



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 277 332**

51 Int. Cl.:
A61K 38/08 (2006.01)
A61D 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **95919568 .6**
86 Fecha de presentación : **25.05.1995**
87 Número de publicación de la solicitud: **0760672**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.03.1997**

54 Título: **Angiotensina II para mejorar la fertilización.**

30 Prioridad: **27.05.1994 GB 9410639**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2007

73 Titular/es: **QUEEN MARY & WESTFIELD COLLEGE**
Mile End Road
London E1 4NS, GB

72 Inventor/es: **Vinson, Gavin, Paul**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 277 332 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

Angiotensina II para mejorar la fertilización.

5 La presente invención se refiere al uso de angiotensina II, o una sal o amida de la misma, para promover la fertilización de óvulos de mamíferos, especialmente óvulos humanos. En particular, se refiere al uso de angiotensina II para mejorar la motilidad del esperma. La invención también se refiere a un procedimiento para promover la fertilización *in vitro*.

10 La angiotensina II es un octapéptido, que se considera que normalmente se produce en la sangre, en primer lugar por acción de la renina, una enzima secretada por el riñón, sobre el angiotensinógeno, dando como resultado la formación del decapeptido precursor, angiotensina I, y en segundo lugar la acción de una dipeptidasa “enzima conversora de angiotensina”; esta enzima actúa sobre la angiotensina I para formar angiotensina II. La angiotensina II, a su vez, experimenta hidrólisis por una aminopeptidasa para producir el heptapéptido angiotensina III (angiotensina 1 - 7).

15 La hormona angiotensina II (Ang II) forma parte del sistema renina-angiotensina que ayuda a controlar el equilibrio electrolítico y la presión sanguínea en el cuerpo. Hay varios tejidos en el cuerpo sobre los que actúa la Ang II, estos incluyen la glándula adrenal, útero, hígado, cerebro y riñón.

20 Entre las diversas funciones establecidas de la angiotensina II, se sabe que está implicada en la vasoconstricción, lo que conduce a hipertensión. La mayoría de los tratamientos para la presión sanguínea alta incluirán el bloqueo de la función de la angiotensina de una u otra manera. La Ang II estimula también la secreción de aldosterona por el córtex adrenal. La aldosterona es una potente hormona que actúa principalmente sobre el riñón para promover la retención de sodio y de este modo, entre otras cosas, aumentar los efectos hipertensores de la angiotensina que actúa directamente sobre la vasculatura.

25 Se sabe que la Ang II actúa sobre diversos sitios del cerebro, y una de sus acciones en animales es la regulación de la sed y la ingesta de líquidos.

30 La angiotensina tiene también efectos tróficos sobre la vasculatura, promoviendo el crecimiento de los músculos en la pared arterial. Se piensa que también es angiogénica, es decir causa vascularización del tejido recién desarrollado.

35 Se ha descubierto que la mayoría de los efectos establecidos de Ang II se producen mediante el subtipo AT1 del receptor de Ang II, que es un receptor de siete dominios transmembrana. Este receptor se ha clonado y secuenciado a partir de diversos tejidos, y se ha descubierto que es un polipéptido de 359 aminoácidos con un peso molecular predicho de aproximadamente 40 kD (Bernstein y Alexander, (1992), *Endocr. Rev.* 13, 381-386). Los estudios que usan marcado por fotoafinidad y agentes de entrecruzamiento han sugerido pesos moleculares para el receptor maduro de aproximadamente 65 kD y 116 kD, respectivamente, lo que puede reflejar la glucosilación de restos de asparagina en el dominio extracelular.

40 A partir del reciente desarrollo de una línea celular de hibridoma, véase Baker, S. y col, *J. Mol. Endocr.* 11, 241-245, (1993), se ha descubierto que es posible producir anticuerpos monoclonales para el subtipo AT1 del receptor de Ang II. Como consecuencia, se ha descubierto que dichos receptores existen en las colas de esperma de rata y esperma humano en desarrollo, y en esperma libre obtenido mediante lavado vaginal de ratas que se aparearon, y en esperma humano eyaculado.

45 En el *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, Vol. 7, Nº. 2, febrero 1984, p. 87-93, Kaneko y col informan de que la angiotensina II aumenta la velocidad de avance del esperma de donantes sanos. Sin embargo, Kaneko no descubrió aumento en el porcentaje de motilidad a bajas concentraciones (0,1 - 10 ng/ml) de angiotensina II, mientras que a concentraciones altas (1,0 µg/ml) se suprimió la motilidad.

50 La presente invención se basa en el descubrimiento de que la angiotensina II, o una sal o amida de la misma, aumenta el porcentaje de motilidad del esperma de pacientes que asisten a clínicas de esterilidad.

55 Esta propiedad recién descubierta de la angiotensina II permite usarla para promover la fertilización usando esperma de machos que tienen esperma de motilidad reducida, puesto que la capacidad del esperma para fertilizar óvulos está estrechamente relacionada con el porcentaje de motilidad.

60 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para promover la fertilización *in vitro* de óvulo de mamífero, especialmente óvulos humanos, que comprende añadir angiotensina II o una sal o amida de la misma a un medio de incubación que contiene oocitos y esperma de un mamífero macho que padece esterilidad.

