

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 807**

51 Int. Cl.:

A61K 31/165 (2006.01)

A61K 31/4045 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

A61P 15/08 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61B 17/42 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2013 PCT/EP2013/060872**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13178587**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2013 E 13727084 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2854790**

54 Título: **Uso de n-acetil-5-metoxitriptamina o análogos de la misma para promover el mecanismo de implantación del embrión y composiciones y medios de cultivo relacionados**

30 Prioridad:

28.05.2012 IT MI20120913

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

12.02.2019

73 Titular/es:

**ARES TRADING SA (100.0%)
Zone Industrielle de l'Ourietzaz
1170 Aubonne, CH**

72 Inventor/es:

MAXIA, NICOLETTA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 699 807 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

Uso de n-acetil-5-metoxitriptamina o análogos de la misma para promover el mecanismo de implantación del embrión y composiciones y medios de cultivo relacionados

5 La presente invención se refiere a N-acetil-5-metoxitriptamina (melatonina) y/o uno de sus análogos según se define en las reivindicaciones, para el uso en el campo médico o veterinario en la reproducción asistida para promover el mecanismo de implantación del embrión, y en particular para la prevención de un fallo de implantación en el útero, mediante la administración tópica de una cantidad eficaz en una hembra de mamífero que necesite este tratamiento, y composiciones, medios de cultivo y dispositivos médicos relacionados.

10 La implantación del embrión humano en el útero es un mecanismo complejo, que implica tanto al embrión como al epitelio endometrial. Las fases de aposición, adhesión e invasión implican una multiplicidad de moléculas, que representan un papel único en el proceso, el diálogo molecular entre el concebido y el endometrio implica interacciones entre células y entre células y factores bioquímicos.

Estos mecanismos, si se expresan o inhiben adecuadamente, son de ayuda para determinar el estado de receptividad o arreceptividad del endometrio frente al embrión.

15 El estado de receptividad o arreceptividad endometrial, aunque es un concepto ampliamente compartido, es difícil de definir clínicamente: la normalidad histológica del endometrio no implica necesariamente una normalidad funcional; por otra parte, la expresión temporal y espacial de estructuras endometriales particulares, llamadas pinopodos, es muy indicativa del propio estado de receptividad.

20 La implantación es una secuencia compleja de señales que son cruciales para el embarazo; se supone que un gran número de mediadores moleculares bajo la influencia de señales ováricas está implicado en la interacción embrioendometrial. Estos mediadores comprenden una amplia gama de moléculas como hormonas, citocinas, factores de crecimiento, lípidos, moléculas de adhesión, etc. (1).

25 El fallo en la implantación en las tecnologías de reproducción médicamente asistida (MAR, por sus siglas en inglés) todavía sigue siendo un problema sin resolver y se considera una de las principales razones de esterilidad en mujeres sanas. Considerando entonces que el porcentaje de implantación de las técnicas de MAR es de aproximadamente 25%, se considera que la receptividad uterina inadecuada es responsable de aproximadamente dos tercios de todos los fallos (para un tercio, se considera que es responsable el embrión) (2).

30 El endometrio es receptor de la invasión del blastocisto durante un intervalo de un tiempo limitado y se define como "ventana de implantación". El "diálogo" para la sincronización entre "las fases de primera ovulación de crecimiento embrionario - las modificaciones celulares del epitelio endometrial para la implantación" se mantiene mediante una serie de mensajeros hormonales bioquímicos.

35 Durante la "ventana de implantación", el epitelio endometrial expresa, a través de un control hormonal y bioquímico, algunas estructuras llamadas pinopodos, capaces de permitir la adhesión y la invasión del blastocisto. La ventana de implantación se caracterizaría, según estudios de microscopía electrónica (3), por la máxima expresividad de los pinopodos.

La formación de pinopodos se considera un marcador específico de la receptividad endometrial, aparecen aproximadamente una semana después de la ovulación, pero su expresión completa cambia de paciente a paciente y parece mantenerse solo durante un día (4).

40 La expresión de pinopodos es directamente proporcional al incremento de los niveles plasmáticos de progesterona (5).

El concepto de receptividad endometrial o "ventana de implantación", conectado a la expresión de pinopodos, aceptado unánimemente por la comunidad científica, es desde hace décadas materia de estudio para los que afrontan los problemas relacionados con la reproducción asistida.

45 En resumen: la progesterona, la hormona de progestación, es el principal mediador y alrededor de ella gira una pluralidad de otros mediadores que pueden promover la presencia de la implantación.

De lo anterior se desprende que el problema de obtener un embarazo a través de técnicas de reproducción asistida es atribuible principalmente al escaso conocimiento del fenómeno de la implantación.

Así, parece clara, también en vista de las numerosas restricciones legislativas en el campo de la reproducción asistida, la necesidad de optimizar la fase de implantación.

50 Los autores de la presente invención han encontrado ahora que uno de los mediadores capaces de tener un papel clave junto con la progesterona en la expresión de pinopodos, con muchos efectos positivos para el anidamiento embrionario, es la N-acetil-5-metoxitriptamina (melatonina).

La melatonina es producida por la glándula pineal, glándula neuroendocrina controlada por la luz; la oscuridad estimula su síntesis y secreción.

El uso de melatonina no tiene efectos secundarios o problemas de sobredosis, así como no se presenta ninguna contraindicación (6) en la bibliografía.

5 Muchas son las ventajas ya conocidas y asociadas con el uso de melatonina también en diferentes procesos, que pueden interferir positivamente con la implantación. A este respecto, existe por otra parte una correlación inversamente proporcional con el riesgo de carcinoma del endometrio y los niveles séricos de melatonina con una acción protectora comprobada.

10 Ha sido probado por algunos autores (7) que la melatonina inhibe la proliferación de células endometriales atípicas, definidas como Ishikawa, responsables del carcinoma del endometrio. A través de experimentos con radioligandos y antagonistas de melatonina tales como luzindol, los resultados del grupo de investigadores han probado que el efecto inhibitor es producido por melatonina a través de los receptores de MT2 presentes en las membranas de las células proliferativas de Ishikawa.

15 Otro aspecto determinante a considerar es el período de la menopausia, durante el cual la melatonina disminuye su producción y, en efecto, durante este período el riesgo de carcinoma endometrial es superior.

Por ejemplo, estudios *in vitro* e *in vivo* (6, 8) han mostrado una fuerte acción antioxidante de la melatonina, siendo dicha acción superior que la del manitol, de la glutatona y la vitamina E en la protección del daño oxidativo debido a radicales tóxicos hidroxilo y a otros productos celulares catabólicos que se derivan de variaciones en el metabolismo degenerativo o proliferativo y de/para la oxidación de lípidos.

20 Por otra parte, la melatonina (9-10) tiene propiedades antiestrogénicas importantes y estimula la producción de progesterona que es antitética con la acción de los propios estrógenos (altos niveles de estrógenos se asocian con un resultado peor en la técnica de reproducción asistida) (11).

25 A este respecto, se apunta que la sobreovulación a través de gonadotropinas inducidas en ciclos de MAR determina una hiperestrogenización con un incremento de la hiperplasia endometrial, un factor de riesgo significativo para el carcinoma endometrial según se menciona anteriormente.

Algunos autores (12) afirman que existe una sinergia entre las gonadotropinas coriónicas humanas (hCG) y la melatonina: en efecto, la melatonina se incrementa, al incrementar entre otras cosas la producción de progesterona (tanto *in vivo* como *in vitro*), 6-7 días después del máximo ovulatorio de hCG.

30 A este respecto, se destaca cómo el máximo posovulatorio de la melatonina coincide perfectamente con la ventana de implantación endometrial y con la formación del blastocisto (la etapa de crecimiento embrionario en la que se produce el anidamiento en el útero). La correlación positiva entre la melatonina y la progesterona y la correlación negativa entre la melatonina y el estradiol serían potenciadas por hCG: en efecto, en ausencia de la última, la melatonina tiene un efecto muy débil sobre la producción de progesterona.

35 Además, el documento CN 102250832 divulga un medio de cultivo que comprende melatonina para mejorar la tasa blastocística embrionaria, mientras que en el artículo "The effect of melatonin on *in vitro* fertilization and embryo development in mice", JOURNAL OF PINEAL RESEARCH, (200001), vol. 28, nº 1, ISSN 0742-3098, páginas 48 - 51, Shizuka Bunpei et al. se divulgan los efectos positivos de la melatonina sobre el desarrollo de embriones de ratón antes de la implantación fertilizados *in vivo*.

40 Además, en el artículo "Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos *in vitro*", JOURNAL OF PINEAL RESEARCH, (20071001), vol. 43, nº 3, ISSN 0742-3098, páginas 283 - 288, N. Rodríguez-Orsorio et al. divulgan los efectos positivos de la melatonina sobre el desarrollo de embriones porcinos obtenido mediante fertilización *in vitro*.

45 En el artículo "Anti-apoptotic effect of melatonin on preimplantation development of porcine parthenogenetic embryos", MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, (20080701), vol. 75, nº 7, ISSN 1040-452X, páginas 1127-1135, Jiho Choi et al. divulgan que la melatonina mejora la competencia de desarrollo de embriones partenogénicos y SCNT porcinos *in vitro*.

