

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102009901733432A1

Publication Date

20101119

Applicant

PHARMAGUIDA S.R.L.

Title

USO DI UNA COMBINAZIONE DI D-ASPARTATO E L-ASPARTATO PER IL
TRATTAMENTO DELLA INFERTILITA' MASCHILE.

**Uso di una combinazione di D-aspartato e L-aspartato
per il trattamento della infertilità maschile**

La presente invenzione concerne l'uso di una combinazione di D-aspartato e L-aspartato per il trattamento della infertilità maschile. In particolare, l'invenzione concerne l'uso di una miscela costituita da D-aspartato e L-aspartato in un rapporto di almeno 1 per stimolare l'attività procreativa nell'uomo mediante un incremento del numero degli spermatozoi e della loro motilità.

L'infertilità maschile può essere causata da difetti relativi alla produzione, emissione o funzionalità degli spermatozoi e rappresenta circa il 35% delle cause di infertilità nella coppia. Essa può essere causata da eventuali infezioni genito-urinarie pregresse o in atto; malattie come la varicella, morbillo o parotite, malattia virale che può provocare nell'uomo l'orchite (infezione dei testicoli); malattie a trasmissione sessuale; precedenti interventi chirurgici o traumi a livello genitale. Inoltre, lo stile di vita, come l'impiego di alcool, fumo, droghe e lavori a rischio, e fattori ambientali, possono giocare un ruolo importante. Il varicocele può determinare un deficit nella formazione di spermatozoi mobili. Anche dosaggi alterati di FSH (follicotropina), LH (luteotropina), PRL (prolattina) e T (testosterone) possono influire sul processo di produzione degli spermatozoi.

Le cure oggi impiegate per l'infertilità maschile prevedono trattamenti con farmaci iniettivi o a somministrazione orale. Tra i farmaci iniettivi, viene impiegata la Menotropina, principio attivo di menogon fiale, che consiste in una preparazione di gonadotropine (FSH e LH, presenti in eguale quantità) estratte dall'urina di donne in postmenopausa, da cui la definizione di ormone umano della menopausa (HMG). HMG agisce direttamente nelle ovaie e nei testicoli, stimolando il processo ovulatorio, la spermatogenesi e la steroidogenesi. Nei testicoli, FSH è essenzialmente deputato alla stimolazione della maturazione delle cellule del Sertoli e influisce inoltre sulla maturazione dei tubuli seminiferi e sullo sviluppo degli spermatozoi. Poiché è necessaria una concentrazione elevata di androgeni nei testicoli, questa può essere ottenuta con un precedente trattamento con HCG o con lo schema terapeutico di associazione con HCG 5000 UI a settimana per 3 mesi. Tuttavia, questa terapia presenta alcuni svantaggi, ad esempio, HCG non è efficace se somministrata per via orale e deve essere somministrata per via intramuscolare. In alcuni casi può verificarsi la formazione di anticorpi verso HCG a seguito di una somministrazione ciclica ripetuta del prodotto, rendendo di conseguenza inefficace la terapia. Un ulteriore svantaggio di questa terapia è l'elevato costo, dato che lo schema di terapia più usato prevede la somministrazione intramuscolare trisettimanale per un ciclo di tre mesi e bassa compliance da parte del

paziente date le ripetute somministrazioni intramuscolari settimanali.

Una terapia alternativa consiste nel trattamento con ormone rilasciante le gonadotropine (GnRH). Questa terapia prevede una somministrazione pulsatile con pompa portatile (endovenosa o sottocutanea) ad intervalli di 90-120 minuti. Sebbene tale trattamento entro tre mesi ristabilisca le concentrazioni di testosterone e gonadotropine e stimoli la spermatogenesi, richiede però che il paziente trasporti una pompa portatile con un catetere a dimora e ciò può essere d'ostacolo in questi pazienti.

Per quanto riguarda le terapie orali, possono essere impiegati gli antiestrogeni. Questi composti (clomifene citrato e tamoxifene) sono stati ampiamente utilizzati nel trattamento dell'infertilità maschile, in assenza di endocrinopatie. Gli antiestrogeni mantengono la capacità di legarsi in maniera competitiva ai recettori estrogenici, sia a livello ipotalamico sia periferico, inducendo così un aumento dei livelli plasmatici delle gonadotropine e secondariamente del testosterone intratesticolare. L'effetto farmacologico sulla spermatogenesi dovrebbe esplicarsi attraverso l'aumento delle concentrazioni di questi ormoni che agiscono direttamente sulla spermatogenesi. In particolare il clomifene citrato a bassi dosaggi (25-50 mg) somministrati per un periodo di 3-5 mesi è in grado di migliorare le qualità seminali, mentre concentrazioni più elevate (200-400

mg) inducono una soppressione della spermatogenesi e una riduzione della concentrazione spermatica.

Numerosi studi non controllati hanno riportato incrementi variabili della concentrazione spermatica e del tasso di gravidanza che variava dallo 0 all'80% e nei quali la risposta al trattamento si osservava quasi esclusivamente nei pazienti con oligozoospermia lieve-moderata (10-20 milioni/ml). Alla luce di questi dati, l'organizzazione mondiale della sanità (OMS) ha condotto uno studio multicentrico in doppio cieco, placebo versus clomifene citrato, nei soggetti affetti da oligozoospermia idiopatica che non ha documentato alcun miglioramento del tasso di gravidanza nei pazienti trattati con tale farmaco (WHO. special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction Annual Technical Report 1990. Geneva: WHO 1991: 146-7).

Sempre come terapia orale, possono essere impiegati gli inibitori dell'aromatasi come, ad esempio, testolactone. In studi non controllati, la somministrazione del testolactone (1g/die) in soggetti oligozoospermici è stata in grado di aumentare la concentrazione spermatica e la percentuale di gravidanze. In un successivo trial randomizzato, placebo-controllato e in doppio cieco, con dosi più elevate di testolactone (2 g/die), non si è osservata nessuna variazione dei parametri seminali e nessuna gravidanza si è registrata nel gruppo trattato così come nel gruppo placebo. Un altro composto dotato di un'attività inibitoria selettiva sull'aromatasi è

l'anastrozolo, che alla dose di 1 mg al giorno sembra essere sovrapponibile al testolactone per gli effetti sulla spermatogenesi. Sono sicuramente necessari ulteriori studi per valutare la reale efficacia di questi farmaci nel trattamento dell'infertilità maschile a causa del numero estremamente ridotto di soggetti studiati sino ad oggi.

La somministrazione di androgeni è stato uno dei primi tentativi terapeutici effettuati allo scopo di migliorare i parametri seminali nei soggetti affetti da oligozoospermia. Attualmente vengono utilizzati due deboli composti androgenici. Il mesterolone, un derivato 5 α -ridotto del testosterone che non influenza la secrezione delle gonadotropine, è stato utilizzato in monoterapia a concentrazioni variabili da 50 a 150 mg al giorno in diversi trials con modificazioni diverse dei parametri seminali. Gli studi più recenti e un'analisi condotta dall'OMS non hanno documentato variazioni significative di tutti i parametri seminali analizzati e della percentuale di gravidanze rispetto ai valori precedenti al trattamento e al gruppo trattato con placebo. Allo stesso modo il testosterone undecanoato sembrava avere la capacità di migliorare i parametri seminali in studi controllati senza influenzare i livelli delle gonadotropine e del testosterone; tuttavia trials successivi non hanno confermato questi risultati e pertanto l'uso di questo composto merita ulteriori verifiche.

Infine, sono impiegati L-arginina o associazioni di altri amminoacidi in forma levogira e/o integratori

vitaminici come coadiuvanti nelle oligoastenospermie e nelle iposomie, con somministrazione orale per 2-3 volte al giorno per tre mesi.

Alla luce di quanto sopra esposto risulta pertanto evidente l'esigenza di poter disporre di nuovi metodi per la cura della infertilità maschile che risolvano gli svantaggi dei metodi noti.

L'acido D-aspartico è un amminoacido naturale scoperto per la prima volta nel 1977 da Antimo D'Aniello nel cervello del polpo (mollusco marino dal nome scientifico *Octopus vulgaris*) e pubblicato in collaborazione con Antonio Giuditta su *J. of Neurochemistry* (Ref. 1-2). Susseguenti ricerche condotte dallo stesso ricercatore in collaborazione con altri ricercatori italiani e stranieri hanno dimostrato che l'acido D-aspartico è presente non solo nel sistema nervoso, ma anche nel sistema endocrino di molte specie di animali marini quali molluschi, crostacei, opistobranchi e pesci (Ref.. 3-5) e terrestri, quali rana (Ref. 6-7), lucertola (Ref. 8), pollo (Ref. 9), ratto (Ref. 9-11), pecora (12) e uomo (Ref. 13-15). La concentrazione è variabile da specie a specie. In genere, negli animali meno evoluti l'acido D-aspartico è presente ad una maggiore quantità rispetto a quelli più evoluti. Inoltre, è stato studiato che quest'amminoacido nei mammiferi, incluso l'uomo, durante la vita embrionale si trova in elevate concentrazioni nel cervello dove svolge un ruolo nello sviluppo del sistema nervoso. Invece, nell'età adulta, l'acido D-aspartico si trova ad elevate concentrazioni

nel sistema endocrino e in particolare nella ghiandola pituitaria e nei testicoli ove svolge un ruolo nel sistema endocrino. Per una completa rassegna vedi (Ref. 16) e la seguente tabella 1, estratta da una pubblicazione degli autori su *Brain Reserch Review* vol. 53, pag. 215-234, 2006, che mostra il contenuto di D-aspartato nei tessuti nervosi e endocrini in varie classi di animali.