65 En otro aspecto, esta invención proporciona un procedimiento para mejorar el porcentaje de motilidad de esperma de mamífero *in vitro*, comprendiendo el procedimiento:

Poner en contacto esperma de mamífero, especialmente humano, de baja motilidad de un mamífero macho que padece esterilidad con angiotensina II o una sal de la misma.

ES 2 277 332 T3

En los dibujos adjuntos:

La Fig. 1(a) ilustra el porcentaje de motilidad de espermatozoides no estimulados después de 1 y 5 minutos.

5 La Fig. 1(b) ilustra el porcentaje de motilidad de espermatozoides estimulados con angiotensina II después de 1 y 5 minutos.

La Fig. 2 ilustra el efecto de DuP-753 sobre el porcentaje de motilidad del espermatozoides.

10 La Fig. 3 ilustra el efecto de angiotensina II y angiotensina II con un anticuerpo monoclonal para el receptor de AT₁ sobre la velocidad del espermatozoides, Fig. 3(a) y el porcentaje de motilidad Fig. 3(b).

La Fig. 4 ilustra el efecto de angiotensina II y DuP-753 sobre el porcentaje de motilidad después de 5 minutos.

15 Las Fig. 5(a) y 5(b) ilustran el efecto de amida de angiotensina II sobre el porcentaje de motilidad para dos muestras durante un periodo de 30 minutos.

La Fig. 6(a y b) ilustra el efecto sobre la velocidad curvilínea (VCL) para las muestras de la Fig. 5.

20 La Fig. 7(a y b) ilustra el efecto sobre la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (DALC) para las muestras de la Fig. 5.

La Fig. 8 ilustra los efectos de la angiotensina II (símbolos macizos) sobre VCL y DALC en comparación con controles sin estimular (símbolos huecos).

25 Los procedimientos convencionales para fertilización *in vitro* se describen en “*In vitro* fertilization: a treatment for male infertility”, Cohen, J., Edwards, R. y col, 1985, Fertility and Sterility, 44, 422-432. En general, las muestras de espermatozoides se lavan en medio de cultivo tisular MEM, se centrifugan a aproximadamente 400 g, se resuspenden y se centrifugan de nuevo. Después se resuspenden en varias gotas de MEM y se coloca una capa de 0,5 ml de medio recién preparado encima. Después de 30 minutos en la incubadora a 37°C, el 30% superior del medio, que contiene esencialmente espermatozoides móviles, se retira y se distribuye a los oocitos (aproximadamente 10.000 espermatozoides por oocito) en MEM y se deja que se produzca la fertilización durante 24 horas.

30 Puede añadirse angiotensina II, o una sal o amida de la misma, en las etapas de lavado o durante la incubación final con el oocito. Cuando se añade al medio de incubación, la angiotensina II, o una sal o amida de la misma, se añade preferiblemente a una concentración de 1 nmol/l.

La invención se describirá adicionalmente en referencia a los siguientes Ejemplos:

Ejemplo 1

40 *Efecto de la Estimulación con Angiotensina II sobre la Motilidad del Espermatozoides*

Se obtuvieron muestras de espermatozoides humanos de 12 voluntarios y pacientes que asistían a la clínica de fertilidad asistida del Newham Hospital. Las muestras se suspendieron en medio mínimo esencial (MEM) con sales de Earle y glutamina y se observaron en una cámara Makler usando un microscopio invertido Olympus equipado con una videocámara Olympus ARTF-2. Los campos se grabaron en cinta de vídeo y se evaluó el porcentaje de motilidad a 1 minuto y a los 5 minutos después de mezclar con MEM en solitario (controles no estimulados) o con MEM que contenía 1 mol/litro de amida de angiotensina II.

50 El porcentaje de motilidad se estimó visionando las cintas de vídeo y congelando el fotograma para contar todos los espermatozoides en un campo y después, en modo de avance, contando los espermatozoides inmóviles, es decir, los que durante el periodo de observación no se movieron hasta un cuadro adyacente (100 μ metros) de la rejilla de la Cámara Makler. En la práctica, rara vez fue necesario el uso estricto de esta definición puesto que los espermatozoides eran completamente inmóviles o avanzaban libremente.

55 A partir de la Figura 1(a) puede observarse que no había diferencia significativa en el porcentaje de motilidad después de 5 minutos en los controles sin estimular. Dentro del grupo estimulado con angiotensina II, sin embargo, el porcentaje de motilidad después de 5 minutos era significativamente diferente del porcentaje de motilidad después de 1 minuto.

Ejemplo 2

Efecto del antagonista del receptor de AT₁ sobre la motilidad del espermatozoides

65 Se mezclaron una serie de seis muestras de espermatozoides, obtenidas de la misma fuente que en el Ejemplo 1, con MEM sin modificar o MEM que contenía DuP-753 (1 nmol/l)

Se estimó el porcentaje de motilidad de la misma manera que en el Ejemplo 1.

ES 2 277 332 T3

A partir de la Figura 2 es evidente que, en presencia de DuP-753, (2-*n*-butil-4-cloro-5-hidroximetil-1-[(2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il)metil]imidazol, sal de potasio), el porcentaje de motilidad disminuyó de forma significativa en relación con los controles no tratados.

5 Ejemplo 3

Efecto de la angiotensina II sobre la velocidad de los espermatozoides

10 Se obtuvieron muestras de esperma de la misma fuente que en el Ejemplo 1. Se guardó una serie de muestras como controles. A una segunda serie se le añadió amida de angiotensina II (10 nmoles/l). Una tercera serie se trató con anticuerpo monoclonal para el receptor de AT₁ antes de añadir la angiotensina.