Los cuatro documentos citados anteriormente no mencionan el uso de melatonina para la expansión de pinopodos *in vitro*.

50 En un último artículo "Effect of a supplementation with myo-inositol plus melatonin on oocyte quality in women who failed to conceive in previous *in vitro* fertilization cycles for poor oocyte quality: a prospective, longitudinal, cohort study", GYNECOLOGICAL ENDOCRINOLOGY: THE OFFICIAL JOURNAL OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF GYNECOLOGICAL ENDOCRINOLOGY, LONDON: INFORMA HEALTHCARE, GB, (20111101), vol. 27, nº 11, ISSN 1473-0766, páginas 857-861, Unfer Vittorio et al. divulgan los efectos de la complementación de mioinositol y melatonina orales en la mejora de protocolos de estimulación ovárica y los resultados de embarazo en mujeres

estéiles con pobre calidad de los ovocitos. Se considera la administración oral.

5 Un objetivo de la presente invención es N-acetil-5-metoxitriptamina o uno de sus análogos seleccionado de agomelatina o 6-hidroximelatonina, para el uso en el campo médico o veterinario en la reproducción asistida para la prevención del fallo de implantación en el útero mediante la administración tópica de una cantidad eficaz en una hembra de mamífero que necesite este tratamiento.

En una realización preferida de la invención, la hembra de mamífero es una mujer que sufre esterilidad o abortos múltiples. Según una realización preferida adicional, la administración tópica de N-acetil-5-metoxitriptamina o uno de sus análogos, preferiblemente de N-acetil-5-metoxitriptamina, tiene lugar a través de irrigación endometrial o lavado uterino o lavado endometrial.

10 Todavía según una realización preferida adicional de la invención, dicha administración tópica se produce en una sola administración en el momento de la recuperación de ovocitos.

Preferiblemente, dicho principio activo está presente en una concentración que varía de 4×10^{-9} g/ml a 25×10^{-9} g/ml, aún más preferiblemente mayor de o igual a 10×10^{-9} g/ml.

15 En una realización alternativa, es posible el uso simultáneo con una terapia sistémica basada en N-acetil-5-metoxitriptamina, hCG o progesterona, o una de sus combinaciones, desde el día de la recuperación de los ovocitos.

20 En realizaciones preferidas alternativas de la presente invención, las técnicas de reproducción asistida se seleccionan del grupo que consiste en técnicas de nivel I, simples y no tan invasivas como coito dirigido o inseminación intrauterina artificial, y técnicas de nivel II o III, que son más complejas e invasivas, seleccionadas de fertilización *in vitro* (IVF, por sus siglas en inglés), fertilización *in vitro* y transferencia embrionaria (FIVET, por sus siglas en inglés), inyección intracitoplásmica de esperma (ICSI, por sus siglas en inglés), inyección intracitoplásmica de esperma morfológicamente seleccionado (IMSI) y técnicas de Tese-Tesa (extracción-aspiración de esperma testicular).

25 La fertilización artificial indica principalmente la técnica de inseminación intrauterina (IUI, por sus siglas en inglés), que es una técnica de reproducción médicamente asistida, en donde el fluido seminal se introduce dentro de la cavidad uterina. Se puede sugerir en todos esos casos de incompatibilidad entre el moco del cuello uterino y el fluido seminal, ya que permite ir más allá de la longitud de cuello uterino e insertar espermatozoides directamente en el útero. Por otra parte, se usa en caso de esterilidad inexplicable, de esterilidad masculina de grado ligero o moderado, en casos de fallos reiterados en la inducción del embarazo con estimulación de la ovulación y coito dirigido y en casos de trastornos sexuales que no permiten una relación sexual completa.

30 La fertilización *in vitro* y transferencia embrionaria (FIVET) es una técnica de MAR en la que se extraen gametos humanos, se ponen bajo cultivo y, después de la fertilización y la producción de uno o más embriones, estos se transfieren al útero. Esta técnica se sugiere en casos de:

- Patología tubárica adquirida o congénita;
- esterilidad masculina de grado moderado; endometriosis de nivel III o IV;
- esterilidad inexplicable;
- 35 - semen criopreservado en relación con la calidad seminal, posterior a la descongelación;
- fallo del procedimiento terapéutico de las técnicas de nivel I.

40 Después de la estimulación ovárica, la recuperación (RECOGIDA) de ovocitos se lleva a cabo a través de operación transvaginal, bajo control ecográfico, con anestesia local y/o sedación profunda, se efectúa una preparación del esperma y los ovocitos que se van a fertilizar se seleccionan. Posteriormente, el cultivo extracorpóreo de gametos se prepara y, después de verificar la fertilización producida, se realiza la transferencia al útero de un número definido de embriones.

La inyección intracitoplásmica de esperma (ICSI) usa diversas etapas de la FIVET. Además, en este caso, la fertilización es extracorpórea, pero tiene lugar con la inyección de un solo espermatozoide dentro del citoplasma del ovocito. A continuación, después de que se produzca la fertilización, los embriones se transfieren al útero.

45 Esta técnica se sugiere en casos de:

- esterilidad masculina de grado intenso;
- azoospermia oclusiva y secretiva (espermatozoides testiculares o epidídimo);
- fertilización fallida o reducida en ciclos previos de fertilización *in vitro* (IVF);
- ovocitos descongelados;

- número de ovocitos reducido;
- semen crioconservado en relación con la calidad seminal posterior a la descongelación.

5 Además, esta técnica se puede llevar a cabo bajo un ciclo espontáneo o a través de la inducción de crecimiento folicular múltiple y, después de haber estimulado el ovario para producir más folículos y así haber obtenido más ovocitos, se lleva a cabo la recuperación (RECOGIDA) de ovocitos a través de operación transvaginal. Simultáneamente a la RECOGIDA, se efectúa la preparación del esperma. En caso de azoospermia, las técnicas usadas para la extracción de espermatozoides son: aspiración percutánea de esperma testicular (TESA, por sus siglas en inglés), extracción de esperma testicular (TESE, por sus siglas en inglés), aspiración microquirúrgica de esperma epididimal (MESA, por sus siglas en inglés), aspiración percutánea de esperma epididimal (PESA, por sus siglas en inglés).

10 Posteriormente, tiene lugar la preparación del ovocito y la inseminación de ovocitos a través de una técnica de microinyección intracitoplásmica de un solo espermatozoide. Después de verificar que se ha producido la fertilización de cada ovocito, los embriones se transfieren al útero.

15 Un objetivo adicional de la presente invención es una composición adecuada para la administración tópica que comprende N-acetil-5-metoxitriptamina o uno de sus análogos seleccionado de agomelatina o 6-hidroxi melatonina, o su combinación como ingrediente activo, en una cantidad eficaz en una hembra de mamífero que necesite este tratamiento, junto con uno o más excipientes o adyuvantes fisiológicamente aceptables, para el uso en el campo médico o veterinario en la reproducción asistida para la prevención del fallo de implantación en el útero.

20 Preferiblemente, dicho ingrediente activo está presente en la composición en una concentración que varía de 4×10^{-9} g/ml a 25×10^{-9} g/ml, preferiblemente mayor de o igual a 10×10^{-9} g/ml.

Según una realización preferida, el ingrediente activo en la susodicha composición se formula como irrigación/lavado endometrial/uterino en un medio de cultivo celular en una concentración final que varía de 4×10^{-9} g/ml a 25×10^{-9} g/ml, preferiblemente mayor de o igual a 10×10^{-9} g/ml.

Este medio de cultivo para blastocisto puede comprender preferiblemente los siguientes componentes:

- 25
- una fuente de D-glucosa;
 - un antibiótico, preferiblemente gentamicina;
 - albúmina sérica humana;
 - aminoácidos esenciales y no esenciales, preferiblemente L-aurina;
 - sales tamponadoras seleccionadas preferiblemente entre:
- 30
- sales cálcicas: lactato cálcico, pantotenato cálcico;
 - sales sódicas: cloruro sódico, bicarbonato sódico y piruvato sódico;
 - sales potásicas: cloruro potásico, fosfato potásico;
 - sales magnésicas: cloruro magnésico, sulfato magnésico y mezclas de los mismos;
 - agua;

35 y tiene un pH entre 7,5 y 7,8.

Según una realización preferida, dicho medio de cultivo puede ser medio para blastocisto Sydney IVF®. Según una realización alternativa de la presente invención, el ingrediente activo de la composición mencionada anteriormente se formula como irrigación endometrial, lavado endometrial o lavado uterino en solución fisiológica con una concentración final que varía de 4×10^{-9} g/ml a 25×10^{-9} g/ml, preferiblemente mayor de o igual a 10×10^{-9} g/ml.

40 En las mujeres, el procedimiento de lavado de la cavidad uterina se ha usado comúnmente con el principal objetivo de establecer un diagnóstico prenatal no invasivo, innovador con respecto a los métodos invasivos tradicionales de amniocentesis y muestreo de vellosidades coriónicas [(13)(14)]. En los últimos años, esta técnica se ha aplicado para evaluar las condiciones de la cavidad uterina antes de la transferencia del embrión en los ciclos de reproducción asistida. La aplicación de este procedimiento consiste en la inserción en el útero de una solución tamponadora con el

45 objetivo de recoger secreciones uterinas y evaluar sus componentes biológicos orgánicos e inorgánicos. Tiene el propósito de identificar posibles marcadores, predictivos del éxito de la implantación [(15)(16)(17)(18)].