Tabella 1: Concentrazioni dell'acido D-asparico in tessuti animali provenienti da diverse specie

Specie	Animali	Tessuti	Acido D-Aspartico nmol/g tessuto
Molluschi	<i>Octopus vulgaris</i>	cervello	8000-15000
	<i>Octopus vulgaris</i>	retina	3000-4000
	<i>Octopus vulgaris</i>	testicolo	2000-3000
Opisto- branchi	<i>Aplysia fasciata</i>	gangli	600-800
	<i>Aplysia limacina</i>	gangli	3000-4000
Tunicati	<i>C. Intestinalis</i>	gangli	300-500
Crostacei	<i>Rock lobster</i>	cervello	4000-5000
	<i>Rock lobster</i>	retina	800-900
Amfibi	<i>Rana esculenta</i>	testicolo	200-300
		ghiandola di Harder	100-150
Rettili	<i>Podarcis sicula</i>	organi riproduttivi	20-30
Pesci	<i>Merlucius merlucius</i>	cervello	30-40
Uccelli	<i>Gallus gallus</i>		
	Embrione:	cervello e retina	300-600
	Adulto:	cervello e retina	30-50
Mammifero	Ratto	cervello (embrione)	250-350

	cervello (nell'adulto)	15-30
	retina (neonatale)	300-400
	retina (adulto)	30-60
	pituitaria (2 giorni)	10-20
	pituitaria (adulto)	120-140
	ghiandola pineale	650-3000
	testicoli (embrione)	50-70
	testicoli (adulto)	220-250
	fegato	10-20
Uomo	cervello (embrione)	340-380
	cervello (adulto)	20-40

I valori rappresentano la concentrazione media in nmol di D-Asp/g di tessuto fresco (A. D'Aniello; *Brain Research Review*, **53**, 215-234, 2006) (Ref. 16).

Nel ratto, studi sull'acido D-aspartico hanno evidenziato che, se questo composto viene somministrato per via orale, esso è capace di indurre un temporaneo aumento di alcuni ormoni nel sangue quali: l'ormone luteinizzante (LH) (Ref: 17-18), l'ormone della crescita (Ref: 18), la prolattina (PRL) (Ref: 19) e il testosterone (Ref: 17-18). Recentemente infine è stato anche dimostrato che l'acido D-aspartico è coinvolto nell'infertilità maschile umano (Ref. 20).

Nell'uomo è stato osservato che nel liquido seminale e negli spermatozoi di persone fisiologicamente fertili (persone che hanno un numero di spermatozoi superiore a 20 milioni/ml di liquido seminale e una motilità superiore al 70%) è presente l'acido D-aspartico in concentrazione di 80 ± 24 nmol/ml nel liquido seminale e 130 ± 30 fmol/spermatozoo. Invece, nel liquido seminale di persone infertili, cioè persone che hanno un numero di spermatozoi nel liquido seminale

ridotto rispetto alla normalità ed una motilità degli stessi al di sotto dei valori fisiologici (oligoastenozoospermici), e nel liquido seminale di persone che non hanno spermatozoi (azoospermici), il contenuto dell'acido D-aspartico è significativamente diminuito sia nel liquido seminale che negli spermatozoi. Specificamente, nel liquido seminale di soggetti oligoastenozoospermici, l'acido D-aspartico si trova diminuito di circa 3 volte e, in quelli azoospermici, è ridotto addirittura di 6 volte. Da valori di 130 ± 35 fmol/spermatozoo trovato nelle persone fertili a valori di 60 ± 10 fmol/spermatozoo trovato negli oligoastenozoospermici. La Tabella 2 mostra il contenuto dell'acido D-aspartico nel liquido seminale e negli spermatozoi umano.

Tabella 2: Contenuto di acido D-aspartico nel liquido seminale e negli spermatozoi umano

Liquido seminale) (nmol/ml)			Spermatozoi (fmol/spermatozoo)	
Normali ¹	OAT ²	AZO ³	Normali ¹	OAT ²
80	26	12	130	60
± 10	± 6.0	± 1.5	± 35	± 5.0

¹Normospermici donatori. ²Oligoastenoteratospermici donatori. ³Azoospermici donatori.

I valori indicano la media e la deviazione standard ottenuti da 10 campioni di liquido seminale di donatori normali, 10 campioni di liquido seminale di donatori

oligoastenoteratospermici (liquido seminale contenete un numero di spermatozoi inferiore a 20 milioni/ml di seme) e 10 campioni di donatori azoospermici non ostruttivi (donatori con un numero di spermatozoi inferiore ad 1 milione/ml di seme).

Il valore dell'acido D-aspartico veniva ottenuto usando uno specifico metodo cromatografico all'HPLC combinato con l'uso della D-aspartato ossidasi. La differenza dell'acido D-aspartico tra i donatori normospermici e quelli oligoastenoteratospermici era significativa per $P < 0.01$, e la differenza tra i donatori oligoastenoteratospermici e azoospermici anche era significativa per $P < 0.01$.

Questi risultati uniti ad altri risultati inerenti l'azione dell'acido D-aspartico sull'incremento dell'ormone LH (ormone luteinizzante; Luteizing Hormone) e del testosterone (Ref. 17 e 18) ottenuti sul ratto avevano indicato che l'assunzione dell'acido D-aspartico nell'uomo (una o due dosi giornaliere da 3 g) per almeno 30 giorni potesse indurre un aumento dei valori dell'LH e del testosterone e del numero e della motilità degli spermatozoi anche nell'uomo (domanda di brevetto italiano RM2005A000468 del 14 Settembre 2005).

Gli autori della presente invenzione hanno ora trovato che la combinazione di acido D-aspartico e acido L-aspartico apporta un notevole aumento di efficacia rispetto all'assunzione di una pari quantità del solo acido D-aspartico. Gli autori hanno condotto studi sia sull'animale sia sull'uomo che dimostrano un incremento maggiore nel numero e nella motilità degli

spermatozoi nei soggetti trattati con la combinazione secondo l'invenzione rispetto a quelli trattati con il solo acido D-aspartico. In particolare nell'uomo si osserva anche un aumento degli ormoni LH e testosterone. I risultati dello studio condotto sul coniglio e sull'uomo (non pubblicati) indicano che i sali neutri dell'acido D-aspartico e dell'acido L-aspartico neutralizzati con lo ione Na^+ possono essere utilizzati per stimolare l'attività procreativa nell'uomo via un incremento del numero e della vitalità degli spermatozoi.

L'impiego della combinazione secondo l'invenzione nella terapia dell'infertilità offre il notevole vantaggio di poter eseguire un'unica somministrazione giornaliera ed un costo, per ciclo di trattamento di 60-90 giorni, inferiore rispetto alle terapie note.

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione l'uso di una composizione comprendente o consistente in uno o più sali di acido D-aspartico in concentrazione dal 50% al 100%, preferibilmente dal 50 all'80% e in uno o più sali di acido L-aspartico in concentrazione dal 0% al 50%, preferibilmente dal 20 al 50%, (tali percentuali sono riferite alla somma dei sali di acido D-aspartico e acido L-aspartico) e usati per la preparazione di un medicamento per il trattamento della infertilità maschile. Preferibilmente, la presente invenzione si riferisce alla infertilità maschile non ostruttiva caratterizzata da condizione di oligo e/o astenozoospermia con o senza ipogonadismo ipogonadotropo.

Preferibilmente, il sale di acido D-aspartico o di L-aspartico è un sale di sodio o una miscela di sale di sodio e di potassio o magnesio. Secondo una forma preferita di realizzazione della presente invenzione uno o più sali di acido D-aspartico sono in concentrazione dell'80% e uno o più sali di acido L-aspartico sono in concentrazione del 20%, dette percentuali essendo riferite alla somma dei sali di acido D-aspartico e L-aspartico. Comunque, è anche una forma preferita che la composizione dell'acido D-aspartico sia al 50% rispetto al totale D+L-aspartico, così anche la composizione dell'acido L-aspartico sia al 50% rispetto al totale. La composizione secondo l'invenzione può comprendere ulteriormente uno o più coadiuvanti scelti nel gruppo che consiste in amminoacidi, vitamine, minerali, ormoni stimolanti la funzione riproduttiva, callicreina, antibiotici, antinfiammatori, antiandrogeni, androgeni, pentossifillina, gonadotropine, ormone rilasciante le gonadotropine (GnRH), stimolatori adrenergici, integratori dietetici, antiossidanti (acido alfa lipoico, coenzima Q 10, glutatione e altri antiossidanti non menzionati qui). In particolare, gli amminoacidi possono essere scelti nel gruppo che consiste in alanina, arginina, carnitina, cisteina, glutammina, glicina, leucina, lisina, isoleucina, metionina, ornitina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina.

Le vitamine possono essere scelte nel gruppo che consiste in vitamina A, C, D3, E, K, B1, B2, B6, B12,

PP, biotina (H), acido folico, acido lipoico.

Infine, i minerali sono scelti nel gruppo che consiste in magnesio, potassio, zinco, manganese, molibdeno, cromo, selenio, calcio pantotenato, ferro, rame, iodio, fosforo, fluoro, calcio.

Le vitamine possono essere impiegate in concentrazioni che variano come segue: la vitamina A dallo 0,0048% allo 0,024%, la vitamina C dallo 0,36% al 3,6%, la vitamina D3 dallo 0,00003% allo 0,00015%, la vitamina E dallo 0,06% allo 0,6%, la vitamina K dallo 0,00042% allo 0,0021%, la vitamina B1 dallo 0,0084 allo 0,042%, la vitamina B2 dallo 0,0096% allo 0,048%, la vitamina B6 dallo 0,012% allo 0,06%, la vitamina B12 dal $6 \cdot 10^{-6}\%$ al $3 \cdot 10^{-5}\%$, vitamina PP dallo 0,108% allo 0,54%, biotina dallo 0,0009% al $4,4 \cdot 10^{-5}\%$, acido folico dallo 0,0012% allo 0,006%, dette percentuali essendo percentuali in peso rispetto al peso della composizione totale.