15 Se midió la velocidad cronometrando el avance progresivo de los espermatozoides que atravesaban la rejilla en la Cámara Makler y cronometrándolos manualmente.

A partir de la Figura 3(a) puede observarse que la estimulación con angiotensina II estimulaba de forma significativa la velocidad de avance progresivo en comparación con los controles no tratados, mientras que la adición del anticuerpo monoclonal inhibía la respuesta a angiotensina II.

20 A partir de la Figura 3(b) puede observarse que se obtuvieron resultados similares para el efecto sobre el porcentaje de esperma mótil.

Ejemplo 4

25 Se obtuvieron muestras de esperma de la misma fuente que en el Ejemplo 1. Se guardó una serie de muestras como controles. Una segunda serie se expuso a angiotensina II (1 μmol/l) durante 5 minutos. Una tercera serie se expuso a angiotensina II (1 μmol/l) durante 5 minutos y después se añadió DuP-753 (1 μmol/l).

30 El porcentaje de esperma mótil se midió usando el mismo procedimiento que se usó en el Ejemplo 1.

A partir de la Figura 4 puede observarse que, cuando se comparan con los controles, en la mayoría de las muestras la angiotensina II potenció el porcentaje de espermatozoides que eran móviles después de 5 minutos. Este potenciamiento se redujo de forma generalizada en muestras a las que se les añadió DuP-753.

35 Ejemplo 5

Efecto de la angiotensina sobre la motilidad del esperma

40 Se obtuvieron muestras de esperma de la misma fuente que en el Ejemplo 1. Se guardó una serie de muestras como controles. A una segunda serie se le añadió amida de angiotensina II (1 nmol/l).

La motilidad del esperma se ensayó usando un sistema informático que mide diferentes aspectos de la motilidad del esperma, concretamente la velocidad curvilínea (VCL) y la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (DALC).

45 Las Figuras 5(a) y 5(b) muestran el porcentaje de esperma mótil en cada una de las dos muestras, durante un periodo de 30 minutos en presencia (barras sombreadas) y ausencia (barras claras) de amida de angiotensina II (1nmol/l).

Las Figuras 6(a) y 6(b) muestran el ensayo de VCL en las mismas muestras.

50 Las Figuras 7(a) y 7(b) muestran el ensayo de DALC en las mismas muestras.

La Figura 8 compara VCL y DALC en muestras de esperma de control (no estimuladas, símbolos huecos) y estimuladas con angiotensina II (AII) (símbolos macizos).

55 A partir de las figuras está claro que la amida de angiotensina II estimula VCL y DALC, dos parámetros que están asociados con un aumento en la fertilidad.

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para promover la fertilización *in vitro* de óvulos de mamífero que comprende añadir angiotensina II o una sal o amida de la misma a un medio de incubación que contiene oocitos y espermatozoides de baja motilidad de un mamífero macho que padece esterilidad.

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la angiotensina II o sal o amida de la misma se añade a una concentración de aproximadamente 1 nmol/litro.

10 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se usa amida de angiotensina II para promover la fertilización.

15 4. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el mamífero es un ser humano.

5. Un procedimiento para mejorar el porcentaje de motilidad de espermatozoides de mamífero *in vitro*, comprendiendo el procedimiento:

20 poner en contacto espermatozoides de mamífero de baja motilidad de un mamífero macho que padece esterilidad con angiotensina II o una sal de la misma.

6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la angiotensina II o sal o amida de la misma se añade a una concentración de aproximadamente 1 nmol/litro.

25 7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que se usa amida de angiotensina II para mejorar la motilidad.

30 8. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el mamífero es un ser humano.