Todavía preferiblemente, dicha composición adecuada para la administración tópica a través de lavado uterino comprende además aminoácidos esenciales y no esenciales y sales tamponadoras. Preferiblemente, dichas sales tamponadoras son sales de calcio, sodio, potasio y magnesio, y mezclas de las mismas. El uso de sales tamponadoras

y aminoácidos se proporciona para producir una formulación con un pH comprendido entre 7 y 8 (preferiblemente entre 7,5-7,8), para replicar el microentorno adecuado para el embrión (y similar al del medio de cultivo en el que el embrión crece antes de la transferencia al útero).

5 Según una realización alternativa, las composiciones de la invención se pueden formular como un gel adecuado para la administración uterina, más precisamente para la administración *in situ* en la cavidad uterina, preferiblemente con un dispositivo médico que es un dispositivo intrauterino "en forma de T". También es posible prever formulaciones en gel de liberación controlada para la administración mucosa.

10 Considerando que la técnica de lavado uterino que se describe anteriormente revelaba ser una práctica no invasiva y que permite la restauración de las condiciones fisiológicas uterinas a través de la retirada mecánica de secreciones, que puede alterar las condiciones de implantación, la invención tiene como un objetivo adicional un dispositivo médico para el lavado uterino que comprende un recipiente estéril precargado o para ser cargado con una composición como la definida anteriormente.

15 Más precisamente, el dispositivo según la presente invención se puede cargar en el momento del uso con una solución estéril adecuada para el lavado uterino o endometrial complementado con el principio activo melatonina o uno de sus análogos según la presente invención ya formado o se puede cargar con tal solución estéril complementada justo en el momento de uso con el principio activo. Según una realización preferida, el recipiente estéril es desechable. Más preferiblemente, el recipiente estéril (preferiblemente un recipiente estéril desechable) se precarga con solución fisiológica complementada con melatonina (en una concentración que varía de 4×10^{-9} g/ml a 25×10^{-9} g/ml, preferiblemente mayor de o igual a 10×10^{-9} g/ml), sales tamponadoras y aminoácidos tal como para producir una
20 formulación con un pH comprendido entre 7-8, preferiblemente entre 7,5 y 7,8.

La lavado uterino se realizará con la ayuda de un catéter después de la recogida con guía ecográfica. La siguiente transferencia o implantación de embriones tendrá lugar de media tres días después del lavado (2-5 días).

Por lo tanto, según realizaciones preferidas de la invención, el dispositivo médico según la invención puede comprender además un catéter flexible estéril, preferiblemente con un solo orificio terminal.

25 La esterilidad de los componentes del dispositivo médico se alcanza preferiblemente a través de carga estéril o esterilización final, tal como un tratamiento de calentamiento o a través de tratamiento con rayos gamma.

Además, el dispositivo médico puede estar acompañado por instrucciones para el uso en diversas técnicas de MAR.

30 El propósito del dispositivo médico es el de retirar sustancias oxidantes y posibles productos secretados en respuesta a la estimulación precedente a las técnicas de MAR y así de restaurar la composición fisiológica del exudado endometrial. El objetivo es evitar que estas sustancias oxidantes y productos secretados reduzcan el porcentaje de implantación en pacientes sometidas a MAR. Como se anticipó anteriormente, el uso de sales tamponadoras y aminoácidos se proporciona para fijar un pH comprendido entre 7-8, preferiblemente entre 7,5 y 7,8, para replicar el microambiente adecuado para el embrión. La adición de melatonina, además de los efectos mostrados dentro de la presente invención, ejerce un efecto antioxidante muy fuerte y una acción de seguridad frente a células endometriales del daño oxidativo debido a radicales tóxicos y otros productos catabólicos. Preferiblemente, dicho recipiente estéril
35 desechable se selecciona de una jeringa, un dosificador, un cartucho para autoinyección/una pluma.

40 Según realizaciones particularmente preferidas de la invención, la jeringa es de cierre tipo Luer de 3 ml hecha de policarbonato o vidrio de borosilicato. Cuando se usa una jeringa de cierre tipo Luer, el catéter intrauterino posiblemente asociado con el dispositivo médico según la invención está provisto de una junta hembra de cierre tipo Luer para acoplarse con la jeringa.

Alternativamente, si se usa un sistema de autoinyección o una pluma (de tipo insulina), se puede usar un cartucho de vidrio de 3 ml de vidrio de borosilicato.

Todavía preferiblemente, dicho recipiente estéril desechable está precargado con un volumen de 1,5 ml de solución de lavado que contiene:

- 45
- 10×10^{-9} g/ml (10 ng/ml) de melatonina
 - aminoácidos esenciales y no esenciales
 - sales cálcicas
 - sales potásicas
 - sales magnésicas
- 50
- un pH comprendido entre 7,5-7,8 y una osmolaridad comprendida entre 280-290 mOsm/kg.

El dispositivo médico que se ilustra anteriormente se puede usar como una sola administración como lavado

endometrial en el momento de la recuperación de ovocitos en protocolos de reproducción asistida médica.

La invención también se refiere a un medio de cultivo celular *in vitro* o *in vivo*, que comprende los siguientes componentes:

- una fuente de D-glucosa;
- 5 - un antibiótico, preferiblemente gentamicina;
- albúmina sérica humana;
- aminoácidos esenciales y no esenciales, preferiblemente L-aurina;
- sales cálcicas: lactato cálcico, pantotenato cálcico;
- sales sódicas: cloruro sódico, bicarbonato sódico y piruvato sódico;
- 10 - sales potásicas: cloruro potásico, fosfato potásico;
- sales magnésicas: cloruro magnésico, sulfato magnésico;
- agua;

15 caracterizado por que comprende además N-acetil-5-metoxitriptamina o uno de sus análogos seleccionado de agomelatina o 6-hidroximelatonina, o su combinación, en donde dicho ingrediente activo está presente en una concentración que varía de 4×10^{-9} g/ml a 25×10^{-9} g/ml, preferiblemente mayor de o igual a 10×10^{-9} g/ml.

Representa un objetivo adicional de la presente invención un medio de cultivo celular para la expansión de pinopodos y el logro de un estudio modélico *in vitro*.

Este medio de cultivo celular se puede usar además para cultivos embrionarios, para conseguir, por ejemplo, un medio de cultivo que se usa para transferir el embrión al útero, insertándose así dicho medio en el útero.

20 Aspectos particularmente ventajosos para el uso según la presente invención están conectados con la vía propuesta de administración tópica, que no compromete el ciclo de tratamiento de MAR, siendo esta vía mucho menos invasiva que la biopsia endometrial, ya aplicada a mujeres sometidas a un ciclo de MAR (13).

25 Finalmente, gracias a las propiedades de inhibición de la síntesis al lado de las prostaglandinas (14), que son típicas de la melatonina, este lavado reduce las contracciones uterinas y promueve adicionalmente la implantación. La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualesquiera asuntos que estén fuera del alcance de las reivindicaciones se proporcionan solamente para información.

La presente invención se describirá ahora de modo ilustrativo según dos realizaciones preferidas, con referencia particular a las figuras adjuntas, en las que:

30 - la Figura 1 ilustra el endometrio antes del tratamiento a través de la composición según la presente invención, por lo tanto en ausencia de pinopodos;

- la Figura 2 ilustra el endometrio 1/2 días después del tratamiento a través de la composición según la presente invención: empieza a aparecer la formación de pinopodos;

- la Figura 3 ilustra el endometrio 3/4 días después del tratamiento a través de la composición según la presente invención: crecimiento máximo de pinopodos;

35 - la Figura 4 ilustra el endometrio 5/6 días después del tratamiento a través de la composición según la presente invención: empieza la escisión de los pinopodos, que parece ser irregular (apoptosis celular).

- la Figura 5 muestra los resultados del análisis por FACS (medida de intensidad de fluorescencia) de la actividad antioxidante de melatonina, agomelatina y 6-hidroximelatonina (170 nM correspondiente a 40×10^{-9} g/ml) llevado a cabo a concentraciones de H_2O_2 de 20 μ M y 200 μ M;

40 - la Figura 6 muestra los resultados del ensayo de apoptosis (% de muerte celular) llevado a cabo a diferentes concentraciones (80 nM, 170 nM, 340 nM; correspondientes respectivamente a 18×10^{-9} g/ml, 40×10^{-9} g/ml, 80×10^{-9} g/ml) de melatonina, agomelatina y 6-hidroximelatonina.

45 Meramente a modo de ejemplo, se presentan posteriormente en la presente memoria los estudios comparativos llevados a cabo (*in vitro* e *in vivo*) por los autores de la presente invención para evaluar el porcentaje de incremento de implantación embrionaria humana en técnicas de MAR a través del uso de melatonina en diferentes soluciones.

Ejemplos

Ejemplo 1: Estudios *in vivo*

Materiales y métodos

Soluciones de melatonina usadas para lavados endometriales

5 La melatonina (o N-acetil-5-metoxitriptamina; Número de CAS 73-31-4) usada se ha obtenido en Farmalabor como producto en forma de polvo con un título $\geq 99\%$.