Le concentrazioni dei minerali possono variare secondo le seguenti percentuali: il magnesio dal 3,2% al 9%, il potassio dallo 0,4% al 4%, lo zinco dallo 0,09% allo 0,45%, il manganese dallo 0,02% allo 0,07%, il molibdeno, il cromo o il selenio dallo 0,0003% allo 0,002%, il calcio pantotenato dallo 0,04% allo 0,15%, ferro dallo 0,084% allo 0,021%, rame dallo 0,02% allo 0,1%, iodio dallo 0,0009% allo 0,0045%, fosforo dal 2,5% al 20%, fluoro dallo 0,005% allo 0,02%, calcio dal 3,24% al 16,2%, dette percentuali essendo percentuali in peso rispetto al peso della composizione totale.

Le concentrazioni degli amminoacidi oltre

all'acido D-aspartico e L-aspartico possono variare dallo 0,6% al 10% in peso rispetto al peso della composizione totale.

Secondo una forma preferita di realizzazione della presente invenzione la composizione può comprendere, oltre a D- e L-aspartato, acido folico, vitamina B6, vitamina B12 e conservanti potassio sorbato e sodio benzoato. In particolare, la concentrazione di acido folico può variare da 0,002% a 0,006%, di Vitamina B6 da 0,02% allo 0,06%, di Vitamina B12 da $1 \cdot 10^{-5}\%$ a $3 \cdot 10^{-5}\%$, di Potassio sorbato da 0.002 a 0.008%, di Sodio benzoato da 0.002 a 0.008%.

Sulla base di quanto riportato sopra, le concentrazioni delle vitamine e di minerali pertanto possono variare dal 30% al 150% dell'RDA (dose giornaliera raccomandata). In particolare, nella Tabella 3 sono riportati i vari composti e le loro dosi minime e massime che possono essere contenuti in una dose di farmaco della composizione secondo l'invenzione.

Tabella 3: Composti con dosi minime e massime che possono essere contenute in una dose di farmaco

componente	Dosaggio min.	Dosaggio max.
Vit. A	240 mcg	1200 mcg
Vit. C	18 mg	180 mg (300% RDA)
Vit. D3	1.5 mcg	7.5 mcg
Vit. E	3 mg	30 mg (300% RDA)
Vit. K	21 mcg	105 mcg
Vit. B1	0.42 mg	2.1 mg

- 15 -

Vit. B2	0.48 mg	2.4 mg
Vit. B6	0.6 mg	3 mg
Vit. B12	0.3 mcg	1.5 mcg
Vit. PP	5.4 mg	27 mg
Biotina (H)	45 mcg	2.25 mcg
Acido Folico	60 mcg	300 mcg
Magnesio	90 mg	450 mg
Potassio	20 mg	200 mg
Zinco	4.5 mg	22.5 mg
Manganese	1 mg	3.5 mg
Molibdeno	15 mcg	100 mcg
Cromo	15 mcg	100 mcg
Selenio	15 mcg	100 mcg
Calcio pantotenato	2 mg	7.5 mg
Ferro	4.2 mg	21 mg
Rame	1 mg	5 mg
Iodio	45 mcg	225 mcg
Fosforo	125 mg	1000 mg
Fluoro	0.25 mg	1 mg
Calcio	162 mg	810 mg
Alanina	30 mg	300 mg
Arginina	30 mg	300 mg
Carnitina	30 mg	300 mg
Cisteina	30 mg	300 mg
Glutammina	30 mg	300 mg
Glicina	30 mg	300 mg
Leucina	30 mg	300 mg
Lisina	30 mg	300 mg

Isoleucina	30 mg	300 mg
Metionina	30 mg	300 mg
Ornitina	30 mg	300 mg
Fenilalanina	30 mg	300 mg
Treonina	30 mg	300 mg
Triptofano	30 mg	300 mg
Valina	30 mg	300 mg

La Tabella 4 mostra i dosaggi corrispondenti alla composizione secondo l'invenzione con limite dose inferiore e superiore/giorno.

Tabella 4

Composizione	Dosaggio medio	Dosaggio limite inferiore	Dosaggio limite superiore
--------------	-------------------	---------------------------------	---------------------------------

Principio attivo

1° Composizione (80% D-Aspartato e 20% L-Aspartato)

Sodio D-Aspartato	2.49 (g/dose)	1.24 (g/dose)	7.47 (g/dose)
Sodio L-Aspartato	0.63 (g/dose)	0.315 (g/dose)	1.89 (g/dose)

Oppure

2° Composizione (50% D-aspartato e 50% L-Aspartato)

Sodio D-Aspartato	1.56 (g/dose)	0.78 (g/dose)	6.24 (g/dose)
Sodio L-Aspartato	1.56 (g/dose)	0.78 (g/dose)	6.24 (g/dose)

Vitamine

Acido folico	100 mcg /dose	50 mcg /dose	300 mcg /dose
Vitamina B6	1.0 mg	0.5 mg/	3.0 mg

- 17 -

	/dose	/dose	/dose
Vitamina B12	0.5 mcg/	0.25 mcg/	1.5 mcg
	/dose	/dose	/dose
<u>Conservanti</u>			
Potassio sorbato	9 mg/dose	4.5 mg/dose	27 mg/dose
Sodio benzoato	9 mg/dose	4.5 mg/dose	27 mg/dose

Inoltre, la composizione può le seguenti altre sostanze avente valore puramente di coadiuvanti rispetto al peso della composizione di una dose commerciale da 3 g di principio attivo.

Xilitolo 700, 0.1-10%

Aroma arancio 0.1-10%

Vanigliina 0.05-0,5%

Fruttosio 0.2-20%

Saccarosio 0.2-20%

Maltodestrine 0.2-10%;

Aspartame 0.03- 0,3%

Arancia succo puro disidratato 0.1-20%%

Magnesio idrossido 0.1-1%.

Silica 0.1-20%

Le percentuali sono in peso rispetto al peso della composizione di una dose commerciale da 3.12 g di principio attivo. La composizione è in forma di soluzione salina contenete 9-11 ml/flacone, oppure in forma granulata con dose del principio attivo di 3 g del D/L-aspartato e altri ingredienti per un peso totale secco di 3.5-6.0 g.

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, con particolare

riferimento alle figure dei disegni allegati in cui:

Figura 1 mostra l'incremento dell'LH (ormone luteinizzante) nel plasma umano dopo trattamento col la composizione secondo l'invenzione. I valori riferiscono la media dei valori e la deviazione standard dalla media (S.D.) ottenuti da 10 persone di età tra 25-40 anni al tempo zero e dopo 10, 20 e 30 giorni di trattamento (vedi dopo la bibliografia).

Figura 2 mostra l'incremento del testosterone nel plasma umano dopo il trattamento con la composizione secondo l'invenzione. I valori riferiscono la media dei valori e la deviazione standard dalla media (S.D.) ottenuti da 10 persone di età tra 25-40 anni al tempo zero e dopo 10, 20 e 30 giorni di trattamento (vedi dopo la bibliografia).

Figura 3 mostra l'incremento del numero di spermatozoi nel liquido seminale umano dopo trattamento con la composizione secondo l'invenzione (vedi dopo la bibliografia).

Figura 4 mostra l'incremento del numero di spermatozoi nel liquido seminale umano dopo trattamento con la composizione secondo l'invenzione. I valori riferiscono la media dei valori e la deviazione standard dalla media (S.D.) ottenuti da 10 persone di età tra 25-40 anni al tempo zero e dopo 30, 60 e 90 giorni di trattamento (vedi dopo la bibliografia).

Figura 5 mostra l'HPLC di un campione noto costituito da una miscela standard di D-aspartico assieme ad una miscela di L-amminoacidi (vedi dopo la bibliografia).

ESEMPIO 1: *Preparazione della combinazione di sodio D-aspartato e sodio L-aspartato in soluzione o in polvere*

L'acido D-aspartico e l'acido L-aspartico si trovano in commercio in forma di polvere bianca insolubile in acqua. Occorre quindi solubilizzare l'amminoacido mediante formazione di sale di sodio, potassio o Magnesio. Qui di seguito viene portato un esempio di preparazione del sodio D-aspartato alla concentrazione di 2 M, il quale corrisponde a 266 g di acido D-aspartico/litro che corrisponde a 312 g di sodio D-aspartato/litro.

Esempio di preparazione di un litro della miscela costituita da sodio D-aspartato 80% e sodio L-aspartato 20% e confezionamento in flaconi da 10 ml

Mescolare 212.8 g di acido D-aspartico e 53.2 g di acido L-aspartico in 250 ml di acqua distillata. Poi, agitando costantemente, si aggiunge poco alla volta 480 ml di NaOH 4 M (4 M di NaOH corrisponde a 160g/l) e si mescola per solubilizzare l'acido D-aspartico e l'acido L-aspartico. A solubilizzazione avvenuta il pH della soluzione corrisponderà a 6.0-7.0. Se il valore del pH supera 7.0, allora riportare a pH 6.0-7.0 con pochi ml di HCl 2M, se invece il pH è inferiore a 6.0-7.0, allora aggiungere ancora NaOH finché il pH non ritorna a 6.0-7.0. Poi aggiungere 0.9 g di potassio sorbato e 0.9 g di sodio benzoato. Infine, aggiungere acqua distillata per portare il volume finale di 1 litro. Filtrare tutto su membrane (millipore) con pori da 0.45 μ m o su carta 3 MM per trattenere residui insolubili e

allo stesso tempo per sterilizzare la soluzione. Poi distribuire in flaconi da 10 ml. Infine aggiungere nel tappo dosatore del flacone 2 mg di vitamina B6, 0.3 mg di acido folico 1.5 mcg di vitamina B12 ed eventualmente aroma d'arancia o fruttosio o altro eccipiente in quantità da stabilire secondo il gusto da dare al farmaco. In 10 ml della soluzione ci sono 2.49 g di sodio D-aspartato e 0.63 g di sodio L-aspartato (corrispondenti a 2.128 g di acido D-aspartico e a 0,530 g di acido L-aspartico rispettivamente).

