



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 245 609**

⑫ Número de solicitud: 200401599

⑤① Int. Cl.:
A61K 31/05 (2006.01)
A61P 15/08 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫② Fecha de presentación: **18.06.2004**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.01.2006**

Fecha de la concesión: **26.06.2007**

⑫⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.08.2007**

⑫⑤ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

⑦③ Titular/es: **Universidad de Barcelona
Centro de Patentes de la UB.
Baldiri Reixac, 4
08028 Barcelona, ES**

⑦② Inventor/es: **Planas Rosselló, Juana M.;
Juan Olivé, M. Emilia;
Munuera García, Thais;
González Pons, Eulalia y
Rodríguez Gil, Juan Enrique**

⑦④ Agente: **Segura Cámara, Pascual**

⑤④ Título: **Nuevo agente terapéutico para el tratamiento de la infertilidad y/o subfertilidad masculina en mamíferos.**

⑤⑦ Resumen:

Nuevo agente terapéutico para el tratamiento de la infertilidad y/o subfertilidad masculina en mamíferos.

El *trans*-resveratrol induce un aumento de la concentración de espermatozoides debido a un incremento en su conjunto del tejido espermatogénico. También induce un incremento de la concentración sérica de la hormona estimulante del folículo (FSH), de la hormona luteinizante (LH) y de la testosterona lo que implica una estimulación hipofisaria en el eje hipotalámico-hipofisario-testicular. A diferencia de otros medicamentos propuestos para el tratamiento de la infertilidad masculina, el *trans*-resveratrol es útil para el tratamiento de la infertilidad masculina y/o subfertilidad producida por diferentes causas como la infertilidad idiopática, niveles elevados de especies reactivas del oxígeno o alteraciones inflamatorias. Es ventajoso que el *trans*-resveratrol tenga varios mecanismos de acción, ya que la infertilidad masculina y/o subfertilidad generalmente tiene múltiples causas convergentes.

ES 2 245 609 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Nuevo agente terapéutico para el tratamiento de la infertilidad y/o la subfertilidad masculina en mamíferos.

Esta invención se refiere a una segunda indicación médica de un agente terapéutico conocido.

Estado de la técnica anterior

La infertilidad se ha incrementado en recientes décadas y actualmente afecta al 15% de las parejas de la sociedad occidental. El problema se atribuye a factores únicamente masculinos en un 30% de los casos. La infertilidad debida a factores masculinos implica una combinación de funciones espermáticas deficientes que finalmente, conducen a una capacidad reducida de fertilizar o a una completa incapacidad para fertilizar. La fertilidad normal o alterada se define principalmente en base a los parámetros convencionales de semen. Sin embargo, es difícil determinar valores umbral que diferencien entre hombres fértiles o subfértiles. Los valores umbral para parámetros como concentración espermática, motilidad y morfología pueden ser utilizados para clasificar a los hombres como subfértiles, fértiles o de fertilidad indeterminada. De todos modos, las medidas de estos parámetros no constituyen un diagnóstico de infertilidad. Se ha descrito que un conteo de espermatozoides menor a 20 millones por mililitro o inferior a 125 millones por eyaculado está asociado con la subfertilidad (cfr. J. MacLeod and R.Z. Gold, "The mate factor in fertility and infertility: II. Spermatozoon counts in 1000 men of known fertility and in 1000 cases of infertile marriage", *J. Urol.* 1951, vol. 66, pp. 436-449). De manera similar, se ha descrito que la mayoría de hombres con más de 20 millones de espermatozoides por mililitro son fértiles (cfr. R.J. Sherrins *et al.*, "Longitudinal analysis of semen of fertile and infertile men", in P.Troen, H. Nankin (eds), "New concepts of the testis in normal and infertile men. Morphology, physiology and pathology", New York, Raven Press, 1977).

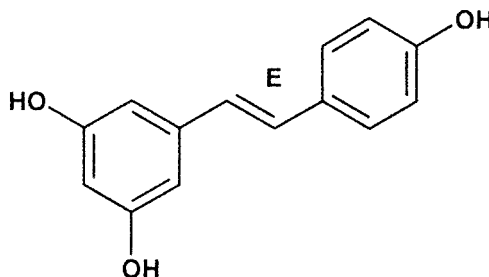
A pesar de que las técnicas modernas de reproducción asistida contribuyen ampliamente a superar los factores de infertilidad masculina severos, la aplicación de estos métodos en todas las parejas infértiles representaría un exceso de tratamiento. Por ello, las terapias convencionales, como los procedimientos quirúrgicos y la administración de fármacos constituyen todavía la primera aproximación a los desórdenes de fertilidad masculina. Los tratamientos con efectividad probada están sólo disponibles para pacientes con infertilidad resultante de un hipogonadismo hipogonadotrófico. Con los tratamientos que utilizan antiestrógenos, andrógenos, inhibidores de aromataza, bloqueadores de células mastocito, zinc y otros fármacos se han obtenido resultados inconsistentes.