35

40

45

50

55

60

65

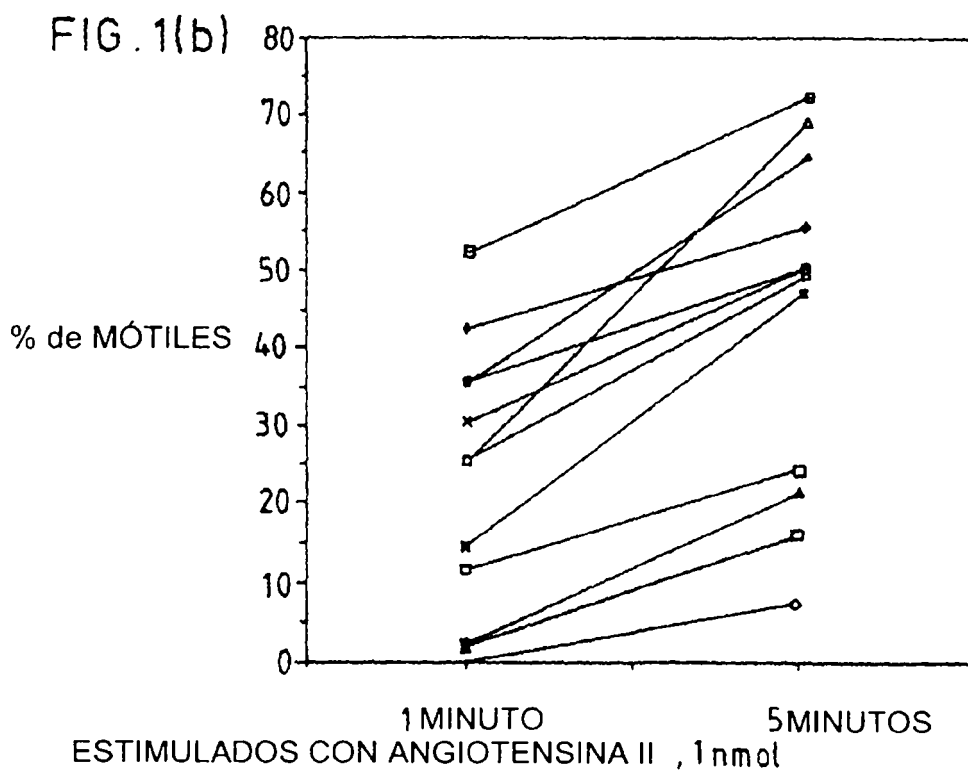
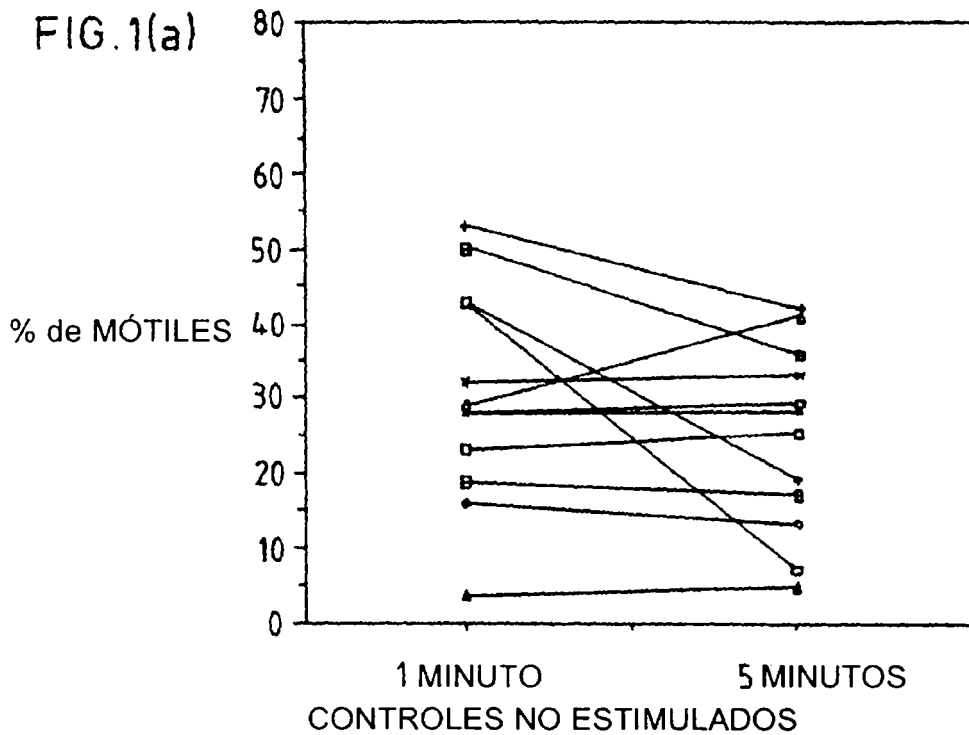
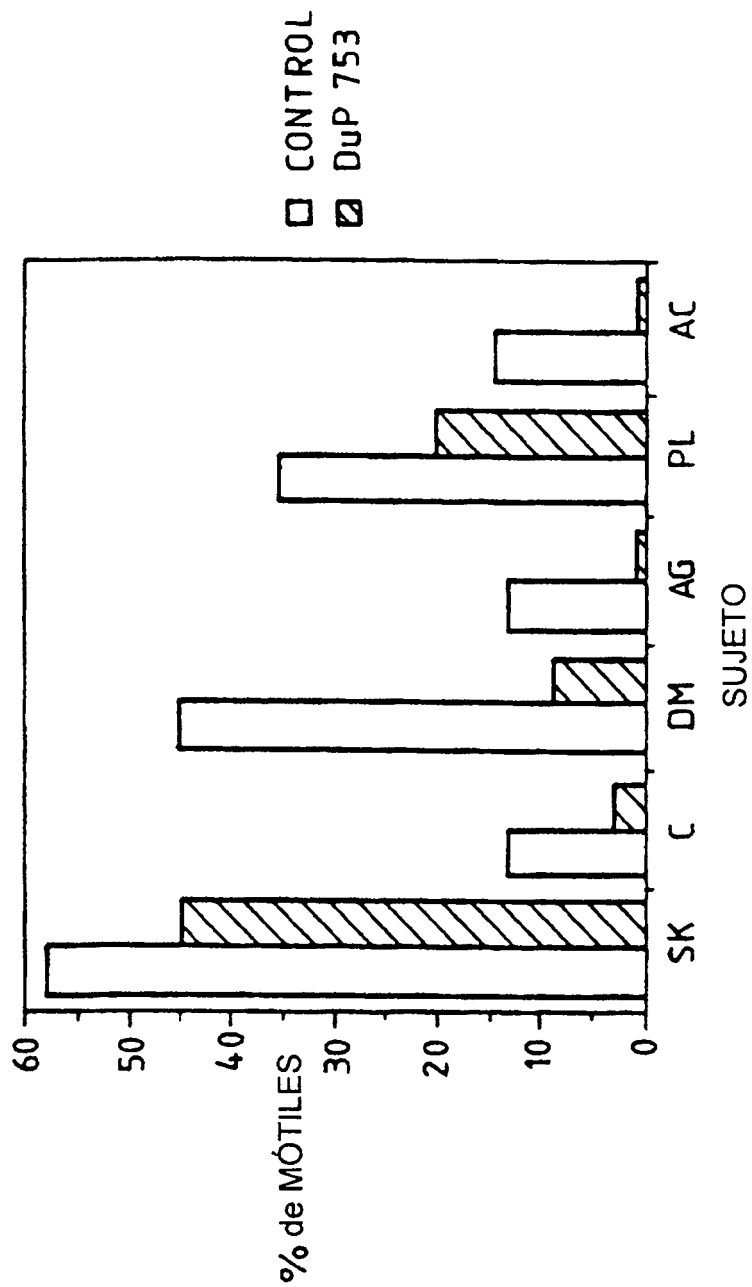