Procedura alternativa

In alternativa alla preparazione di cui sopra si può effettuare la seguente altra procedura che risulta essere anche più pratica: Aggiungere a 750 ml di NaOH 2.66 M (la soluzione di 2.66 M di NaOH corrisponde a 106.6 g di NaOH/litro) sotto agitazione 212.8 g di acido D-aspartico e 53.2 g di acido L-aspartico. Continuare a mescolare finchè si sia sciolto tutto l'amminoacido. Dopo completa solubilizzazione, controllare il valore del pH che deve essere compreso tra 6.0 e 7.0. Se il pH risulta più alto di 7.0, allora aggiungere qualche ml di HCl 2M finchè esso non ritorni a valori tra 6.0 e 7.0. Se invece il pH è inferiore a 6.0, allora aggiungere ancora qualche ml di 2 M NaOH fino a pH ritorni tra 6.0 e 7.0. Poi aggiungere 0.9 g di potassio sorbato e 0.9 g di sodio benzoato. Infine aggiungere acqua distillata per portare il volume ad 1 litro finale. Filtrare tutto su millipore con pori da 0.45 µm o su carta 3 MM per trattenere eventuali residui insolubili e anche per sterilizzare la

soluzione. Poi distribuire in flaconi da 10 ml. Infine aggiungere nel tappo dosatore del flacone 2 mg di vitamina B6, 0.3 mg di acido folico 1.5 mcg di vitamina B12 ed eventualmente aroma d'arancia o fruttosio o altro eccipiente in quantità da stabilire secondo il gusto da dare al farmaco. In 10 ml della soluzione ci sono 2.49 g di sodio D-aspartato e 0.63 g di sodio L-aspartato (corrispondenti a 2.128 g di acido D-aspartico e a 0,530 g di acido L-aspartico rispettivamente).

Esempio di preparazione di un litro solo di sodio D-aspartato

Mescolare 266 g di acido D-aspartico in 250 ml di acqua distillata. Poi mantenendo agitato, aggiungere 480 ml di NaOH 4 M (Una soluzione di NaOH 4 M corrisponde a 160g/l) e mescolare per solubilizzare l'acido D-aspartico. A solubilizzazione avvenuta il pH della soluzione deve essere tra 6.0-7.0. Se il pH è più elevato di 7.0, allora riportare il pH a 6.0-7.0 con pochi ml di 2 M HCl.

Se invece il pH è inferiore a 6.0-7.0, allora aggiungere ancora NaOH finché il pH non ritorna a 6.0-7.0.. Poi aggiungere 0.9 g di potassio sorbato e 0.9 g di sodio benzoato. Infine, aggiungere acqua distillata per portare il volume finale di 1 litro. Filtrare tutto su membrane (millipore) con pori da 0.45 µm o su carta 3 MM per trattenere residui insolubili e allo stesso tempo per sterilizzare la soluzione. Poi distribuire in flaconi da 10 ml. Infine aggiungere nel tappo dosatore del flacone 2 mg di vitamina B6, 0.3 mg di acido folico

1.5 mcg di vitamina B12 ed eventualmente aroma d'arancia o fruttosio o altro eccipiente in quantità da stabilire secondo il gusto da dare al farmaco. In 10 ml della soluzione ci sono 3.12g di sodio D-aspartato che corrispondono a 266 g di acido D-aspartico.

In alternativa alla procedura di cui sopra si prepara la soluzione di sodio D-aspartato come segue: Aggiungere a 750 ml di NaOH 2.66 M (2.66 M di NaOH corrispondono 106.6 g di NaOH/litro) si aggiunge sotto agitazione 266 g di acido D-aspartico. Si mescola continuamente finché tutto il D-aspartico sia sciolto. A solubilizzazione avvenuta il pH della soluzione deve essere tra 6.0-7.0. Se è più elevato di 7.0, allora riportare il pH a 6.0-7.0 con pochi ml di 2 M HCl. Se invece il pH è inferiore a 6.0-7.0, allora aggiungere ancora NaOH finché il pH non ritorna a 6.0-7.0. Poi aggiungere 0.9 g di potassio sorbato e 0.9 g di sodio benzoato. Infine, aggiungere acqua distillata per portare il volume finale di 1 litro. Filtrare tutto su membrane (millipore) con pori da 0.45 µm o su carta 3 MM per trattenere residui insolubili e allo stesso tempo per sterilizzare la soluzione. Poi distribuire in flaconi da 10 ml. Infine aggiungere nel tappo dosatore del flacone 2 mg di vitamina B6, 0.3 mg di acido folico 1.5 mcg di vitamina B12 ed eventualmente aroma d'arancia o fruttosio o altro eccipiente in quantità da stabilire secondo il gusto da dare al farmaco. In 10 ml della soluzione ci sono 3.12 g di sodio D-aspartato che corrispondono a 266 g di acido D-aspartico.

Esempio di preparazione di un litro della miscela

composto da sodio D-aspartato al 50% e sodio L-aspartato al 50% e confezionamento in flaconi da 10 ml.

Mescolare 133 g di acido D-aspartico e 133 g di acido L-aspartico in 250 ml di acqua distillata. Poi mescolando costantemente aggiungere 480 ml di NaOH 4 M (4 M = 160g/l) e mescolare per solubilizzare l'acido D-aspartico e l'acido L-aspartico. A solubilizzazione avvenuta il pH della soluzione corrisponderà a 6.0-7.0. Se il valore del pH supera 7.0, allora riportare a pH 6.0-7.0 con pochi ml di HCl 2M. Se invece il pH è inferiore a 6.0-7.0, allora aggiungere ancora NaOH finché il pH non ritorna a 6.0-7.0. Poi aggiungere 0.9 g di potassio sorbato e 0.9 g di sodio benzoato. Infine, aggiungere acqua distillata per portare il volume finale di 1 litro. Filtrare tutto su membrane (millipore) con pori da 0.45 µm o su carta 3 MM per trattenere residui insolubili e allo stesso tempo per sterilizzare la soluzione. Poi distribuire in flaconi da 10 ml. Infine aggiungere nel tappo dosatore del flacone 2 mg di vitamina B6, 0.3 mg di acido folico 1.5 mcg di vitamina B12 ed eventualmente aroma d'arancia o fruttosio o altro eccipiente in quantità da stabilire secondo il gusto da dare al farmaco. In 10 ml della soluzione ci sono 1.56 g di sodio D-aspartato e 1.56 g di sodio L-aspartato (che corrispondono a 1.33 g di acido D-aspartico e 1.33 g di acido L-Aspartico).

In alternativa alla procedura di cui sopra si prepara la miscela di sodio D-aspartato e sodio L-aspartato come segue: Aggiungere a 750 ml di NaOH 2.66 M (2.66 M NaOH = 106.6 g di NaOH/litro) aggiungere

sotto costante agitazione 133 g di acido D-aspartico e 133 g di acido L-aspartico. Mescolare continuamente finché sia sciolto tutto l'amminoacido. A solubilizzazione avvenuta il pH della soluzione corrisponderà a 6.0-7.0. Se il valore del pH supera 7.0, allora riportare a pH 6.0-7.0 con pochi ml di HCl 2M. Se invece il pH è inferiore a 6.0-7.0, allora aggiungere ancora NaOH finché il pH non ritorna a 6.0-7.0. Poi aggiungere 0.9 g di potassio sorbato e 0.9 g di sodio benzoato. Infine, aggiungere acqua distillata per portare il volume finale di 1 litro. Filtrare tutto su membrane (millipore) con pori da 0.45 µm o su carta 3 MM per trattenere residui insolubili e allo stesso tempo per sterilizzare la soluzione. Poi distribuire in flaconi da 10 ml. Infine aggiungere nel tappo dosatore del flacone 2 mg di vitamina B6, 0.3 mg di acido folico 1.5 mcg di vitamina B12 ed eventualmente aroma d'arancia o fruttosio o altro eccipiente in quantità da stabilire secondo il gusto da dare al farmaco. In 10 ml della soluzione ci sono 1.56 g di sodio D-aspartato e 1.56 g di sodio L-aspartato (che corrispondono a 1.33 g di acido D-aspartico e 1.33 g di acido L-Aspartico).

Preparazione del sodio D-aspartato e sodio L-aspartato in polvere

Sono in vendita in commercio il D-aspartato e L-aspartato sottoforma di sali di sodio o potassio o magnesio. Inoltre sono anche in commercio il sale sodico del DL-aspartato il quale è costituita dalla miscela racemica di DL-aspartato cioè costituita da 50% di D-aspartato di sodio e 50% di L-aspartato di sodio.

Perciò, è possibile anche preparare delle bustine monouso, ciascuna contenente la dose stabilita di sodio D-aspartato (3.12 g). In questa dose poi si aggiunge 2 mg di vitamina B6, 0.3 mg di acido folico e 1.5 mcg di vitamina B12 ed eventualmente determinate quantità di aroma d'arancio o altro aroma, saccarosio o altro eccipiente per rendere gradevole l'assunzione. Per questa preparazione non si aggiunge al farmaco il sodio benzoato né il potassio sorbato perché il farmaco si presenta in forma di polvere e quindi non inquinabile da microrganismi. La bustina va sciolta poi in acqua di fonte e ingerita.

ESEMPIO 2: *Studio degli effetti di una combinazione di sodio D-aspartato 80% e di sodio L-aspartato 20% nei conigli*

Lo studio è stato condotto su due gruppi di conigli (10 conigli per ogni gruppo) allo scopo di testare l'effetto del sodio D-aspartato e del sodio L-aspartato in combinazione con una determinata quantità di sodio L-aspartato sulla qualità del liquido seminale intesa come numero di spermatozoi/ml e sulla motilità rapida progressiva degli spermatozoi stessi.