Se han llevado a cabo dos pruebas que proporcionan la administración de melatonina (concentración 10×10^{-9} g/ml) a través de lavado endometrial en:

10 1) Medio para blastocisto, medio de cultivo Sydney IVF® (Prueba clínica 1) suministrado por Cook Ireland Ltd (Número de catálogo G20722 y G20929). Dicho medio de cultivo se usa normalmente para mejorar la escisión, la diferenciación y la expansión *in vitro* del blastocisto. El medio contiene D-glucosa, los 20 L-aminoácidos esenciales, L-aurina, gentamicina, albúmina sérica humana, lactato cálcico, pantotenato cálcico; cloruro sódico, bicarbonato sódico y piruvato sódico; cloruro potásico, fosfato potásico; cloruro magnésico, sulfato magnésico; agua purificada. Características adicionales del medio de cultivo:

- 15 - pH: 7,5 - 7,8 (uso de tampón de bicarbonato)
- Osmolaridad: 280-290 mOsm/kg
- Endotoxinas: < 0,4 EU/ml
- MEA: $\geq 80\%$

2) solución fisiológica (Prueba clínica 2)

20 Análisis estadístico:

Se ha llevado a cabo un análisis estadístico (IMPRUN.TXT) de regresión lineal con más variables.

Métodos estadísticos:

25 El papel del número de embriones implantados, de su calidad y del procedimiento de lavado con la solución que contiene melatonina en el incremento de la posibilidad de embarazo se ha computado por medio de regresión logística no condicional, mediante ajuste según la edad de la madre.

30 La relación entre la posibilidad de embarazo asociada con cada procedimiento (número de embriones, su calidad y la aplicación del procedimiento de lavado con solución salina o medio para blastocisto que contiene melatonina) y la posibilidad de embarazo con referencia respectivamente a la categoría inferior de número de embriones (uno), a la calidad menor que óptima de los embriones implantados o a la ausencia del procedimiento de lavado, se ha definido como Proporción de probabilidades (OR, por sus siglas en inglés), y se ha computado a través de regresión logística no condicional, mediante ajuste según la edad de la madre.

En la regresión logística, la OR corresponde al antilogaritmo sobre una base natural del coeficiente de regresión β asociado con cada covariable en el modelo de regresión.

35 El valor así calculado expresa por lo tanto la ventaja obtenida a través de cada procedimiento, independientemente de las otras condiciones.

Los intervalos de confianza de dos colas al 95% (IF95%) de la OR se han calculado a través de la fórmula de Wald ($e^{\beta \pm (z_{\alpha/2} * se_{\beta})}$).

Controles de esterilidad (medio de cultivo)

40 Para llevar a cabo los controles de esterilidad del medio de cultivo complementado con melatonina, se ha usado el dispositivo BACT/ALERT 3D-60 (BIOMERIEUX). Las botellas de cultivo de Bact/ALERT se aplican a sistemas de detección microbiana en procedimientos cualitativos para recuperar y detectar (bacterias) anaerobias y aerobias opcionales en la sangre y otros fluidos normalmente estériles en el medio para blastocisto usado en la presente experimentación.

45 El sistema Bact/ALERT de detección microbiana se usa para determinar si hay microorganismos presentes en las muestras de sangre o de otros fluidos normalmente estériles como el medio para blastocisto usado en la presente invención, con presunta bacteremia. El sistema Bact/ALERT y las botellas de cultivo ofrecen un sistema de detección microbiana y un medio de cultivo con condiciones ambientales y nutricionales adecuadas para microorganismos comúnmente presentes en infecciones sanguíneas y otros fluidos normalmente estériles.

Las botellas inoculadas (desde un mínimo de 5 ml hasta un máximo de 10 ml de la muestra en cuestión) se incuban en el dispositivo, donde se someten a comprobación continua a fin de detectar un posible crecimiento de microorganismos en las botellas de Bact/ALERT.

5 El sistema Bact/ALERT de detección microbiana usa un sensor colorimétrico y luz reflejada para comprobar la presencia y la producción de dióxido de carbono (CO₂) disuelto en el medio de cultivo.

Los microorganismos posiblemente presentes en la muestra metabolizan los sustratos en el medio de cultivo produciendo dióxido de carbono. La producción de CO₂ determinada por el crecimiento de microorganismos induce al sensor verde-azul permeable a los gases presente en el fondo de cada botella de cultivo a adquirir un color amarillo.

El color más claro indica un incremento de las unidades de reflectancia de comprobación del sistema.

10 La reflectancia de la botella se comprueba y se sigue mediante el dispositivo cada 10 minutos.

Las botellas de cultivo se establecen como positivas o negativas mediante el software de tratamiento de sistemas Bact/ALERT de detección microbiana después de 6 días de incubación.

No es necesaria intervención hasta el momento en el que el dispositivo Bact/ALERT avisa de que una botella de cultivo es positiva o negativa.

15 Antes de llevar a cabo cualquier cultivo de irrigación endometrial, se han llevado a cabo pruebas para probar la esterilidad en 2-4-6 días y, una vez que se encontraba un cultivo negativo, se usaba en el útero.

Criterios de inclusión

Se han usado criterios de inclusión restringidos para seleccionar la población de pacientes implicada en los estudios:

3) edad ≥ 20 y < 44 años

20 4) índice de masa corporal (BMI, por sus siglas en inglés) ≥ 20 y ≤ 28 kg/m²

5) FSH basal ≤ 19 UI/l

6) Factores masculinos y femeninos

Pacientes

25 Las pacientes implicadas en los dos estudios clínicos, después de recoger la autorización por escrito, se han sometido a reproducción asistida.

En este primer estudio clínico multicéntrico aleatorizado de dos ramas (grupo de control y de estudio), estaban implicadas aproximadamente 430 pacientes/rama.

Las pacientes que se someten a fertilización asistida se han aleatorizado el día de recuperación de ovocitos en tres grupos:

30 Grupo A: 430 pacientes para ser sometidas a irrigación endometrial con 1,5 ml de solución fisiológica (controles).

Grupo B: 436 pacientes para ser sometidas a irrigación endometrial con una solución de 1,5 ml de medio de cultivo complementado con una concentración final de melatonina (10x10⁻⁹ g/ml).

Grupo C: pacientes no sometidas a irrigación endometrial.

35 El estudio se ha llevado a cabo implicando a pacientes en varios centros privados especializados en MAR, tales como the Center of BRA, the Promea Center of Torino and Cagliari, the Genera Center of Perugia y the Polyclinic Public Center of Bari. Se ha enviado a estos centros el medio de cultivo complementado con melatonina después de haberse sometido a pruebas de esterilidad para llevar a cabo el siguiente protocolo de tratamiento.

40 Después de la inclusión *in vivo* para fertilización asistida mediante irrigación endometrial con concentración conocida (concentración final de 10x10⁻⁹ g/ml) de melatonina en el momento de la recuperación de ovocitos, las pacientes se sometieron a visualización guiada por ultrasonidos relacionada del diámetro del estrato líquido creado en el fondo del útero.

El segundo estudio clínico con un solo centro prospectivo implicaba a 64 pacientes en el grupo de control y 92 pacientes en el grupo de estudio.

45 En dicho estudio, se ha administrado melatonina en solución fisiológica estéril, a través de lavado endometrial dentro de la cavidad uterina de las pacientes, después de la recuperación de los ovocitos.

Lavado endometrial

5 Brevemente, el tratamiento consiste en la irrigación endometrial dentro de la cavidad uterina sin ninguna célula en cocultivo, usando la solución fisiológica o el medio de cultivo mezclado con melatonina con una concentración final de 10×10^{-9} g/ml (se han efectuado estudios precedentes con un tercio y la mitad de la concentración final, mantenidos a continuación, sin dar los mismos resultados - datos no mostrados).

10 Después de la recuperación de los ovocitos, (el tiempo correspondiente a la ovulación después de la administración de hCG en los protocolos de MAR) después de haber controlado la hemostasia vaginal, se ha unido una jeringa estéril desde 2,5 ml a un catéter intrauterino de una sola luz con abertura apical y el medio de cultivo (medio de blastocistos) o la solución fisiológica se ha succionado, modificada a través de la adición de melatonina hasta un volumen de 1,5 ml.

En el caso de la solución fisiológica, el catéter se puede precargar con solución fisiológica complementada con melatonina.

El catéter se ha introducido en el orificio uterino interno con las mismas etapas a través de las cuales el operario lleva a cabo la transferencia embrionaria (ET) convencional.

15 A continuación, se ha inyectado lentamente la solución salina complementada con melatonina o el medio modificado y, al final de la irrigación, el grosor del estrato líquido endocavitario se ha medido mediante ecografía transabdominal (el lavado y la ecografía deben ser simultáneos, el estrato líquido llega a aproximadamente 10 mm y a continuación el líquido desaparece rápidamente).

Resultados

20 Estudio clínico 1

El estudio *in vivo* multicéntrico implicaba a 863 pacientes sometidas a fertilización asistida y a irrigación endometrial (medidas ecográficas del estrato líquido) con melatonina y 3-4 días después de eso, se han sometido a transferencia embrionaria. Para lo último, se ha calculado el IC (intervalo de confianza) a través de análisis estadístico (IMPRUN. TXT) de regresión lineal con más variables de 95%.