FIG. 2



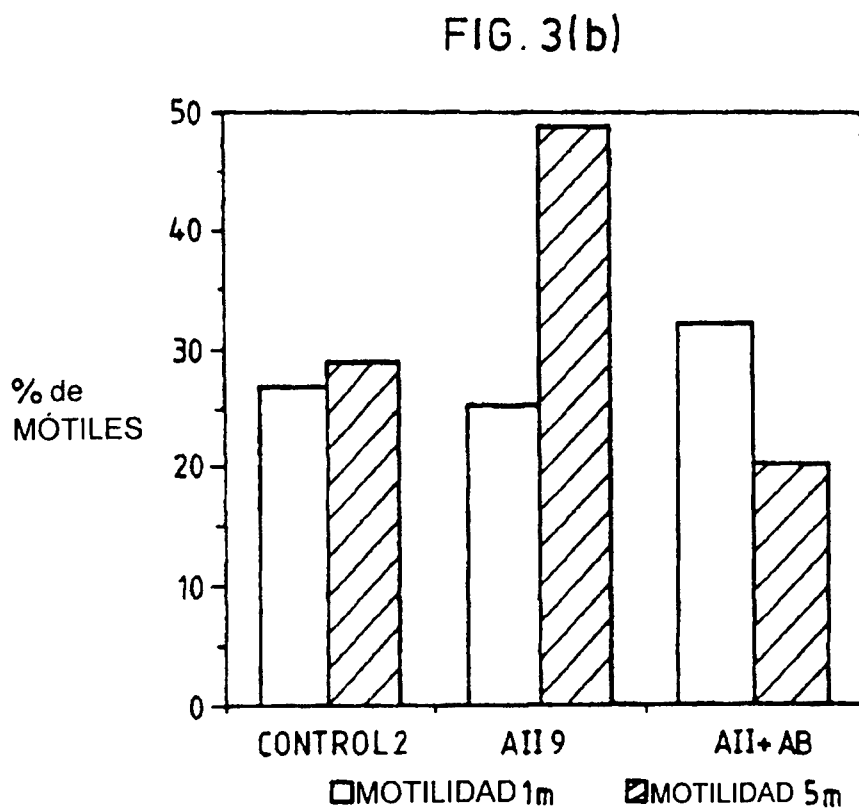
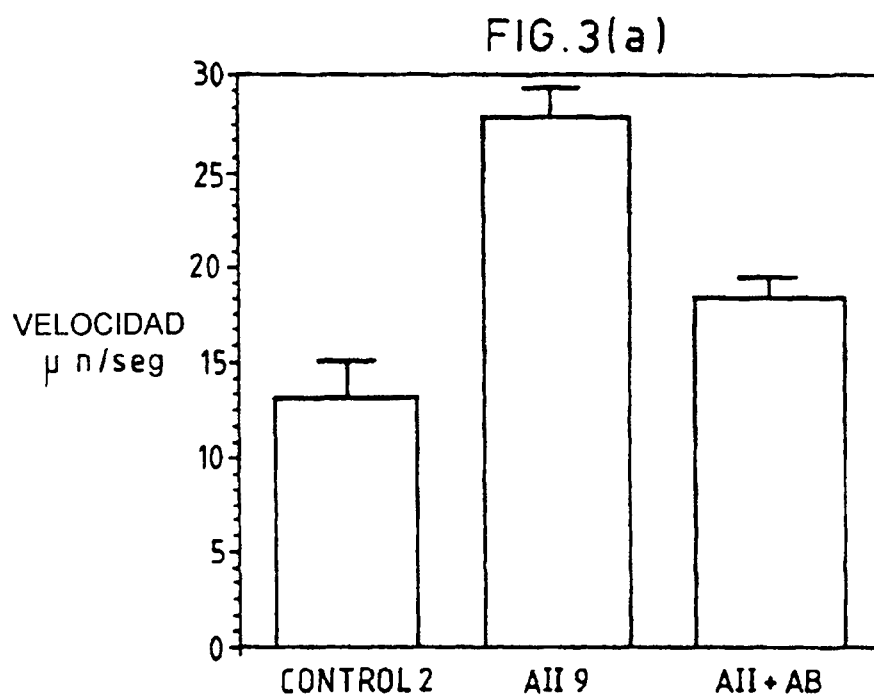