L'esperimento è consistito nel far ingerire ad un gruppo di 10 conigli maschi adulti di età di 6 mesi una quantità di sodio D-aspartato corrispondente a 0.250 g al giorno (1.6 μ mol/coniglio; 0.26 μ mol/kg di peso corporeo) per la durata di 20 giorni. In pratica, il sodio D-aspartato veniva mescolato al cibo in quantità tale che nella porzione di cibo che il coniglio consumava in un giorno, vi fosse contenuto 0.250 g di

sodio D-aspartato. Allo stesso modo, in un secondo esperimento effettuato su un'altro gruppo di 10 conigli maschi adulti della stessa età, veniva fatta ingerire una miscela costituita da 0.2 g di sodio D-aspartato e 0.05 g di sodio L-aspartato (80% D-Asp:20% L-Asp). Prima dell'inizio dell'esperimento e a termine dei 20 giorni dall'assunzione del farmaco, da ogni coniglio è stato raccolto un campione di sperma ottenuto per stimolazione con l'ausilio di una vagina artificiale e su di esso veniva determinato il numero totale di spermatozoi/ml di eiaculato e la loro motilità.

Il numero degli spermatozoi e la motilità rapida progressiva veniva effettuata secondo le linee guide dettati dall'OMS (World Health Organization) utilizzando una camera di Makler (Makler Chamber) per la conta numerica (Sefi Medtstl Instrument, Haifa, Israel) e nella stessa camera veniva valutata la motilità rapida progressiva. Il seme del coniglio veniva diluito 10 volte in una soluzione isosmotica perché troppo concentrato.

Il risultato ottenuto da questo studio ha dimostrato che nel primo esperimento, cioè conigli trattati con solo sodio D-aspartato (primo esperimento), questo amminoacido migliorava statisticamente la produzione del numero di spermatozoi nel liquido seminale di un valore medio del 19.3%. Da un valore medio di 300.000.000 di spermatozoi/ml di liquido seminale nei conigli di controllo (raccolta prima di inizio del trattamento) ad un valore medio di 358.000.000/ml dopo l'assunzione del sodio D-aspartato

per 20 giorni, cioè del 19.3% incrementato (Tabella 5; parte A; 1° gruppo di 10 conigli). Inoltre, negli stessi liquidi seminali dei conigli trattati, si osservava anche un miglioramento della motilità rapida progressiva degli spermatozoi che dal 40% era incrementato al 55%, cioè un aumento percentuale del 37% rispetto ai valori di controllo (Tabella 5, parte B, 1° gruppo di conigli).

Nel secondo esperimento effettuato con altri 10 conigli della stessa età che avevano ricevuto una dose giornaliera formata da 0.2 g di sodio D-aspartato e 0.05 g di sodio L-aspartato (D-Asp 80%:L-Asp 20%) e per la stessa durata di tempo, la qualità del liquido seminale era ulteriormente migliorata. In questo caso, infatti, il numero di spermatozoi nel liquido seminale prima del trattamento era di un valore medio di 320.000.000 spermatozoi/ml, mentre dopo il trattamento con sodio D-aspartato integrato con sodio L-aspartato, era di un valore medio di 410.000.000/ml di liquido seminale, cioè incrementato del 28.1% (Tabella 5; parte A; 2° gruppo di conigli). Inoltre, anche la motilità rapida progressiva degli spermatozoi era migliorata statisticamente. Infatti, gli spermatozoi rapidi progressivi trovati nel liquido seminale del primo gruppo di conigli erano del 40% mentre dopo il trattamento con D-aspartato erano arrivati ad un valore medio del 55%, cioè 37% aumentato. Dopo l'assunzione della miscela formata da sodio D-aspartato e sodio L-aspartato vedere Tabella 5, parte B; 2° gruppo di conigli. Nel secondo gruppo di conigli che avevano

ricevuto D-Asp + L-aspartato da un valore medio del 39% di spermatozoi rapidi si arrivava ad un valore medio del 58%, cioè incrementati del 48% (Tabella 5; parte B; 2° gruppo di conigli).

Dal punto di vista statistico, i miglioramenti dei parametri studiati, sia con l'uso del sodio D-aspartato da solo che con l'uso della miscela costituita da sodio D-aspartato integrato con sodio L-aspartato, analizzati per il T di Student's erano risultati tutti significativi per un $P < 0.01$. I risultati sopra menzionati sono stati riportati nella Tabella 5 sotto riportata che mostra l'effetto del sodio D-aspartato e del D-aspartato + sodio L-aspartato sul miglioramento del numero e della qualità degli spermatozoi nel liquido seminale di coniglio.

- 29 -

Tabella 5. Effetto del sodio D-aspartato e del D-aspartato + sodio L-aspartato sul miglioramento del numero e della qualità degli spermatozoi nel liquido seminale di coniglio

Parte A			
Numero di spermatozoi/ml di liquido seminale nei conigli:			
1° gruppo di 10 conigli		2° gruppo di 10 conigli	
Prima del trattamento	Dopo assunzione di D-Aspartato	Prima del trattamento	Dopo assunzione di D-Aspartato + L-Aspartato
300.000.000/ ml di liquido seminale	358.000.000/ ml di liquido seminale (19.3%)	320.000.000/ ml di liquido seminale --	410.000.000/ ml di liquido seminale (28.1%)
% incremento	--	--	--
incremento			
Parte B			
Numero di spermatozoi/ml di liquido seminale nei conigli:			
1° gruppo di 10 conigli		2° gruppo di 10 conigli	
Prima del trattamento	Dopo assunzione di D-Aspartato	Prima del trattamento	Dopo assunzione di D-Aspartato + L-Aspartato
Rapidi progressivi	40%*	39%*	58%*
% incremento)	--	--	(+48%)
Lenti	30%*	28%*	28%*
Immobili	30%*	33%*	14%*

I risultati si riferiscono ai valori medi ottenuti su un gruppo di 10 conigli adulti (6 mesi) prima del trattamento e dopo 20 giorni dall'assunzione di 0.25 g di sodio D-

- 30 -

aspartato (1.60 μ mole/coniglio; 0.26 μ mol/kg di peso corporeo) e su un gruppo di altri 10 conigli della stessa età prima del trattamento e dopo 20 giorni dall'assunzione di una miscela costituita da 0.2 g di sodio D-aspartato e 0.05 g di sodio L-aspartato al giorno e per un periodo di 30 giorni (80% di Na-D-aspartato e 20% di Na-L-aspartato).

I valori riportati nella parte A della tabella si riferiscono il n. di spermatozoi totali/ml di liquido seminale tra prima e dopo il rispettivo trattamento col farmaco e in parentesi la percentuale di incremento del numero di spermatozoi.

Nella parte B della tabella i valori con asterisco si riferiscono al valore percentuali del numero di spermatozoi rapidi progressivi, lenti e immobili rapportati a 100. I valori in parentesi si riferiscono alla percentuale degli aumenti degli spermatozoi rapidi progressivi rispetto ai valori trovati prima del rispettivo trattamento con il farmaco.

Gli aumenti del numero di spermatozoi e della motilità nei conigli trattati con sodio D-aspartato e con sodio D-aspartato integrato con sodio L-aspartato sono tutti significativi (T di Student; $P < 0.01$).

ESEMPIO 3: *Studio degli effetti di una combinazione di sodio D-aspartato 50% e di sodio L-aspartato 50% nei conigli*

Lo studio consisteva nel far ingerire ad un'altro gruppo di 10 conigli una miscela costituita da 0.125 g di sodio D-aspartato + 0.125 g di sodio L-aspartato (D-Asp 50%: L-Asp 50%) nelle stesse modalità dell'esempio 2. Il risultato ottenuto ha indicato che anche in questo caso si otteneva un miglioramento della qualità del seme espressa come numero totale di spermatozoi e motilità rapida progressiva rispetto ai controlli ma tale effetto era di poco meno efficiente rispetto all'effetto dell'uso della miscela costituita dal 80% di sodio D-aspartato e 20% di sodio L-aspartato. In questo caso la produzione del numero di spermatozoi era incrementata del 25% e la motilità del 55% rispetto ai controlli indicando che anche in quest'ultimo caso si otteneva un miglioramento rispetto al solo uso del D-aspartato ma inferiore alla miscela costituita da 80% di D-aspartato e 20% di L-aspartato.

ESEMPIO 4: *Studio degli effetti di una combinazione di sodio D-aspartato 80% e di sodio L-aspartato 20% nell'uomo*

Sono stati reclutati dei gruppi di volontari maschi di età compresa tra 25 e 40 e testato l'effetto del sodio D-aspartato da solo e l'effetto del sodio D-aspartato supplementato da sodio L-aspartato sulla spermatogenesi umano.

Lo studio è consistito nel far assumere per via orale (dopo colazione o dopo il pasto principale) ad un

gruppo di 10 persone di età compresa tra 25 e 40 anni, una dose giornaliera costituita da 3.12 grammi di sodio D-aspartato (19.2 μ mole di sodio D-aspartato; 0.27 μ mol/kg di peso corporeo per una persona di 70 kg) per un periodo di 30 giorni. Un altro gruppo di 10 persone di età compresa tra i 25 e 40 anni è stato dato (dopo colazione o dopo il pasto principale) una dose giornaliera di una miscela composta da 2.49 g di sodio D-aspartato e 0.63 g di sodio L-aspartato (80% di sodio D-aspartato e 20% di sodio L-aspartato) per lo stesso periodo di tempo.

Prima dell'inizio dello studio e dopo 10 giorni, 20 giorni e 30 giorni del trattamento, veniva prelevato il sangue, da cui ottenuto il siero, e determinato i valori dell'LH, del testosterone e del numero e motilità rapida progressiva degli spermatozoi. Gli esami ormonali LH e testosterone venivano effettuati usando specifici kits commerciali per uso chimico clinico.