Se han descrito varias causas para la infertilidad masculina. Éstas se clasifican en hipogonadismo hipogonadotrófico, alteraciones inflamatorias, infertilidad inmunológica, niveles elevados de especies reactivas del oxígeno, emisión y eyaculados malogrados e infertilidad masculina idiopática. Aproximadamente un 25% de los pacientes masculinos infértiles se han clasificado por tener infertilidad idiopática; en estos pacientes no se pueden identificar anomalías físicas o bioquímicas. Los pacientes que padecen infertilidad idiopática tienen una anomalía en el número de espermatozoides, en la motilidad o en la morfología. El término de oligospermia idiopática se utiliza para describir el subconjunto de pacientes con infertilidad idiopática que tienen un número de espermatozoides bajo, independientemente de su asociación con la existencia de anomalías en otros parámetros seminales. Se ha encontrado que un 43% de hombres con infertilidad idiopática tienen anomalías en todos los parámetros espermáticos: el 39% tenía anomalías en la motilidad/viabilidad con densidad espermática normal, el 10% tenía oligospermia aislada y un 8% tenía anomalías morfológicas aisladas (cfr. M. Sigman and M.L. Vance, "Medical treatment of idiopathic infertility", *Urol. Clin. North Am.* 1987, vol. 14, pp. 459-469). Frecuentemente, diversas causas contribuyen simultáneamente a las alteraciones de la fertilidad masculina.

Actualmente, los fármacos son todavía una de las modalidades de tratamiento de la infertilidad masculina. Entre los fármacos utilizados están el tamoxifeno, el clomifeno y la pentoxifilina. El tamoxifeno y el clomifeno estimulan la secreción de la hormona estimulante del folículo ("follicle-stimulating hormone", FSH) y la hormona luteinizante ("luteinizing hormone", LH) por bloqueo de varios receptores esteroideos en el cerebro, resultando en un incremento de la hormona liberadora de gonadotropina ("gonadotrophin releasing hormone", GnRH). El tratamiento con tamoxifeno se ha sugerido para pacientes con oligospermia idiopática; sin embargo, los resultados obtenidos con este fármaco son controvertidos. En la literatura científica se han descrito buenos resultados para las terapias que combinan tamoxifeno con undecenoato de testosterona. A pesar de que el clomifeno ha sido utilizado para la infertilidad masculina (cfr. US 2.914.563), se emplea principalmente para inducir la ovulación en mujeres con amenorrea anovulatoria funcional. Así, el clomifeno es menos apropiado que el tamoxifeno para la infertilidad masculina debido a sus efectos antiestrogénicos y estrogénicos simultáneos. El efecto estrogénico del clomifeno aumenta los niveles plasmáticos de estrógenos en hombres con oligospermia y también aumenta los niveles de FSH. La testosterona, junto con la síntesis de proteínas de unión a hormonas sexuales puede decrecer, disminuyendo así la espermatogénesis. La pentoxifilina incrementa la motilidad y el número de espermatozoides; sin embargo, se han descrito algunos posibles efectos mutagénicos de la pentoxifilina o sus metabolitos.

En resumen, a pesar de que se han propuesto varios fármacos para tratar la infertilidad masculina, todavía tiene que encontrarse un tratamiento que sea totalmente satisfactorio. Como resultado, ha continuado una activa investigación en este campo.