FIG. 4

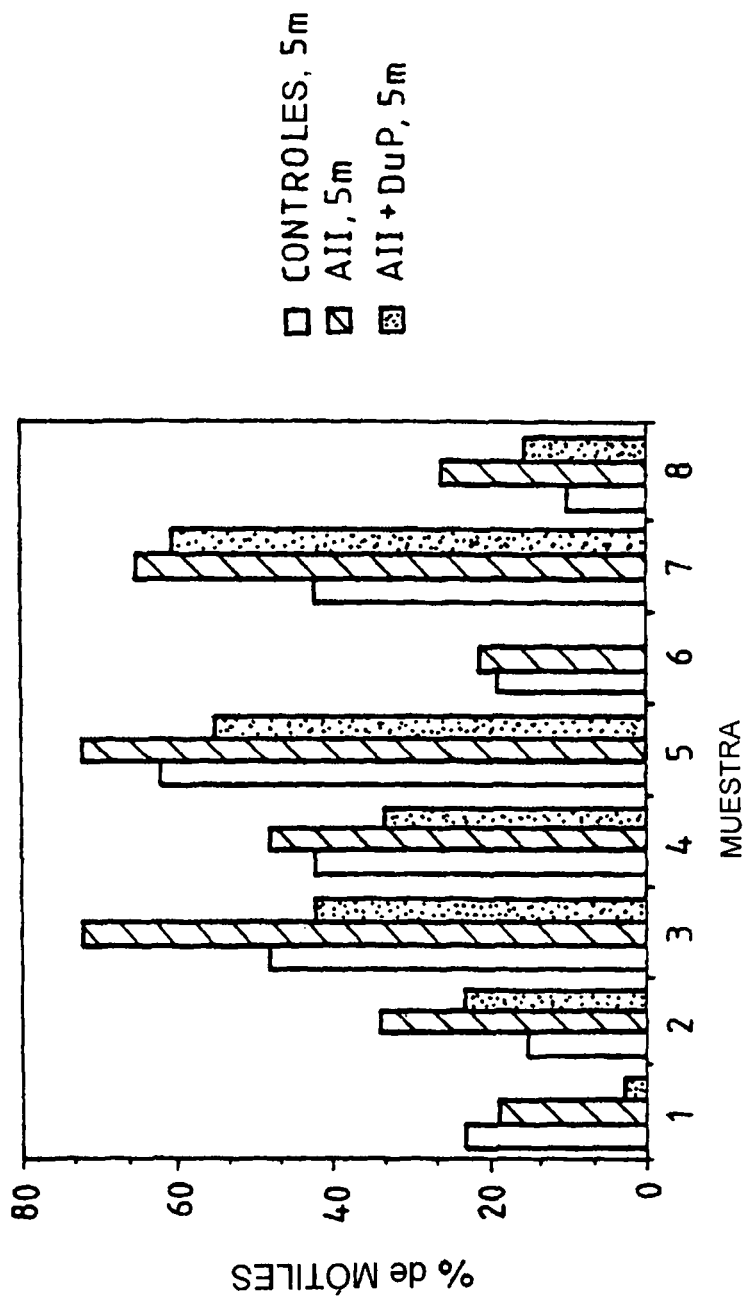


FIG. 5 (a)