25 El análisis monofactorial muestra que la implantación de 3 embriones implica un incremento significativo, igual a aproximadamente 3 veces (OR=2,8, IF 95% 1,7-4,4) la posibilidad de embarazo.

En cambio, un número de dos embriones no parece ser suficiente para incrementar la posibilidad de embarazo (OR=1,0, IF 95% 1,7-4,4).

30 Por otra parte, también la calidad óptima de los embriones implantados parece ser un factor importante en el incremento de la posibilidad de embarazo (OR = 2,9, IF 95% 1,8 - 4,7). En el análisis monofactorial, el mismo grado de relevancia parece estar asociado con el uso del procedimiento de irrigación (OR = 2,2, IF 95% 1,6 - 2,9).

El análisis multifactorial permite controlar el efecto independiente de cada variable, por lo tanto, de forma totalmente independiente del efecto de los otros procedimientos aplicados y de la edad de la madre. En este caso, el uso del procedimiento de lavado dobla la posibilidad de éxito de embarazo (OR = 2,2, IF 95% 1,6 - 3,0).

35 Una mejora similar parece estar asociada con la implantación de tres embriones, en lugar de la implantación de un solo embrión (OR = 2,1, IF 95% 1,2 - 3,7), y el uso de embriones de calidad óptima (OR = 1,9, IF 95% 1,1 - 3,3).

Por lo tanto, el uso de los tres procedimientos anteriores parece ser la mejor elección en los procedimientos de fertilización asistida.

40 En conclusión, los estudios *in vivo* han probado que la irrigación o el lavado con melatonina de células endometriales permite doblar el número de embarazos con respecto a los otros dos grupos, que no se diferenciaban significativamente.

Estudio clínico 2

El estudio monocéntrico implicaba a 64 pacientes en el grupo de control y 92 pacientes en el grupo de estudio.

45 Las pacientes se han sometido a reproducción asistida y a lavado endometrial (medidas ecográficas del estrato líquido) con melatonina en solución salina estéril y 3-4 días después se han sometido a transferencia embrionaria.

El criterio de valoración primario del estudio es el grado de embarazos clínicos (corazón fetal) debido a transferencia embrionaria (ET); el criterio de valoración secundario es el grado de embarazos en marcha y abortos.

El grado de embarazos clínicos resultaba ser igual a 37% en el grupo de estudio frente a 17,2% en el grupo de control, mientras que el grado de embarazos en marcha resultaba ser igual a 32,6% en el grupo de estudio frente a 14,1% en

el grupo de control.

Los resultados se han presentado en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1

	Control		Lavado	
	N°	(%)	N°	(%)
N° ET	64		92	
Edad (años ± DE)	38,8±1,2		36 ± 4	
N° embriones transferidos (Media ± DE)	2,7±1,1		2,5±1,08	
N° embriones Grado A (Media ± DE)	1,5±1		1,3±0.8	
N° embriones Grado B (Media ± DE)	0,9±0,7		1,17±0,8	
N° embriones Grado C (Media ± DE)	0,2±0,5		0,1±0,3	
Día ET (Media ± DE)	3,5±0,5		3,5±1,2	
Positivos a BHCG (sobre el total de ET)	12	18,8%	41	44,6%
Embarazo clínico/ET	11	17,2%	34	37,0%
Embarazo en marcha/ET	9	14,1%	30	32,6%
Abortos	1	9,1%	4	11,8%

- 5 El lavado endometrial llevado a cabo con las diversas soluciones que contienen melatonina permite doblar el grado de embarazos clínicos frente al grupo de control en la población de mujeres estériles.

Los datos parecen confirmar que la retirada de exudado endometrial usando la solución fisiológica con melatonina puede crear un ambiente endometrial fisiológico y mejorar el éxito de la implantación.

- 10 Esto permite obtener un medio válido e innovador para incrementar los grados de implantación en tecnologías de reproducción asistida (ART, por sus siglas en inglés).

Ejemplo 2: estudio *in vitro*

Materiales y métodos

La melatonina y el medio de cultivo usados son los mismos que los usados para el estudio *in vivo*.

Microscopía electrónica (SEM)

- 15 Se ha usado una emisión de campo en el microscopio electrónico de alta resolución, modelo FE HITACHI S 4000, que funciona a 15-20 KW.

Preparación de muestras

- 20 Poco después de la recuperación desde la paciente, pequeños trozos de tejido endometrial de aproximadamente 1 mm de tamaño se han puesto en una solución fijadora compuesta por paraformaldehído al 1% y glutaraldehído al 0,5% en cacodilato 0,1 M tamponador pH 7,2 durante 3 horas.

Después de esta fijación, los trozos se lavan en PBS 20 min x 3 veces (1 hora total) y a continuación se lleva a cabo

posfijación en una solución de tetróxido de osmio al 2% y ferrocianuro potásico al 2,5%.

La preparación se mantiene en la oscuridad durante 3 horas para a continuación ser lavada precisamente girando en PBS, con 4 sustituciones de 20 min cada una.

- 5 Sigue la deshidratación de las muestras de tejido con acetona en sucesión ascendente con 3 sustituciones en 1 hora para cada gradación 50%-70%-80%-90%-95% y 2 sustituciones con acetona pura.

En esta fase, sigue el secado hasta el punto crítico con CO₂ líquido en el dispositivo de alta presión apropiado que sustituye 10% de acetona por CO₂ líquido, a continuación se lleva lentamente hasta la temperatura del punto crítico y el CO₂ se evapora. En este punto, las muestras de tejido son perfectamente anhidras y se pueden disponer sobre las bandejas del microscopio electrónico.

- 10 Las muestras se fijan a través de un adhesivo especial de doble cara eléctricamente conductor y para su disposición se usan dos agujas muy finas y la preparación está lista para ser observada con el microscopio electrónico de barrido (SEM).

Muestras biológicas

- 15 Bajo la autorización por escrito previa, se han puesto bajo cultivo fragmentos de endometrio retirados de pacientes sometidas a histeroscopia diagnóstica.

Para cada paciente, se han establecido dos partes: una parte del tejido se ha puesto bajo cultivo a través de un medio para blastocisto convencional carente de melatonina, la otra parte a través de un medio para blastocisto convencional complementado con melatonina.

Grupo de cultivo

- 20 Cultivo *in vitro* de endometrio (extracción a través de histeroscopia desde pacientes sometidas a controles de fertilización asistida) con melatonina durante 3-6 días y visualización correlacionada de pinopodos a través de microscopía electrónica (SEM).

Resultados

- 25 Los estudios *in vitro* han mostrado que el cocultivo de 3 a 5 días de tejido endometrial en tubo de ensayo con adición permanente de melatonina implica un incremento incuestionable de pinopodos (bajo microscopía electrónica (SEM)), independientemente de la edad de la paciente y de la fase del ciclo menstrual en ciclos espontáneos o manipulados a través de estimulación farmacológica de la sobreovulación, con respecto al cultivo de control. Estos pinopodos son estructuras que se definen como el marcador de implantación más importante que para cada mujer (con una variabilidad de 5 días, esto es, una mujer puede menstruar después de 26 días con un ciclo corto o menstruar después de 33 días) es de 48 horas. De hecho, dos tercios del éxito del embarazo dependen del momento correcto de implantación, el otro tercio depende de la calidad del embrión.

El examen bajo el microscopio electrónico SEM ha mostrado que la adición de melatonina conduce a una expresión morfológica completa de pinopodos según se ilustra en las Figuras 1-4.

- 35 Esto esboza la importancia de los pinopodos durante la ventana de implantación y el incremento de su expresión inducido en el cultivo a través de medios complementados con melatonina.

Ejemplo 3: Estudio de los efectos de la melatonina y análogos sobre la oxidación y la apoptosis de la línea celular endometrial HEC-1-A

Compuestos probados

- 40 Los análogos de melatonina que se han usado para la comparación con melatonina (M5250) son agomelatina (A1362) y 6-hidroximelatonina (H0627), todos adquiridos de Sigma Aldrich.

Se usaron en diferentes concentraciones (es decir 40 nM, 80 nM, 170 nM y 340 nM, correspondientes respectivamente a $9,4 \times 10^{-9}$ g/ml, 18×10^{-9} g/ml, 40×10^{-9} g/ml y 80×10^{-9} g/ml).

Línea celular

Las células HEC-1A se obtuvieron mediante el ATCC y el cultivo siguiendo las instrucciones del proveedor.

- 45 HEC-1-A es una línea celular epitelial estabilizada aislada por H. Kuramoto de un paciente con adenocarcinoma (21), que proporciona un modelo valioso para estudiar la célula epitelial endometrial *in vitro* (22).

Ensayo de actividad antioxidante

La línea celular HEC-1-A se cultivó con 170 nM (40 ng/ml) de melatonina, 6-hidroximelatonina y agomelatina y dos

concentraciones diferentes de H₂O₂ (20 y 200 mcg/ml).

Las sustancias oxidativas reactivas (ROS, por sus siglas en inglés) se midieron mediante FACS según se describió previamente por Italiano et al. (23) en dos réplicas independientes.