Trans-resveratrol es el nombre comúnmente usado para el *trans*-3,4',5-trihidroxiestilbeno que tiene CAS RN 501-36-0 y fórmula (1). El *trans*-resveratrol es un antioxidante natural que se encuentra en las plantas, muchas de las cuáles son componentes de la dieta humana, como las uvas, los cacahuetes y las moras. Es conocido que el *trans*-resveratrol contribuye a la prevención de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (M. Jang *et al.*, "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes", *Science* 1997, vol. 275, pp. 218-220). Esta protección puede ser atribuible a sus propiedades como antioxidante, antiinflamatorio e inhibidor de la agregación plaquetaria junto con su actividad mixta agonista/antagonista para los receptores de estrógenos (K.P.L. Bhat *et al.*, "Biological effects of resveratrol" *Antioxid. Redox Signal.* 2001, vol. 3, pp. 1041-64; K.P.L. Bhat *et al.*, "Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models", *Cancer Research* 2001, vol. 61, pp. 7456-7463). De todos modos, en el estado de la técnica no se menciona o sugiere nada relacionado con el uso del *trans*-resveratrol para el tratamiento de la infertilidad masculina.



(1)

Explicación de la invención

La presente invención se refiere a un método de tratamiento de un mamífero macho que padece infertilidad y/o subfertilidad causada por oligospermia. Este método comprende la administración a dicho paciente, de una cantidad terapéuticamente efectiva de *trans*-resveratrol, junto con diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Es preferible que el *trans*-resveratrol sea administrado por vía oral. En una realización preferida, el mamífero es un humano. En otras realizaciones preferidas, el mamífero es un ratón o una rata.

Un aspecto de la presente invención se refiere al uso del *trans*-resveratrol y su preparación como fármaco para el tratamiento de la infertilidad y/o subfertilidad causada por oligospermia en un mamífero macho. Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del *trans*-resveratrol como fármaco para incrementar la cantidad de espermatozoides en un mamífero macho. En una realización preferida, el mamífero es un humano. En otras realizaciones preferidas, el mamífero es un ratón o una rata.

Sorprendentemente, los inventores han encontrado que la administración oral diaria de 20 mg/kg de *trans*-resveratrol a ratas sanas durante 90 días induce un aumento del número de espermatozoides de 1,43 veces, una disminución significativa en el diámetro medio de los túbulos seminíferos y un aumento significativo de la densidad de los túbulos seminíferos (cfr. Fig. 1). Estos resultados indican que el aumento de la densidad de los túbulos seminíferos y de la concentración de espermatozoides en ratas tratadas es debido al crecimiento en conjunto del tejido espermatogénico.

Aparte de los efectos anteriormente mencionados, desconocidos en la técnica, el *trans*-resveratrol también incrementa la concentración en suero de FSH, LH y testosterona lo que implica una estimulación hipofisaria en el eje hipotalámico hipofisario testicular.

A diferencia de otros fármacos sugeridos para el tratamiento de la infertilidad masculina, el *trans*-resveratrol es útil para el tratamiento de la infertilidad masculina producida por varias causas. En primer lugar, el *trans*-resveratrol es útil para el tratamiento de la infertilidad idiopática. En segundo lugar, debido a sus propiedades antioxidantes, el *trans*-resveratrol es útil para el tratamiento de la infertilidad masculina causada por niveles elevados de especies reactivas del oxígeno. Además, debido a sus propiedades anti-inflamatorias, el *trans*-resveratrol es útil para el tratamiento de la infertilidad masculina causada por alteraciones inflamatorias. Es ventajoso que el *trans*-resveratrol tenga varios mecanismos de acción ya que, la infertilidad masculina y/o subfertilidad generalmente tiene múltiples causas convergentes. Además se sabe que el *trans*-resveratrol no tiene efectos tóxicos a dosis elevadas.

Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Las descripciones en el resumen de esta solicitud, se incorporan aquí como referencia. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 muestra una comparación entre los túbulos seminíferos de ratas control (A) y ratas tratadas con *trans*-resveratrol (B). Los aumentos en A y B son los mismos.

Exposición detallada de modos de realización

Los efectos del tratamiento con *trans*-resveratrol en la fertilidad fueron determinados en ratas adultas sanas. Veintiocho ratas macho Sprague-Dawley fueron divididas al azar en un grupo resveratrol (administradas diariamente con 20 mg/kg de *trans*-resveratrol suspendido en 1% de carboximetilcelulosa, durante 90 días) y en un grupo control (sólo 1% de carboximetilcelulosa, durante 90 días). El peso corporal fue registrado diariamente.