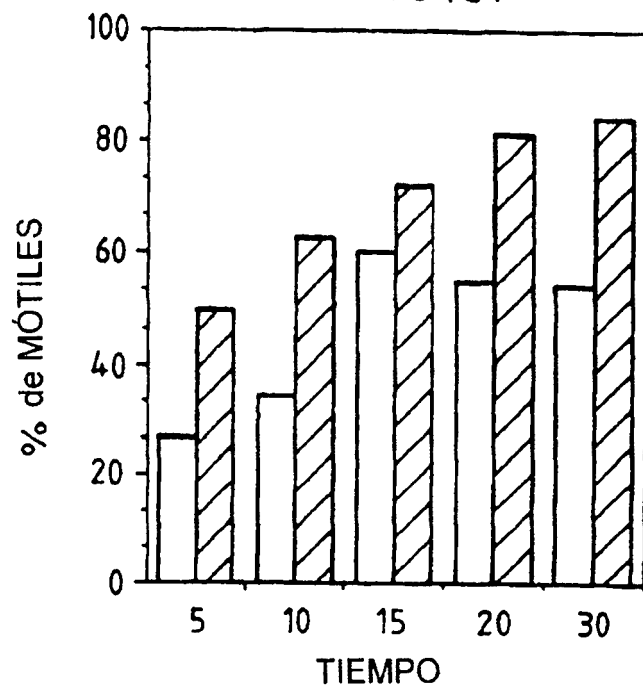
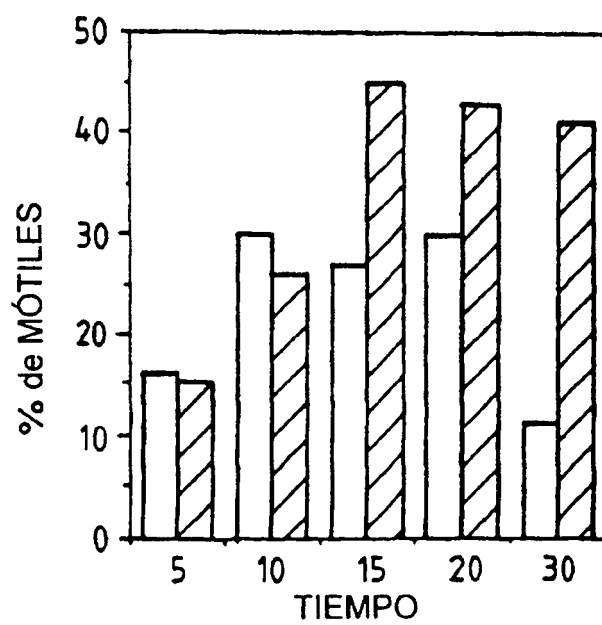
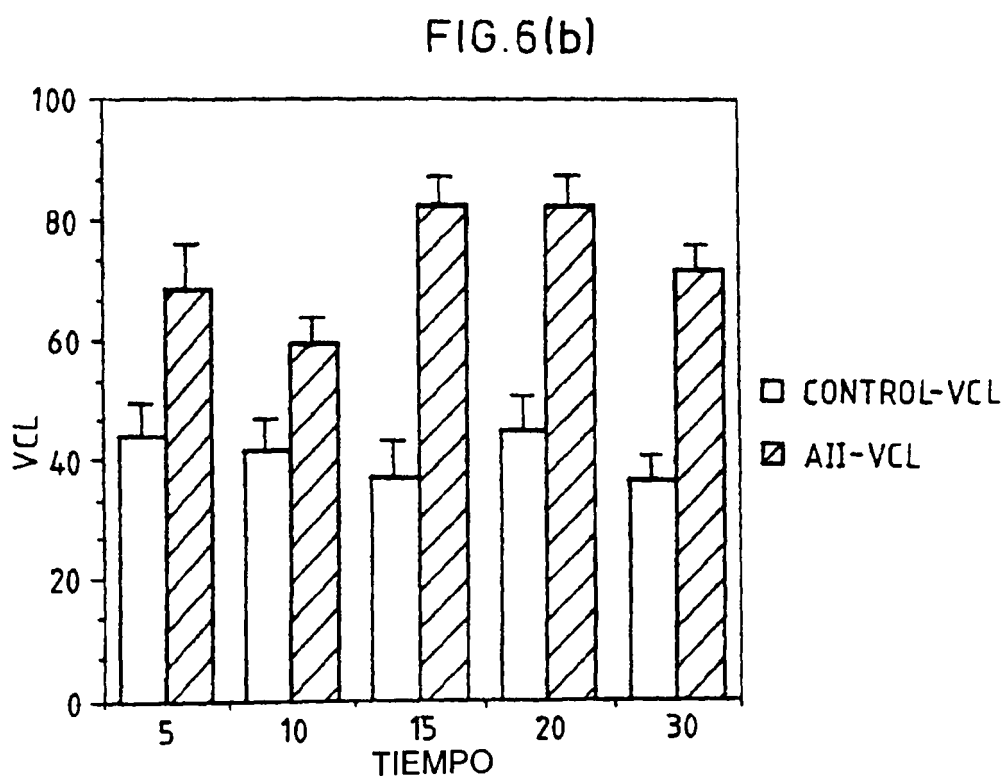
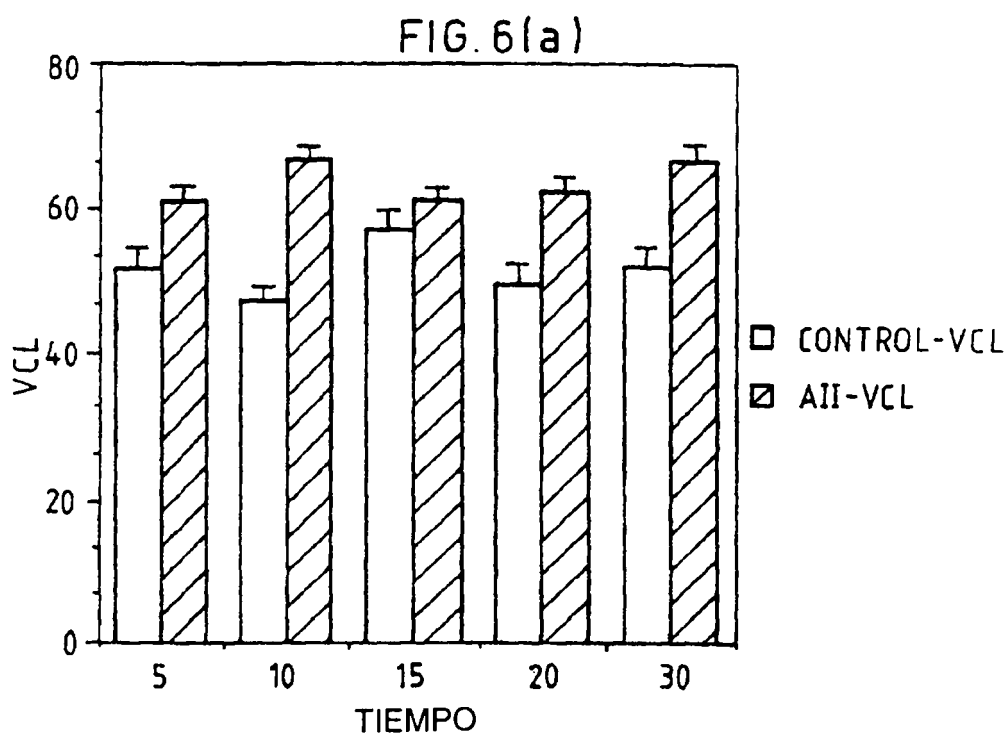