Il liquido seminale veniva fatto raccogliere per masturbazione dopo 3-5 giorni di astinenza. Il numero degli spermatozoi e la motilità rapida progressiva veniva effettuata secondo le linee guida dettate dall'OMS (World Health Organization) utilizzando una camera di Makler (Makler Chamber) per la conta numerica (Sefi Medtstl Instrument, Haifa, Israel) e nella stessa camera veniva valutata la motilità rapida progressiva.

E' da riportare che questo studio è stato effettuato su soggetti selezionati aventi un numero di spermatozoi nel liquido seminale compreso tra

15.000.000 e 20.000.000/ml, cioè valori ai limiti bassi della norma. Questo accorgimento si è basato su preliminari studi che avevano indicato che l'effetto del D-aspartato sul miglioramento della spermatogenesi era apprezzato con maggiore evidenza nei soggetti aventi un numero di spermatozoi non troppo elevati. Questo è dovuto probabilmente al fatto nei soggetti che hanno un relativo basso numero di spermatozoi, hanno anche percentualmente più spermatozoi che non sono giunti a maturazione e sono degradati nel corso della spermatogenesi. In questo caso dunque l'azione del D-aspartato stimola la loro maturazione a vitale spermatozoo.

Il risultato ottenuto ha indicato che l'uso del sodio D-aspartato aveva migliorato statisticamente i valori degli ormoni LH e testosterone (ormoni specifici implicati nella spermatogenesi) e del numero e motilità rapida progressiva degli spermatozoi stessi. Specificamente il trattamento con 3.12 g di sodio D-aspartato al giorno aveva indotto un aumento medio dei valori ematici di LH del 25.6%. Da un valore medio di 4.3 mUI/ml ottenuto nei controlli, si otteneva un valore di 5.4 mUI/ml nelle persone dopo aver assunto il D-aspartato ($P < 0.01$). Lo stesso effetto veniva osservato per il testosterone che da un valore di 4.8 ng/ml di siero prima del trattamento incrementava ad un valore di 6.3 ng/ml di siero, cioè maggiore di 31.2% ($P < 0.01$) (Tabella 6, parte A, 1° gruppo di persone). Inoltre, anche il numero e la motilità progressiva degli spermatozoi sono incrementati significativamente

rispetto ai controlli. In questo caso infatti il numero totale degli spermatozoi trovato prima dell'assunzione del D-aspartato era in media di 18.000.000 e dopo il trattamento con D-Aspartato era incrementato a valori medi di 23.000.000, dunque incrementato del 27% (Tabella 6, parte B; primo gruppo di 10 persone). Inoltre, anche la motilità era stata trovata significativamente aumentata del 28% con il trattamento del D-aspartato rispetto ai valori trovati prima del trattamento (Tabella 6, parte B, 1° gruppo di 10 persone) ($P < 0.01$).

Interessante, è stato anche osservato che come succede per i conigli (vedi sopra), anche nell'uomo il trattamento con una miscela composta da sodio D-aspartico integrato con sodio L-aspartico ha dato ulteriore miglioramento rispetto al solo uso del sodio D-aspartato, sia per gli ormoni ematici (LH e testosterone) che per la qualità del liquido seminale. In questo secondo esperimento, infatti, abbiamo osservato che il gruppo di persone che avevano assunto la dose giornaliera composta da 2.49 g di sodio D-aspartato e da 0.63 g di sodio L-aspartato (D-Asp 80%; L-Asp 20%) migliora ulteriormente le performance di fertilità rispetto al controllo. Il valore medio dell'LH era incrementato del 38.6% rispetto al controllo (le stesse persone prima del trattamento) contro l'incremento del 25.6% osservato con il solo uso del sodio D-aspartato (Tabella 6, parte A; 2° gruppo di 10 persone). Lo stesso fenomeno accadeva per il testosterone. Questo ormone steroideo, infatti, dopo

trattamento con D-aspartato integrato con L-aspartato è incrementato del 47.8% rispetto al controllo (stesse persone prima dell'inizio della terapia), mentre con il solo uso del D-aspartato l'incremento era del 31.2% (Tabella 6, parte A; secondo gruppo di 10 persone). Inoltre, anche il numero e la motilità degli spermatozoi erano migliorati. Da un valore medio di 19.500.000 di spermatozoi/ml trovato prima della terapia ad un valore di 28.000.000/ml, un miglioramento del 43% (Tabella 6, parte B; 2° gruppo di 10 persone). Inoltre, con quest'ultimo trattamento, si otteneva anche un miglioramento della qualità degli spermatozoi. Infatti, il numero degli spermatozoi rapidi progressivi ottenuti con l'uso del sodio D-aspartato coadiuvato da sodio L-aspartato da valori di 34% trovato prima del trattamento a valori di 50% dopo il trattamento, cioè 47% incrementato (Tabella 6, parte B; 2° gruppo di 10 persone). La tabella 6 mostra l'effetto del sodio D-aspartato e del sodio D-aspartato+sodio L-aspartato sul miglioramento degli ormoni LH e testosterone e sul numero e qualità degli spermatozoi nel liquido seminale umano.

Tabella 6. Effetto del sodio D-aspartato e del sodio D-aspartato+sodio L-aspartato sul miglioramento degli ormoni LH e testosterone e sul numero e qualità degli spermatozoi nel liquido seminale umano

Parte A				
Concentrazione dell'LH e testosterone nel liquido seminale umano				
1° gruppo di 10 persone		2° gruppo di 10 persone		
	Prima del trattamento	Dopo assunzione di D-Aspartato	Prima del trattamento	Dopo assunzione di D-Aspartato + L-Aspartato
LH	4.3	5.4	4.4	6.1
(mIU/ml siero)				
% di incremento	- -	+25.6%	--	+38.6%
Testosterone	4.8	6.3	4.6	6.8
(ng/ml siero)				
% di incremento	--	+31.2%	--	+47.8%
Parte B				
Numero e motilità degli spermatozoi e nel liquido seminale umano				
1° gruppo di 10 persone		2° gruppo di 10 persone		
	Prima del trattamento	Dopo assunzione di D-Aspartato	Prima del trattamento	Dopo assunzione di D-Aspartato + L-Aspartato
N. di spermatozoi totali/ml di liquido seminale	18.000.000	23.000.000 +27%	19.500.000	28.000.000 +43%
Spermatozoi rapidi progressivi	35% *	45% * +28%	34%*	55%* +61%
	--		--	

- 37 -

Spermatozoi lenti	30%*	25%*	28%*	29%*
Spermatozoi immobili	35%*	30%*	38%*	21%*

I risultati si riferiscono ai valori medi ottenuti da un numero di 10 soggetti di età compreso tra i 25 e 40 anni prima del trattamento e dopo 30 giorni dall'assunzione di 3.0 g di sodio D-aspartato/giorno (1° gruppo di 10 persone) e su un gruppo di altri 10 soggetti di età compreso tra 25 e i 40 anni prima del trattamento e dopo l'assunzione di una dose giornaliera costituita da 2.49 g di sodio D-aspartato e 0.63 g di sodio L-aspartato e per 30 giorni (80% di sodio D-aspartato e 20% di sodio L-aspartato). I valori in parentesi nella parte A della tabella si riferiscono alla percentuale di incremento dell' LH e testosterone tra prima e dopo il rispettivo trattamento. I valori con asterisco della parte B della tabella si riferiscono ai valori percentuali del numero di spermatozoi rapidi progressivi, lenti e immobili rapportati a 100. I valori in parentesi della parte B della tabella si riferiscono alla percentuale degli aumenti degli spermatozoi totali e di quelli rapidi progressivi.

Gli aumenti di tutti i valori in parentesi (LH, testosterone n. totale degli spermatozoi e n. di spermatozoi rapidi progressivi) sono tutti significativi (T di Student; $P < 0.01$).

I risultati ottenuti da questi esperimenti hanno dimostrato che i valori di LH e testosterone aumentano significativamente nel tempo con l'aumentare dei giorni di trattamento e fino a circa 30 giorni di trattamento rispetto al valore basale (prima del trattamento). Poi tale aumento resta costante se il trattamento continua per un ulteriore periodo di tempo. Invece il numero degli spermatozoi nel liquido seminale continua ad aumentare progressivamente fino al 90° giorno di terapia.

Nelle Figure. 1 e 2 viene riportato il grafico dei valori dell'aumento dell'LH e del testosterone nel sangue umano prima e dopo trattamento con la composizione secondo l'invenzione (80% sodio D-aspartato e 20% sodio L-aspartato).

Nella Fig. 3 e 4 viene riportato il grafico dei valori dell'aumento del numero di spermatozoi e della loro motilità rapida progressiva prima e dopo trattamento con la composizione secondo l'invenzione.

Determinazione dell'acido D-aspartico nel liquido seminale umano

2 ml di liquido seminale ottenuto da ciascun paziente appartenenti veniva diluito in 10 ml di TCA (acido tricloroacetico) 0.2 M per deproteneizzare le proteine e centrifugato a 10.000 rpm per 30 min. Il sovranatante contenente l'acido D-aspartico e altri amminoacidi, veniva purificato su una colonna (1x4 cm) a scambio cationico come descritto nelle Ref. 18-21. In breve ad una colonnina 2x4 cm di resina a scambio ionico AG-50W-X8; 200-400 mesh, Bio-Rad, veniva

aggiunto il sovranatante TCA del liquido seminale come sopra ottenuto. Dopo assorbimento del campione, colonna veniva lavata con 10 ml di HCl 0.001 M e poi eluita con 10 ml di ammonio idrossido 4 M. Quest'ultimo eluato, contenente gli amminoacidi purificati, veniva portato a secco su piastra calda per eliminare l'ammoniaca e il residuo veniva sciolto in 2 ml di acqua distillata e determinato la l'acido D-aspartico all'HPLC o usando un metodo colorimetrico basato sull'uso della D-aspartato ossidasi (purificata da rene di bovino) come riportato in uno dei nostri lavori scientifici (Ref: 18-21).