Resultados

5 La melatonina y los dos análogos aseguraban el mismo efecto antioxidativo, sobre el modelo de línea celular *in vitro*, a la concentración de H₂O₂ de 20 mcg/ml.

10 Cuando la concentración de H₂O₂ se incrementa hasta 200 mcg/ml, la melatonina y la agomelatina continuaban protegiendo a la línea celular de la oxidación, mientras que la 6-hidroximelatonina no lo hacía. Sin embargo, incrementando la dosis de 6-hidroximelatonina hasta 340 nM, se alcanzaba el efecto antioxidativo de este análogo (datos no mostrado).

Los resultados se ilustran en el diagrama de la Figura 5.

Estos resultados están en línea con los datos publicados por Duan et al. (24) sobre el efecto antioxidativo de la melatonina en un modelo celular diferente y demuestran que la melatonina y los análogos ensayados tienen un efecto similar al menos cuando se usan 20 mcg/ml de H₂O₂ sobre la línea celular endometrial.

15 Ensayo de apoptosis

La apoptosis (% de muerte celular) de las células endometriales es un fenómeno fisiológico observado generalmente en un grado de 10-20% durante el cultivo celular.

20 A fin de determinar si la melatonina y sus análogos inducen la muerte celular en este contexto experimental específico, se ha tratado la línea celular HEC-1-A con 340 nM (80 ng/ml), 170 nM (40 ng/ml) y 80 nM (18,8 ng/ml) de melatonina, 6-hidroximelatonina y agomelatina, respectivamente, durante 24 horas.

Los niveles de apoptosis se ensayaron mediante tinción con yoduro de propidio y análisis de FACS. El porcentaje de episodios sub-G1 se muestra para uno de los dos experimentos realizados.

Resultados

25 En todas las concentraciones probadas, la melatonina ejerce un efecto protector sobre la apoptosis. La agomelatina tiene un efecto protector en 170 y 340 nM, mientras que no se muestra efecto sobre la apoptosis mediante 6-hidroximelatonina hasta una concentración de 170 nM. Los resultados se muestran en la Figura 6.

Bibliografía

1. Simon C, Martin JC, Pellicer A. Clin obst & gynaecol, 2000 14; (5) 127: 815-826.
2. Lédée-Bataille N, Laprée-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Frydman R, Chauat G. Hum Reprod, 17 de enero de 2002; (1): 213-218.
3. Nardo LG, Sabatini L, Rai R, Nardo F. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 10 de marzo de 2002; 101 (2): 104-8.
4. Nikas G, Makrigiannakis A. Ann N Y Acad Sci, 2003 Nov; 997: 120-3.
5. Stavreus-Evers A, Mandelin E, Koistinen R, Aghajanova L, Hovatta O, Seppälä M. Fertil Steril, junio de 2006; 85 (6): 1803-11. Erratum in: Fertil Steril. agosto de 2006; 86 (2): 498.
- 35 6. Brzezinski A. N Engl J Med, 16 de enero de 1997; 336 (3): 186-95.
7. Kobayashi Y, Itoh MT, Kondo H, Okuma Y, Sato S, Kanishi Y, Hamada N, Kiguchi K, Ishizuka B. J Pineal Res, septiembre de 2003; 35 (2): 71-4.
8. Aydogan S, Yerer MB, Goktas A. Melatonin and nitric oxide. J Endocrinol Invest, marzo de 2006; 29 (3): 281-7.
9. Sandyk R, Anastasiadis PG, Anninos PA, Tsagas N. Int J Neurosci, febrero de 1992; 62 (3-4): 243-50.
- 40 10. Sandyk R, Anastasiadis PG, Anninos PA, Tsagas N. Int J Neurosci, enero de 1992; 62 (1-2): 89-96.
11. Simon C, Garcia Velasco JJ, Valbuena D, Peinado JA, Moreno C, Remohí J, Pellicer A. Fertil Steril, agosto de 1998; 70 (2): 234-9.
12. Tang PL, Chan TY, Tang GW, Pang SF. Gynecol Obstet Invest., 1998; 45(4):247-52.
13. Cioni et al., Prenat Diagn. 2005; 25/3(198-202).

14. Bussani C. et al., Mol Diagn Ther. 2007.
15. Florio et al., Fertil Steril. 2010.
16. Hannan NJ, et al.. Reprod Sci. 2012; 19:1125-32.
17. Giulini S. et al. Arch Gynecol Obstet. 2012; 285:1479-1482.
- 5 18. Berlanga S. et al., Placenta 2011; 32 Supl. 3:S271-5.
19. Ubaldi F, Bourgain C, Tournaye H, Smitz J, Steirteghem A, Devroey P. Fertil Steril, marzo de 1997 67, 3: 521-526.
20. Schaeffer HJ, Sirotkin AV. Adv Exp Med Biol. 1995; 395:547-548.
21. Kuramoto H, et al. Am. J. Obstet. Gynecol. 114: 1012-1019, 1972.
22. Mo B. et al, 2006) Mo B, Vendrov AE, Palomino WA, DuPont BR, Apparao KB, Lessey BA. Biol Reprod. 2006;75(3):387-94.
- 10 23. Italiano D., Lena AM, Melino G, Candi E. Cell Cycle. 2012; 11(24):4589-96.
24. Duan W., et al. PLoS One. 2013; 8(3) Epub 6 Marzo 2013.

REIVINDICACIONES

- 5 1. N-acetil-5-metoxitriptamina o uno de sus análogos, para el uso en el campo médico o veterinario en reproducción asistida para la prevención del fallo de implantación en el útero, mediante la administración tópica de una cantidad eficaz en una hembra de mamífero que necesite este tratamiento, en donde dicho análogo se selecciona de agomelatina o 6-hidroximelatonina.
- 10 2. N-acetil-5-metoxitriptamina o uno de sus análogos, para el uso según la reivindicación 1, en donde dicha hembra de mamífero es una mujer que sufre esterilidad o abortos múltiples y/o las técnicas de reproducción asistida se seleccionan del grupo que consiste en técnicas de cópula planificada; inseminación intrauterina (IUI); inseminación *in vitro* y transferencia embrionaria (FIVET); fertilización *in vitro* (IVF); inyección intracitoplásmica de esperma (ICSI), inyección intracitoplásmica de esperma morfológicamente seleccionado (IMSI) y Tesa-Tese (aspiración-extracción de esperma testicular).
- 15 3. N-acetil-5-metoxitriptamina o uno de sus análogos, para el uso según una cualquiera de la reivindicaciones 1-2, en donde dicha administración tópica es a través de irrigación endometrial o lavado uterino o lavado endometrial y/o dicha administración tópica se lleva a cabo en una sola administración en el momento de la recuperación de ovocitos.
- 20 4. N-acetil-5-metoxitriptamina o uno de sus análogos, para el uso según una cualquiera de la reivindicaciones 1-3, en donde dicha N-acetil-5-metoxitriptamina o análogo de la misma está presente en una concentración que varía de 4×10^{-9} g/ml a 25×10^{-9} g/ml, preferiblemente mayor de o igual a 10×10^{-9} g/ml.
- 25 5. N-acetil-5-metoxitriptamina o uno de sus análogos, para el uso según una cualquiera de la reivindicaciones 1-4, para el uso con una administración sistémica simultánea de N-acetil-5-metoxitriptamina, HCG o progesterona, o una de sus combinaciones, desde el día de la recuperación de ovocitos.
- 30 6. Composición adecuada para la administración tópica que comprende N-acetil-5-metoxitriptamina o uno de sus análogos seleccionado de agomelatina o 6-hidroximelatonina, o una de sus combinaciones como ingrediente activo, preferiblemente N-acetil-5-metoxitriptamina, en una cantidad eficaz en una hembra de mamífero que necesite este tratamiento, junto con uno o más excipientes o adyuvantes fisiológicamente aceptables, para el uso en el campo médico o veterinario en la reproducción asistida para la prevención del fallo de implantación en el útero.
7. Composición para el uso según la reivindicación 6, en la que dicho ingrediente activo está presente en una concentración que varía de 4×10^{-9} g/ml a 25×10^{-9} g/ml, preferiblemente mayor de o igual a 10×10^{-9} g/ml.
8. Composición para el uso según una cualquiera de la reivindicaciones 6-7, en la que dicho ingrediente activo está formulado como una irrigación endometrial o un lavado uterino o un lavado endometrial en un medio para cultivo celular hasta una concentración final que varía de 4×10^{-9} g/ml a 25×10^{-9} g/ml, preferiblemente mayor de o igual a 10×10^{-9} g/ml.
9. Composición para el uso según la reivindicación 8, en la que dicho medio de cultivo para blastocisto comprende los siguientes componentes:
- una fuente de D-glucosa;
 - 35 - un antibiótico, preferiblemente gentamicina;
 - albúmina sérica humana;
 - aminoácidos esenciales y no esenciales, preferiblemente L-aurina;
 - sales tamponadoras seleccionadas preferiblemente entre:
 - sales cálcicas: lactato cálcico, pantotenato cálcico;
 - 40 - sales sódicas: cloruro sódico, bicarbonato sódico y piruvato sódico;
 - sales potásicas: cloruro potásico, fosfato potásico;
 - sales magnésicas: cloruro magnésico, sulfato magnésico y mezclas de los mismos;
 - agua;
- y tiene un pH entre 7,5 y 7,8.
- 45 10. Composición para el uso según la reivindicación 9, en la que dicho medio de cultivo es el medio para blastocisto Sydney IVF ®.
11. Composición para el uso según una cualquiera de la reivindicaciones 6-7, en la que dicho ingrediente activo en la susodicha composición está formulado como una irrigación endometrial o un lavado uterino o un lavado endometrial

en solución fisiológica.