FIG. 5 (b)





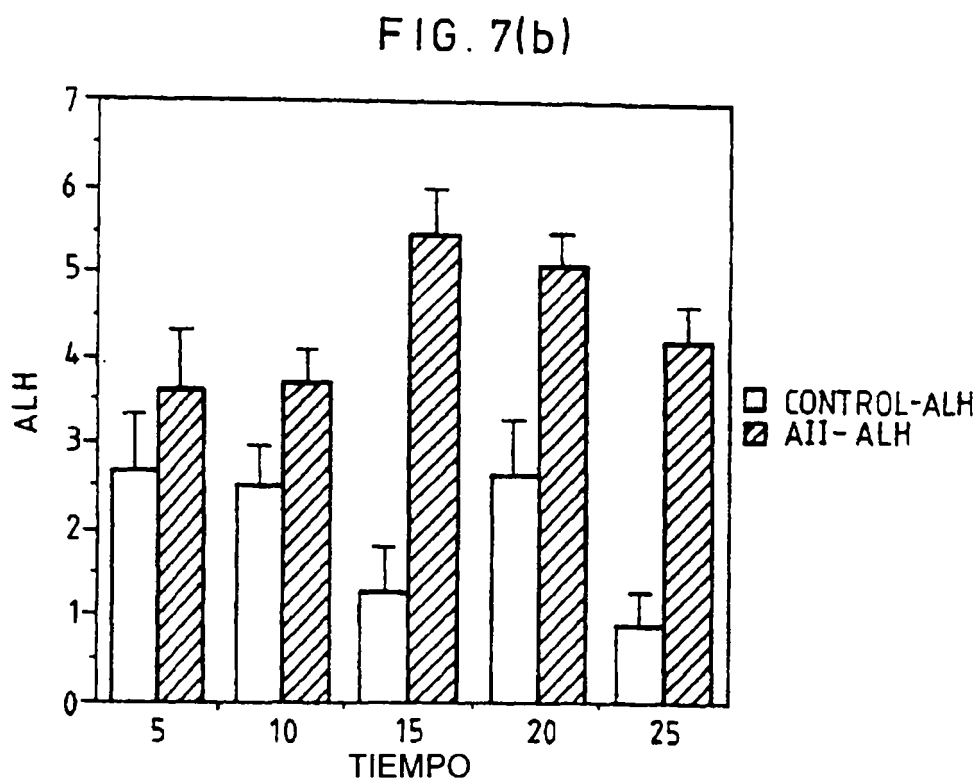
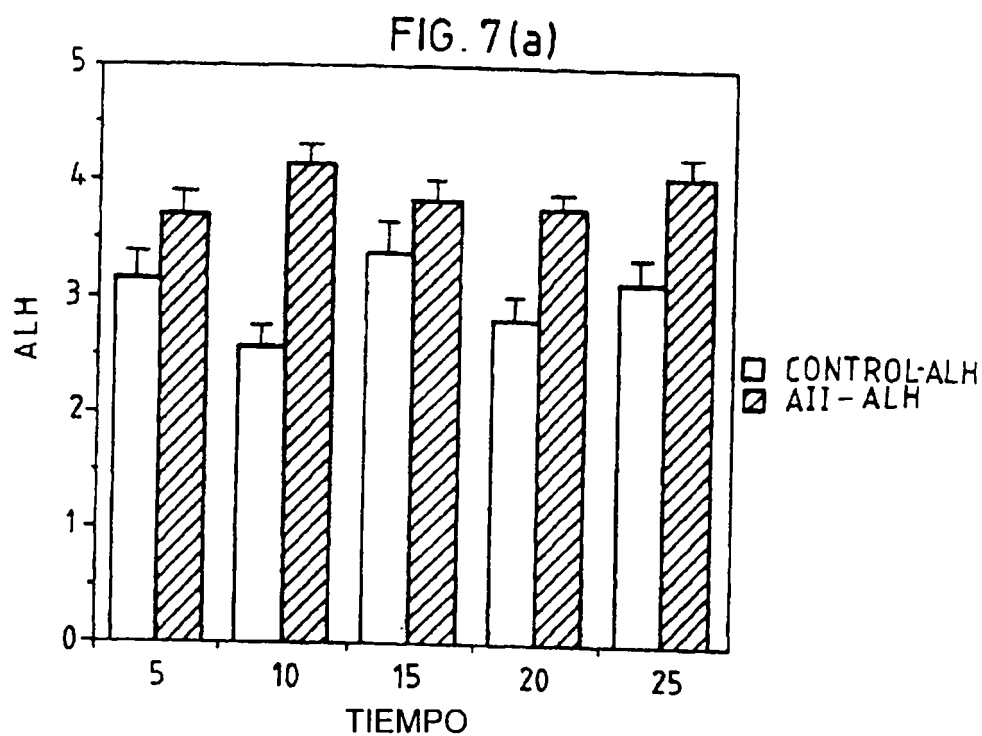


FIG. 8