La Figura 5 mostra un esempio di analisi all'HPLC di un campione standard costituito da una miscela standard di D-aspartico assieme ad una miscela di L-amminoacidi.

Pannello di sinistra indica l'analisi all'HPLC di una miscela standard costituita da D-Asp altri L-amminoacidi. Il grafico rappresenta un esempio di un cromatogramma ottenuto da 10 picomoli di D-Asp e 20 picomoli dei seguenti altri amminoacidi: Glu, Asn, Gln, Ser, Thr, His, Gly, Arg, Ala, Taurine, GABA, Tyr, Val, Met, Leu, Ile, Phe and Lys. Il D-Asp è eluito a 5.2 min seguito da L-Asp e da altri L-amminoacidi.

Pannello di destra è lo stesso campione, ma dopo trattamento con la D-aspartato ossidasi. IN questo caso l'enzima D-aspartato ossidasi che è specifico per l'ossidazione solo del D-Asp fatto eliminare il picco al tempo di eluizione a 5.2 min e quindi confermando che tale picco fosse realmente dovuto all'acido D-aspartico.

Analisi statistiche

I dati sono espressi come media $\pm$ SD usando il test T student. $P < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativi.

ESEMPIO 5: *Studio degli effetti di una combinazione di sodio D-aspartato 50% e di sodio L-aspartato 50% nell'uomo*

E' stato effettuato un'ulteriore studio consistente nel trattare un altro gruppo di 10 persone di età compresa tra i 25 e i 40 anni con una miscela costituita da 1.56 g di sodio D-aspartato + 1.56 g di sodio L-aspartato (D-Asp 50%:L-Asp 50%) come dose giornaliera e per 30 giorni. Il risultato ottenuto ha indicato che anche in questo caso si otteneva un miglioramento dei valori ematici di LH e testosterone e della qualità del liquido seminale, ma meno efficiente rispetto all'uso della miscela costituita dal 80% di sodio D-aspartato e 20% di sodio L-aspartato. In questo caso infatti il valore di LH e testosterone erano aumentati significativamente rispettivamente del 30% e del 38% comparati con i valori basali. Inoltre, anche il numero degli spermatozoi e la motilità rapida progressiva erano aumentati significativamente del 45% rispetto ai controlli (dati non mostrati in tabella). Dunque con l'uso del D-Asp + L-Asp anche si osservava un miglioramento molto significativo dei parametri spermatici, ma meno forti che dell'uso del 80% D-Asp e 20% L-Asp.

In conclusione, come osservato sul coniglio, anche sull'uomo il trattamento con sodio D-aspartato

integrato con sodio L-aspartato causa un miglioramento significativo dei valori di LH e testosterone nel sangue e del numero e motilità degli spermatozoi nel liquido seminale rispetto al trattamento costituito dal solo uso del sodio D-aspartato.

Bibliografia

- (1) D'Aniello A. and Giuditta A. Identification of D-aspartic acid in the brain of *Octopus vulgaris*. *J. of Neurochemistry*. 29, 1053-1057, 1977.
- (2) D'Aniello A. and Giuditta A. Presence of D-aspartate in squid axoplasm and in other regions of the cephalopod nervous system. *J. of Neurochemistry*. **31**, 1107-1108, 1978.
- (3) D'Aniello A. Di Cosmo A., Di Cristo C., and Fisher G. D-aspartate in the male and female reproductive system of *Octopus vulgaris* Lam. *General and Comparative Endocrinology*. **100**, 69-72, 1995.
- (4) D'Aniello A., Spinelli P., De Simone A., D'Aniello S., Branno B., Aniello F., Fisher G., Di Fiore MM. and Rastogi KK. Occurrence and neuroendocrine role of D-aspartic acid and NMDA in *Ciona Intestinalis*. *FEBS letters*. **552**, 193-198, 2003.
- (5) Di Fiore MM., Assisi, L., Botte, V. and D'Aniello A. D-Aspartic acid is implicated in the control of testosterone production by the vertebrate gonad. Studies on the female green frog *Rana esculenta*. *J. of Endocrinology*. **156**, 199-207, 1998.
- (6) D'Aniello A., Nardi G., De Santis A., Vetere A., Di Cosmo A., Marchelli R., Dossena A., and Fisher G. Free L-amino acids and D-aspartate content in

- the nervous system of cephalopoda. A comparative study. *Comp. Biochem. Physiol.* **112**, 661-666, 1995.
- (7) Raucci F., Santillo A., D'Aniello A., Chieffi P., Chieffi G. Baccari. D-Aspartate modulates transcriptional activity in harderian gland of frog, *Rana esculenta*: Morphological and Molecular Evidence. *J. of Cell. Physiol.*: **204**, 445-454, 2005.
- (8) Assisi L., Botte V., D'Aniello A. and Di Fiore MM. Enhancement of aromatase activity by D-aspartic acid in the ovary of lizard *Podarcis sicula*. *Reproduction*. **121**, 803-808, 2001.
- (9) Neidle A., and Dunlop DS. Developmental changes of free D-aspartic acid in the chicken embryo and in the neonatal rat. *Life Science*. **46**, 1517-1522, 1990.
- (10) D'Aniello A., D'Onofrio G., Pishetola M., D'Aniello G., Vetere A., Petrucelli L. and Fisher G. Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase. Effects of D-amino acids. *J. Biol. Chem.*: **268**, 26941-26949, 1993.
- (11) Hashimoto A., Nishikawa T., Oka T., Hayashi T and Takahashi K. Widespread distribution of free D-aspartate in rat periphery. *FEBS Letters*. **331**, 4-8, 1993.
- (12) Boni R., Santillo R., Macchia G., Spinelli P., Ferrandino G. and D'Aniello A. D-aspartate and reproductive activity in sheep. *Theriogenology*. **65**, 1265-1278, 2006.
- (13) Dunlop DS., Neidle A., McHale D., Dunlop DM. and

- Lajtha A. The presence of free D-Aspartic acid in rodents and man. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **142**, 27-32, 1986.
- (14) Fisher GH., D'Aniello A., Vetere A., Padula L., Cusano C., Man EH. Free D-aspartate and D-alanine in normal and Alzheimer brain. *Brain Res. Bull.*: **26**, 983-985, 1991.
- (15) Hashimoto A., Kumashiro S., Nishikawa T., Oka T., Takahashi K., Mito T., Takashima S., Doi N., Mizutani Y., Kaneco T. and Ootomo E. Embryonic development and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex. *J. Neurochem.*: **61**, 348-351, 1993.
- (16) D'Aniello A. D-Aspartic acid: An endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. *Brain. Research Review.* **53**, 215-234, 2006.
- (17) D'Aniello A., Di Cosmo A., Di Cristo C., Annunziato L., Petrucelli L., and Fisher GH. Involvement of D-aspartic acid in the synthesis of testosterone in rat testes. *Life Science.* **59**, 97-104, 1996.
- (18) D'Aniello A., Di Fiore MM., Fisher GH., Milone A., Seleni A., D'Aniello S., Perna A., and Ingrosso D. Occurrence of D-Aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in rat neuroendocrine tissues and their role in the modulation of luteinizing hormone and growth hormone release. *FASEB J.* **14**, 699-714, 2000.
- (19) D'Aniello G., Tolino A., D'Aniello A., Fisher GH. and Di Fiore MM. The role of the D-aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in the regulation of

- prolactin release. *Endocrinology*. **141**, 3862-3870, 2000.
- (20) D'Aniello G., Ronsini S., Guida F., Spinelli P. and D'Aniello A. Occurrence of D-aspartic acid in human seminal plasma and spermatozoa: Possible role in reproduction. *Fertility and Sterility*. **84**, 1444-1449, 2005.
- (21) D'Aniello S., Spinelli P., Ferrandino G., Peterson G., Tsesarskia T., Fisher G. and D'Aniello A. Cephalopod vision involves dicarboxylic amino acids: D-aspartate, L-aspartate and L-glutamate. *Biochem. J.* **386**, 331-340, 2005.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

RIVENDICAZIONI

1) Uso di una composizione comprendente o consistente nella combinazione di uno o più sali di acido D-aspartico e uno o più sali di acido L-aspartico, detti uno o più sali di acido D-aspartico essendo in concentrazione di almeno il 50% rispetto alla somma dei sali di acido D-aspartico e L-aspartico, detti sali essendo sali di metalli alcalini o alcalino-terrosi, per la preparazione di un medicamento per il trattamento della infertilità maschile.

2) Uso secondo la rivendicazione 1, in cui uno o più sali di acido D-aspartico sono in concentrazione dal 50% all'80% e uno o più sali di acido L-aspartico sono in concentrazione dal 20% al 50%, dette percentuali essendo riferite alla somma dei sali di acido D-aspartico e L-aspartico.

3) Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 1-2, in cui il sale di acido D-aspartico o di L-aspartico è un sale di sodio o una miscela di sale di sodio e di potassio o magnesio.

4) Uso secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti, in cui uno o più sali di acido D-aspartico sono in concentrazione dell'80% e uno o più sali di acido L-aspartico sono in concentrazione del 20%, dette percentuali essendo riferite alla somma dei sali di acido D-aspartico e L-aspartico.

5) Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 1-3, in cui uno o più sali di acido D-aspartico sono in concentrazione del 50% e uno o più sali di acido L-

aspartico sono in concentrazione del 50%, dette percentuali essendo riferite alla somma dei sali di acido D-aspartico e L-aspartico.

6) Uso secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui la composizione comprende ulteriormente uno o più coadiuvanti scelti nel gruppo che consiste in amminoacidi, vitamine, minerali, ormoni stimolanti la funzione riproduttiva, callicreina, antibiotici, antinfiammatori, antiandrogeni, androgeni, pentossifillina, gonadotropine, ormone rilasciante le gonadotropine (GnRH), stimolatori adrenergici, integratori dietetici e antiossidanti.