12. Composición para el uso según la reivindicación 11, caracterizada por que comprende además aminoácidos esenciales y no esenciales y sales tamponadoras para mantener el pH entre 7-8, preferiblemente 7,5-7,8.

5 13. Dispositivo médico para lavado uterino que comprende un recipiente estéril precargado con una composición para el uso según una cualquiera de la reivindicaciones 6-12.

14. Dispositivo médico según la reivindicación 13, en el que el recipiente estéril es desechable.

15. Dispositivo médico según la reivindicación 13 o 14, en el que el recipiente estéril es una jeringa, un dosificador o un cartucho para dispositivos de autoinyección

10 16. Dispositivo médico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un catéter intrauterino estéril.

17. Dispositivo médico según una cualquiera de las reivindicaciones 13-16, que comprende un recipiente estéril desechable precargado con una formulación basada en una solución fisiológica complementada con melatonina, aminoácidos y sales tamponadoras para mantener el pH entre 7-8, preferiblemente 7,5-7,8.

15 18. Dispositivo médico según la reivindicación 17, en el que dicha formulación comprende aminoácidos esenciales y no esenciales y sales tamponadoras seleccionadas preferiblemente entre sales cálcicas, potásicas, magnésicas y sus mezclas.

19. Dispositivo médico según una cualquiera de la reivindicaciones 13-18, en el que la melatonina tiene una concentración comprendida entre 4×10^{-9} g/ml y 25×10^{-9} g/ml, preferiblemente mayor de o igual a 10×10^{-9} g/ml.

20 20. Dispositivo médico según una cualquiera de la reivindicaciones 13-19, en el que dicho recipiente estéril desechable está precargado con un volumen de 1,5 ml de solución fisiológica que comprende:

- 10×10^{-9} g/ml de melatonina

- aminoácidos esenciales y no esenciales

- sales cálcicas

- sales potásicas

25 - sales magnésicas.

21. Dispositivo médico según una cualquiera de la reivindicaciones 13-20, para el uso en el campo médico o veterinario en la reproducción asistida para la prevención del fallo de implantación en el útero.

22. Uso de un medio de cultivo celular para el crecimiento de pinopodos y la obtención de un estudio modélico *in vitro*, comprendiendo dicho medio de cultivo *in vitro* o *in vivo*:

30 - una fuente de D-glucosa;

- un antibiótico, preferiblemente gentamicina;

- albúmina sérica humana;

- aminoácidos esenciales y no esenciales, preferiblemente L-aurina;

- sales cálcicas: lactato cálcico, pantotenato cálcico;

35 - sales sódicas: cloruro sódico, bicarbonato sódico y piruvato sódico;

- sales potásicas: cloruro potásico, fosfato potásico;

- sales magnésicas: cloruro magnésico, sulfato magnésico;

- agua;

40 caracterizado por que comprende además N-acetil-5-metoxitriptamina o uno de sus análogos seleccionado de agomelatina o 6-hidroximelatonina, o una de sus combinaciones, en donde dicho ingrediente activo está presente en una concentración que varía de 4×10^{-9} g/ml a 25×10^{-9} g/ml, preferiblemente mayor de o igual a 10×10^{-9} g/ml.

FIG.1

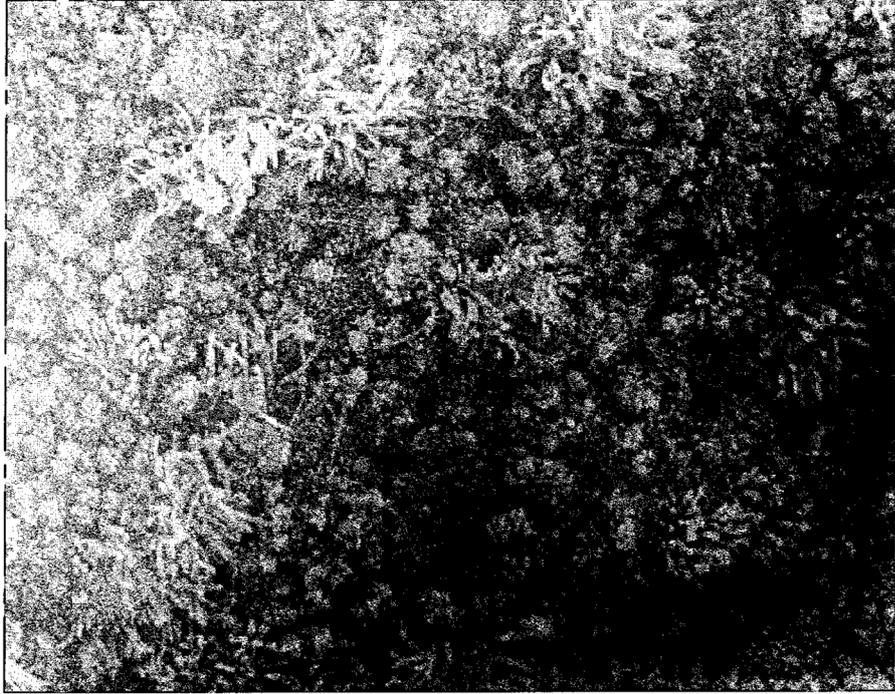


FIG.2

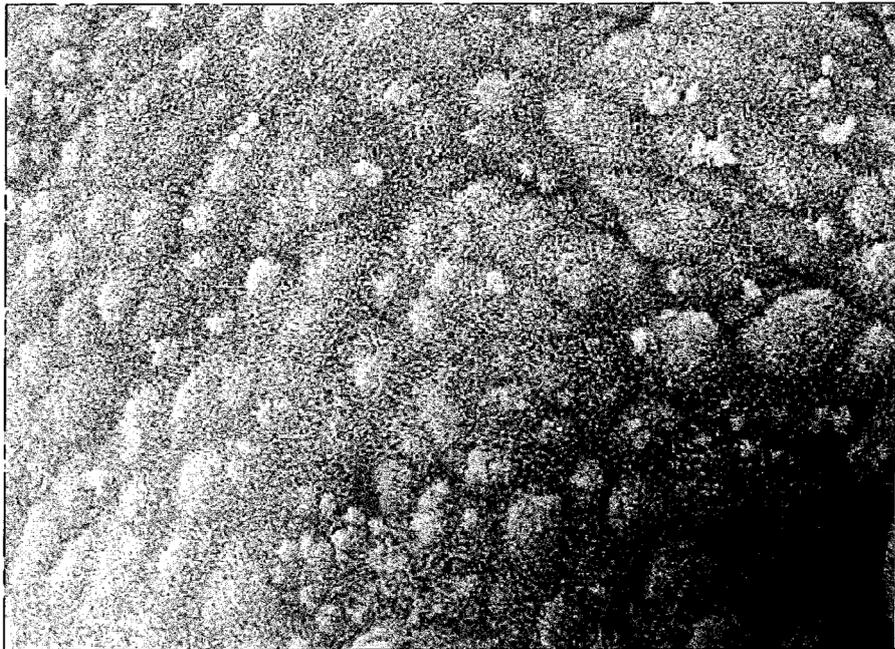


FIG.3

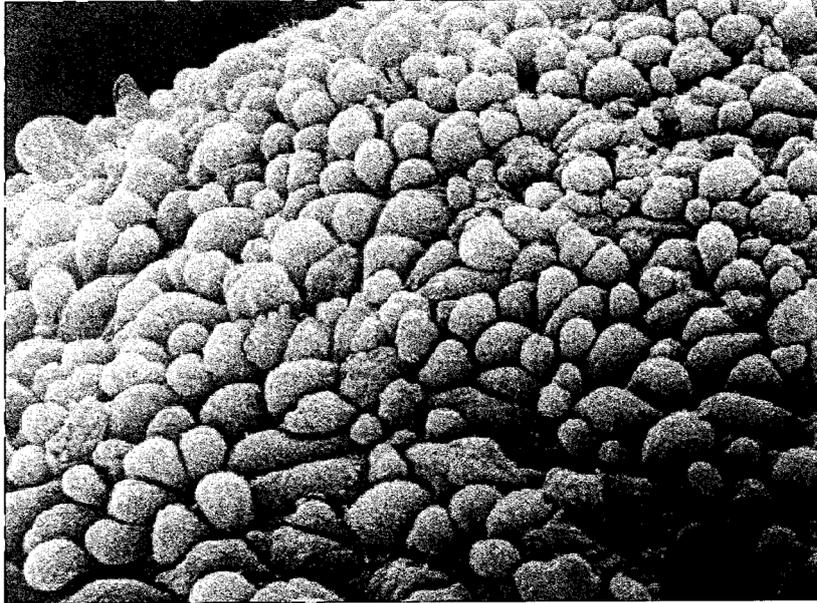
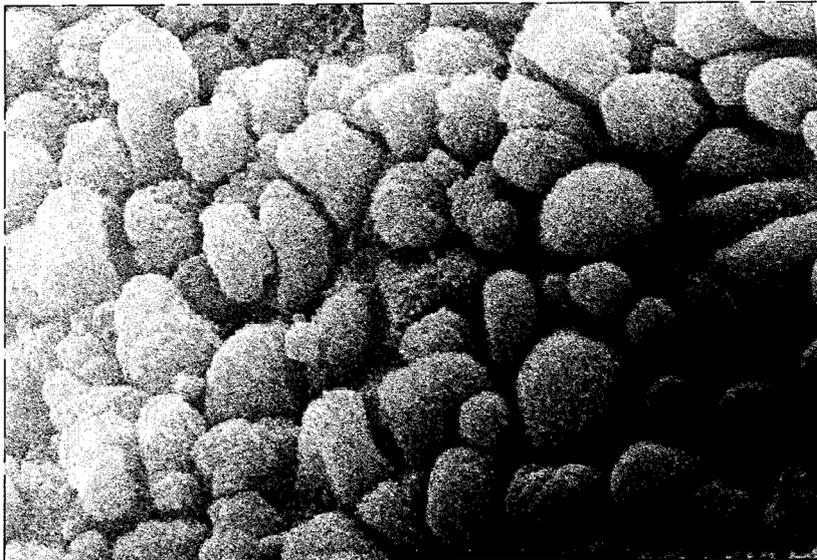