Los testículos, epidídimos y *ducti deferens* fueron diseccionados juntos y su peso húmedo fue registrado. El contenido espermático en el conjunto del epidídimo y del *ductus deferens* de cada animal fue extraído en 1 ml de formaldehído tamponado al 10%. El número de espermatozoides fue determinado mediante una cámara de conteo. Una alícuota de 10 μ l de suspensión espermática fue teñida con la técnica vital eosina-nigrosina. El porcentaje de anomalías morfológicas de los espermatozoides fue calculado después de contar las muestras teñidas bajo el microscopio. Para el estudio morfométrico, el epidídimo y el *ductus deferens* fueron cuidadosamente diseccionados de sus respectivos testículos y los testículos fueron fijados en formaldehído al 10% a pH 7,4 (Sigma Diagnostics, St Louis, MO, USA). Los testículos fueron cortados en láminas de 5 μ m, que fueron teñidas con la técnica de hematoxilina-eosina. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio óptico Nikon Eclipse E800 (Nikon Europe, Badhoevedorp, The Netherlands), unido a una cámara digital Sony 3CCD (Sony Inc. Europe, Berlin, Germany). Las imágenes digitalizadas fueron procesadas usando el programa de imágenes ANALYSIS 2.1. (Soft-Imaging Systems GmbH, Münster, Germany).

Los niveles de FSH y LH fueron también determinados por un ensayo inmunoenzimático ("enzyme linked immunosorbent assays", ELISA) usando kits comerciales específicos para rata (Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom). Los niveles séricos de testosterona fueron también medidos por ELISA (DRG Instruments; Marburg, Germany). Los niveles plasmáticos de resveratrol fueron determinados por HPLC acoplado a un diode-array, 24 h después de la última administración.

Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM para n = 14 ratas. Las diferencias entre grupos fueron comparadas por el test de Student-Neuman-Keuls. (*) Indica diferencias significativas del control, p<0,05.

La Tabla 1 muestra una comparación entre el grupo control y el grupo después del tratamiento con *trans*-resveratrol por el tiempo indicado. El grupo *trans*-resveratrol mostró un incremento del número de espermatozoides, una reducción del diámetro de los túbulos seminíferos y un incremento de la densidad tubular. Además, también se observó un incremento significativo en la concentración de LH, FSH y testosterona.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 245 609 B1

TABLA 1

Tests comparativos

Magnitud	Control	Resveratrol
Peso corporal inicial (g)	216 ± 1	219 ± 1
Peso corporal final (g)	394 ± 6	397 ± 9
Peso testículo (g)	1,85 ± 0,03	1,96 ± 0,04
Número de espermatozoides (x10 ⁸)	1,75 ± 0,20	2,51 ± 0,37*
Anormalidades morfológicas totales de espermatozoides (%)	12,5 ± 1,2	12,4 ± 1,1
Anormalidades de la cabeza de los espermatozoides (%)	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,2
Anormalidades del cuello y parte intermedia de los espermatozoides (%)	6,4 ± 1,0	6,2 ± 0,7
Gotas citoplasmáticas distales de los espermatozoides (%)	3,9 ± 0,7	4,7 ± 1,0
Anormalidades de la cola de los espermatozoides(%)	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,4
Diámetro de los túbulos seminíferos (µm)	437,5 ± 0,1	310,9 ± 0,1*
Densidad tubular (tubulae/mm ² del tejido testicular)	3,20 ± 0,18	6,58 ± 0,18*
Concentración de LH (ng/ml)	6,3 ± 1,84	11,48 ± 1,29*
Concentración de FSH (ng/ml)	102 ± 11	255 ± 34*
Testosterona (ng/ml)	3,61 ± 0,39	9,6 ± 2,8*
Niveles plasmáticos de <u>trans</u> -resveratrol (nM)	No se detecta	67 ± 20

REIVINDICACIONES

5 1. Uso del *trans*-resveratrol para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la infertilidad y/o subfertilidad causada por oligospermia en un mamífero macho.

2. Uso según la reivindicación 1, donde el mamífero es un humano.

3. Uso según la reivindicación 1, donde el mamífero es un ratón.

10 4. Uso según la reivindicación 1, donde el mamífero es una rata.

5. Uso del *trans*-resveratrol para la preparación de un medicamento para incrementar la cantidad de espermatozoides en un mamífero macho.

15 6. Uso según la reivindicación 5, donde el mamífero es un humano.

7. Uso según la reivindicación 5, donde el mamífero es un ratón.

20 8. Uso según la reivindicación 5, donde el mamífero es una rata.

