizona y penicilina). 24 horas antes del ensayo de adhesión se realizó la formación de los esferoides trofoblásticos JEG-3 a partir de este cultivo. Para ello, se suspendieron en un Erlenmeyer en agitación células JEG-3 en el medio previamente descrito a una concentración de 6×10^5 células/6ml. Los esferoides resultantes se recogieron para el ensayo de adhesión.

25

Para el ensayo de adhesión, tras 24h de cultivo de las células HEC-1A con con medio de cultivo añadiendo tungstato sódico, Withaferin A o sin adicionar ningún tratamiento, se cambió el medio de cultivo por medio de cultivo fresco sin tratamientos en estudio. Se añadieron los esferoides de trofoectodermo sobre la monocapa de células HEC-1A, colocando de 6 a 10 esferoides por pocillo. La adhesión de los esferoides se midió a los 60 minutos, contabilizando como esferoide no adherido aquel que se encontraba flotando en el

30

35

medio de cultivo y esferoide adherido el que no se encontraba flotando. El examen se realizó con un microscopio invertido (Nikon Diaphot 300; Nikon Corp., Tokyo, Japan). El ensayo se realizó por triplicado.

5 C. Resultados

Los resultados obtenidos están recogidos en la tabla 5. Se observó un mayor porcentaje de adhesión embrionaria en las condiciones en las que las líneas HEC-1A fueron tratadas con el tungstato sódico frente a aquellas en las que no lo estuvo. No se observa ninguna adhesión en las células tratadas con el control negativo (C-) Withaferrin A.

Tabla 5

	Tasas Absolutas de Adhesión			
	Exp1	Exp2	Exp3	Media
Adhesión Basal	12%	48%	31%	30%
Tungstato sódico 10 μ M	31%	65%	35%	44%
Withaferrin A (C-)	0%	0%	0%	0%

COMPOSICIONES PARTICULARES DE LA INVENCION

A continuación se preparan composiciones según la invención, a modo ilustrativo. En ningún caso deben ser interpretadas como limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLO 5

Se preparan comprimidos recubiertos con la siguiente composición:

Celulosa microcristalina PH200 (Diluyente/deslizante) 250,00 mg

Sílice coloidal anhidra (Deslizante/adsorbente) 3,00 mg

Estearato de magnesio (Lubrificante) 5,00 mg

Talco (Lubrificante) 7,00 mg

Opadry® blanco (Opadry® y-1-7000 White)(*) (Película de recubrimiento) 8,00 mg

Tungstato sódico dihidratado 200,00 mg

(*) Mezcla de hidroxipropilmetilcelulosa, polietilenglicol 6000 y dióxido de titanio (E-171)

EJEMPLO 6

Se preparan comprimidos efervescentes con la siguiente composición:

Sorbitol, aspartamo, sucralosa y xilitol (edulcorantes) 0,025mg por cada 10 mg

Carbonato cálcico 0,350mg por cada 10 mg

Ácido cítrico (acidulante) 0,650mg por cada 10 mg

Carbonato ácido de sodio (corrector de la acidez) 0,350mg por cada 10 mg

Aroma de naranja 0,25mg por cada 10 mg

Sal de tungsteno

Ejemplo 7

5 Se preparan cápsulas de gelatina con la siguiente composición:

Nifedipina 6 mg

Goma de xantano 5 mg

Sabor de naranja 0,3 mg

Acido cítrico 0,4 mg

10 Gelucire 44/14 90 mg

Celulosa microcristalina PH10 (Diluyente) 92,00 mg/cápsula

Tungstato sódico dihidratado 100,00 mg/cápsula

REIVINDICACIONES

1. Uso de una sal de tungsteno (VI) o un solvato de la misma, para la elaboración de un medicamento para favorecer la fertilidad y la reproducción normal en un mamífero hembra no diabético.
2. El uso de una sal de tungsteno (VI) según la reivindicación 1, donde la administración de dicha sal se realiza en una dosis diaria de al menos 0,001 mg hasta una máxima de 1000 mg de sal de tungsteno (VI) por cada kg de peso corporal del mamífero hembra.
3. El uso de una sal de tungsteno (VI) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, donde el mamífero es humano.
4. El uso de una sal de tungsteno (VI) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha sal comprende un anión de tungsteno (VI) y un catión dietéticamente o farmacéuticamente aceptable.
5. El uso de una sal de tungsteno (VI) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el catión es un catión alcalino o alcalinotérreo.
6. El uso de una sal de tungsteno (VI) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque el catión se selecciona entre el grupo que consiste en sodio, potasio, magnesio, calcio y zinc.
7. El uso de una sal de tungsteno (VI) según la reivindicación 6, caracterizada porque es el catión es sodio.
8. El uso de una sal de tungsteno (VI) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque el anión de tungsteno (VI) se selecciona de los iones WO_4^{2-} , HWO_4^- , $\text{W}_2\text{O}_7^{2-}$ y HW_2O_7^- .
9. El uso de una sal de tungsteno (VI) según la reivindicación 8, caracterizada porque el anión es WO_4^{2-} .
10. El uso de una sal de tungsteno (VI) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el solvato es el dihidrato.

11. El uso de una sal de tungsteno (VI) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el mamífero femenino no diabético se selecciona del grupo de mamíferos que necesitan restaurar y/o potenciar la ovulación, mejorar la calidad del oocito y del embrión, aumentar la implantación del cigoto en la pared uterina, regular una alteración del eje hipotalámico-hipofisario, incluyendo síndrome de ovario poliquístico, síndrome metabólico, hiperprolactinemia, endometriosis, hipotiroidismo, esclerosis múltiple, lupus eritematoso, cirrosis, artritis reumatoide, celiaquía, fallo renal crónico, causas idiopáticas y desórdenes alimentarios, tales como anorexia nerviosa y bulimia.

5

10