FIG.4



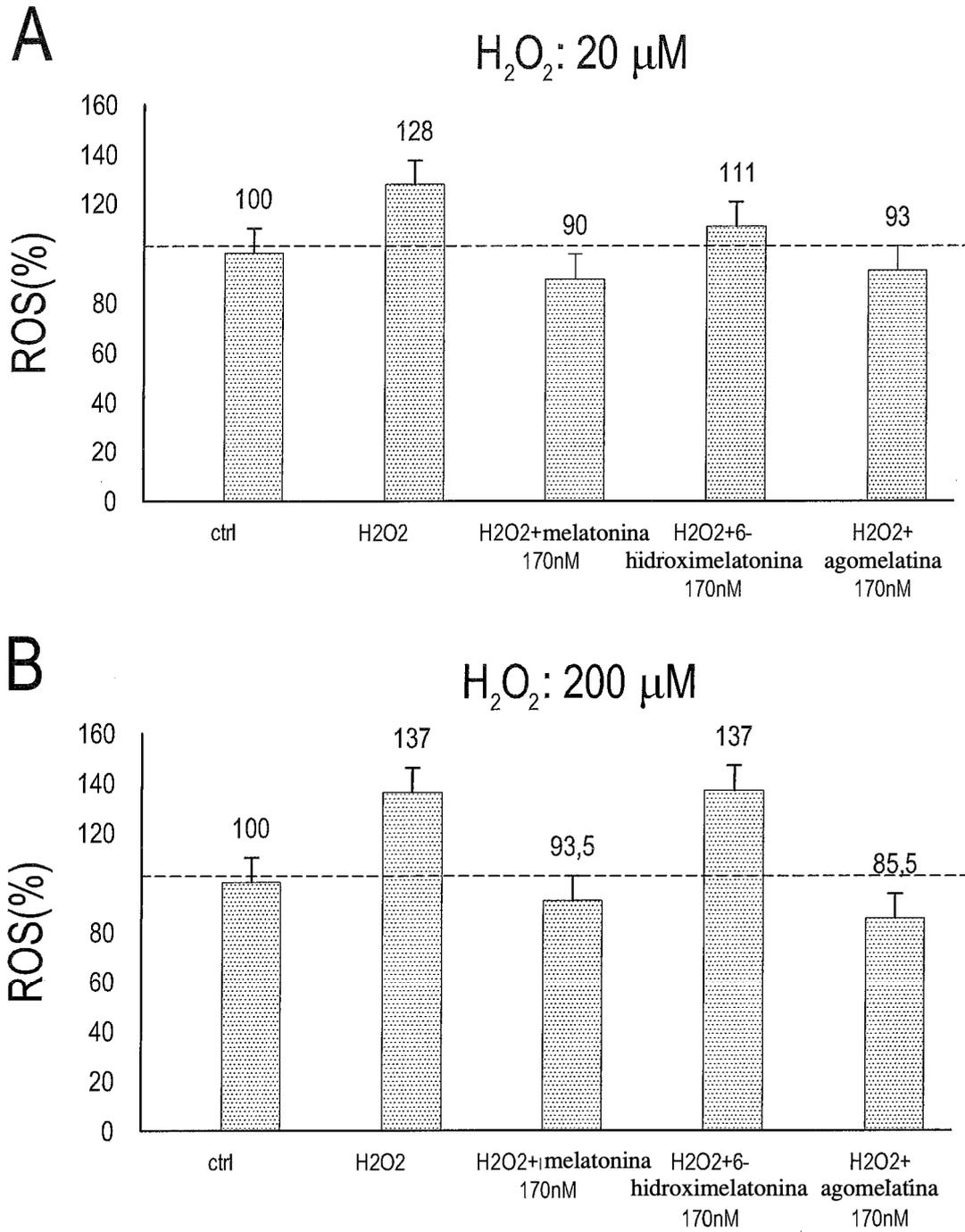


FIG.5

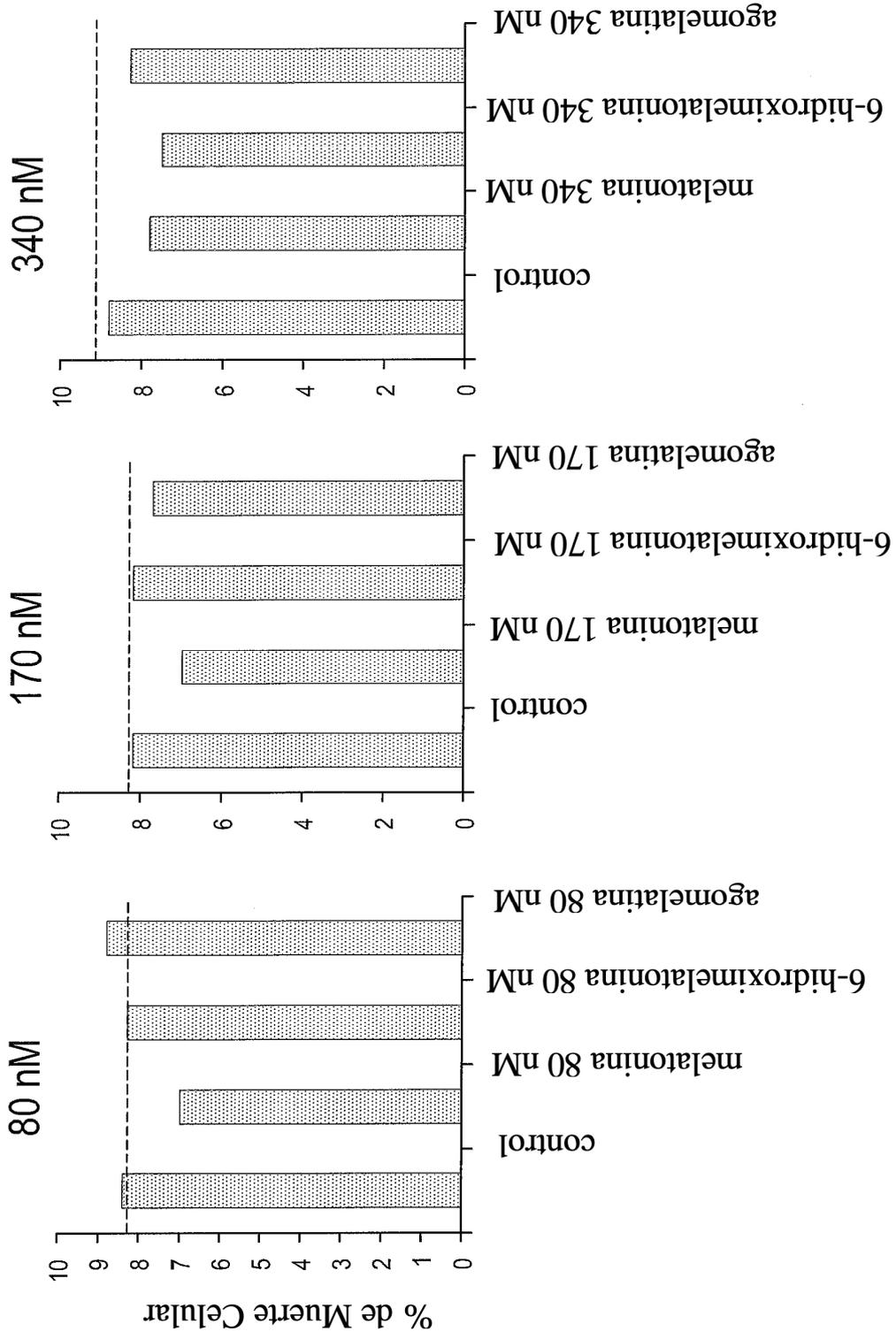


FIG.6