25

30

35

40

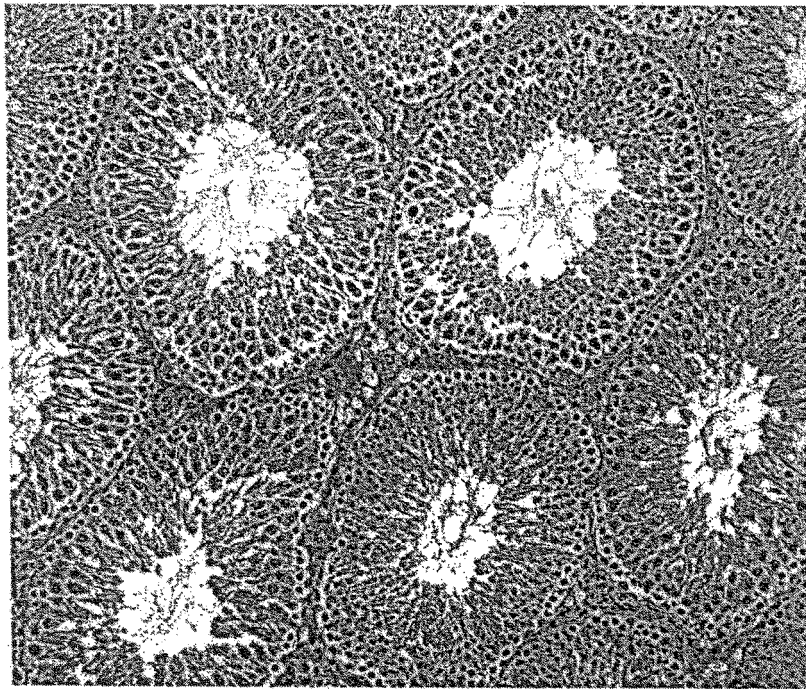
45

50

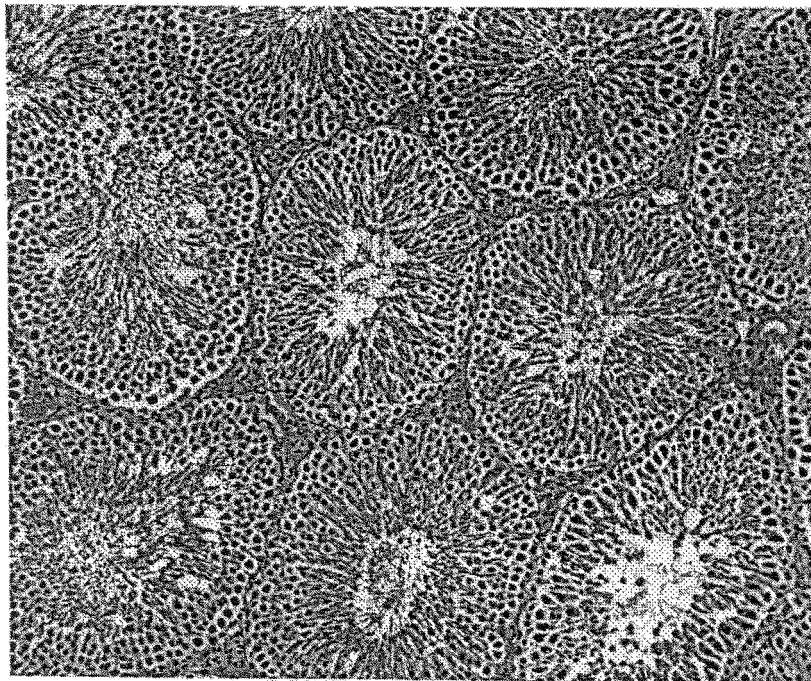
55

60

65



A



B

FIG. 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 245 609

⑫ Nº de solicitud: 200401599

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **18.06.2004**

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ **Int. Cl.7:** A61K 31/05, A61P 15/08

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KYSELOVA, VENDULA y col. Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vivo fertility of outbred CD-I mice. Reproductive Biology and Endocrinology. 2003, Vol. 1, ISSN 1477-7827.	1-8
A	WO 9958119 A1 (PHARMASCIENCE INC) 18.11.1999, reivindicaciones 1,6-10.	1-8
A	US 6008260 A (PHARMASCIENCE) 28.12.1999, resumen; reivindicación 1.	1-8
A	ES 2207287 T3 (SIGMA-TAU HEALTHSCIENCE S.p.A.) 16.05.2004, resumen; reivindicaciones 1,4.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

02.08.2005

Examinador

E. Albarrán Gómez

Página

1/1