7) Uso secondo la rivendicazione 6 in cui gli amminoacidi sono scelti nel gruppo che consiste in alanina, arginina, carnitina, cisteina, glutammina, glicina, leucina, lisina, isoleucina, metionina, ornitina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina e ketoacidi tipo alfa ketoglutarico.

8) Uso secondo la rivendicazione 6 in cui le vitamine sono scelte nel gruppo che consiste in vitamina A, C, D3, E, K, B1, B2, B6, B12, PP, biotina (H), acido folico, acido lipoico.

9) Uso secondo la rivendicazione 6 in cui i minerali sono scelti nel gruppo che consiste in magnesio, potassio, zinco, manganese, molibdeno, cromo, selenio, calcio, ferro, rame, iodio, fosforo, fluoro, calcio.

10) Uso secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui le concentrazioni delle vitamine variano come segue: la vitamina A dallo 0,0048% allo

0,024%, la vitamina C dallo 0,36% al 3,6%, la vitamina D3 dallo 0,00003% allo 0,00015%, la vitamina E dallo 0,06% allo 0,6%, la vitamina K dallo 0,00042% allo 0,0021%, la vitamina B1 dallo 0,0084 allo 0,042%, la vitamina B2 dallo 0,0096% allo 0,048%, la vitamina B6 dallo 0,012% allo 0,06%, la vitamina B12 dal $6 \cdot 10^{-6}\%$ al $3 \cdot 10^{-5}\%$, vitamina PP dallo 0,108% allo 0,54%, biotina dallo 0,0009% al $4,4 \cdot 10^{-5}\%$, acido folico dallo 0,0012% allo 0,006%, dette percentuali essendo percentuali in peso rispetto al peso della composizione totale.

11) Uso secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui le concentrazioni dei minerali variano secondo le seguenti percentuali: il magnesio dal 3,2% al 9%, il potassio dallo 0,4% al 4%, lo zinco dallo 0,09% allo 0,45%, il manganese dallo 0,02% allo 0,07%, il molibdeno, il cromo o il selenio dallo 0,0003% allo 0,002%, il calcio pantotenato dallo 0,04% allo 0,15%, ferro dallo 0,084% allo 0,021%, rame dallo 0,02% allo 0,1%, iodio dallo 0,0009% allo 0,0045%, fosforo dal 2,5% al 20%, fluoro dallo 0,005% allo 0,02%, calcio dal 3,24% al 16,2%, dette percentuali essendo percentuali in peso rispetto al peso della composizione totale.

12) Uso secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui le concentrazioni degli amminoacidi oltre all'acido D-aspartico e L-aspartico variano dallo 0,6% al 10% in peso rispetto al peso della composizione totale.

13) Uso secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui la composizione, oltre all'acido D-

aspartico e L-aspartico, comprende ulteriormente acido folico, vitamina B6, vitamina B12 e conservanti potassio sorbato e sodio benzoato.

14) Uso secondo la rivendicazione 13, in cui la concentrazione di Acido folico è da 0,002% a 0,006%, di Vitamina B6 da 0,02% allo 0,06%, di Vitamina B12 da $1 \cdot 10^{-5}\%$ a $3 \cdot 10^{-5}\%$, di potassio sorbato da 0.002 a 0.008%, sodio benzoato da 0.002 a 0.008%.

15) Uso secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti, in cui la infertilità maschile è non ostruttiva caratterizzata da condizione di oligo e/o astenozoospermia con o senza ipogonadismo ipogonadotropo.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

CLAIMS

1) Use of a composition comprising or consisting of one or more D-aspartic acid salts in concentration from 50% to 100% and one or more L-aspartic acid salts in concentration from 0% to 50%, said percentage being referred to the total amount of D-aspartic e L-aspartic acid salts and said salts being alkaline or alkaline-earth salts, for the preparation of a medicament for the treatment of male infertility.

2) Use according to claim 1, wherein one or more D-aspartic acid salts have a concentration from 50 to 80% and one or more L-aspartic acid salts have a concentration from 20 to 50%, said percentage being referred to the total amount of D-aspartic e L-aspartic acid salts.

3) Use according to anyone of the previous claims, wherein D-aspartic acid salt or L-aspartic acid salt is a sodium salt or a mixture of sodium salt and potassium or magnesium salt.

4) Use according to anyone of the previous claims, wherein one or more D-aspartic acid salts have a concentration 80% and one or more L-aspartic acid salts have a concentration of 20%, said percentage being referred to the total amount of D-aspartic e L-aspartic acid salts.

5) Use according to anyone of the claims 1-3, wherein one or more D-aspartic acid salts have a concentration of 50% and one or more L-aspartic acid salts have a concentration of 50%, said percentage being referred to the total amount of D-aspartic e L-

aspartic acid salts.

6) Use according to anyone of the preceding claims wherein the composition further comprises one or more adjuvant chosen from the group consisting of aminoacids, vitamins, minerals, hormones that stimulate reproductive function, kallikrein, antibiotics, antiinflammatory compounds, antiandrogenic compounds, androgenic compounds, pentoxifilline, gonadotropine, Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH), adrenergic stimulant, dietetic and antioxidant supplements.

7) Use according to claim 6 wherein the aminoacids are chosen from the group consisting of alanine, arginine, carnitine, cysteine, glutamine, glycine, leucine, lysine, isoleucine, methionine, ornithine, phenylalanine, threonine, tryptophan, valine, ketoacids such as alpha ketoglutaric.

8) Use according to claim 6, wherein the vitamins are chosen from the group consisting of A, C, D3, E, K, B1, B2, B6, B12, PP vitamins, biotin (H), folic acid, lipoic acid.

9) Use according to claim 6 wherein the minerals are chosen from the group consisting of magnesium, potassium, zinc, manganese, molybdenum, chromium, selenium, calcium, iron, copper, iodine, phosphor, fluorine.

10) Use according to anyone of the preceding claims wherein the concentrations of the vitamins range according to the following: vitamin A from 0,0048% to 0,024%, vitamin C from 0,36% to 3,6%, vitamin D3 from 0,00003% to 0,00015%, vitamin E from 0,06% to 0,6%,

vitamin K from 0,00042% to 0,0021%, vitamin B1 from 0,0084 to 0,042%, vitamin B2 from 0,0096% to 0,048%, vitamin B6 from 0,012% to 0,06%, vitamin B12 from $6 \cdot 10^{-6}\%$ to $3 \cdot 10^{-5}\%$, vitamin PP from 0,108% to 0,54%, biotin from 0,0009% to $4,4 \cdot 10^{-5}\%$, folic acid from 0,0012% to 0,006%, said percentage being percentage by weight in comparison to the total weight of the composition.

11) Use according to anyone of the preceding claims wherein the concentrations of the minerals range according to the following percentages: magnesium from 3,2% to 9%, potassium from 0,4% to 4%, zinc from 0,09% to 0,45%, manganese from 0,02% to 0,07%, molybdenum, chromium or selenium from 0,0003% to 0,002%, calcium pantotenate from 0,04% to 0,15%, iron from 0,084% to 0,021%, copper from 0,02% to 0,1%, iodine from 0,0009% to 0,0045%, phosphorus from 2,5% to 20%, fluorine from 0,005% to 0,02%, calcium from 3,24% to 16,2%, said percentage being percentage by weight in comparison to the total weight of the composition.

12) Use according to anyone of the preceding claims wherein the concentrations of the aminoacids different from D-aspartic acid and L-aspartic acid range from 0,6% to 10% by weight in comparison to the total weight of the composition.

13) Use according to anyone of the preceding claims wherein the composition, beside D-aspartic acid and L-aspartic acid, further comprises folic acid, vitamin B6, vitamin B12 and the preservatives potassium sorbate and sodium benzoate.

14) Use according to claim 13, wherein the

concentration of folic acid is from 0,002% to 0,006%, Vitamin B6 from 0,02% to 0,06%, Vitamin B12 from $1 \cdot 10^{-5}\%$ to $3 \cdot 10^{-5}\%$, e potassium sorbate from 0.002 to 0.008%, sodium benzoate from 0.002 to 0.008%.

15) Use according to anyone of the preceding claims, wherein the male infertility is a not obstructive infertility characterised by a condition of oligo and/or asthenozoospermia with or without hypogonadotropic hypogonadism.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

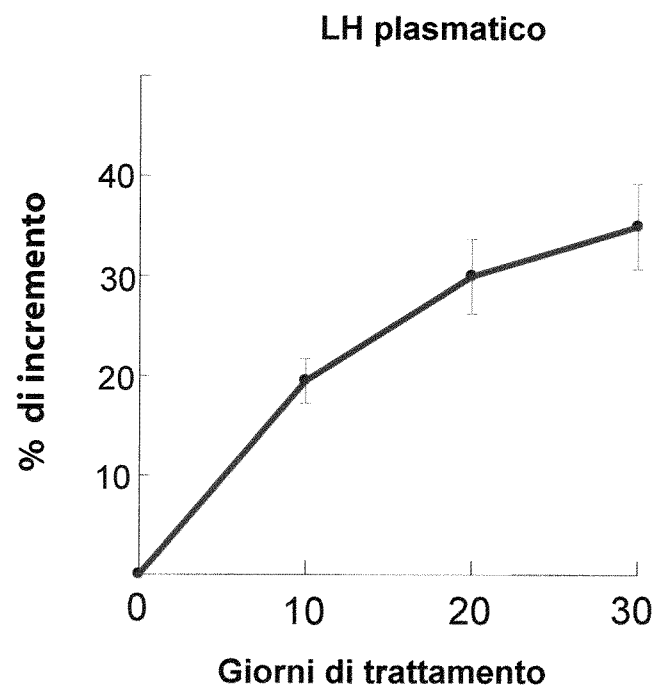


Fig.1

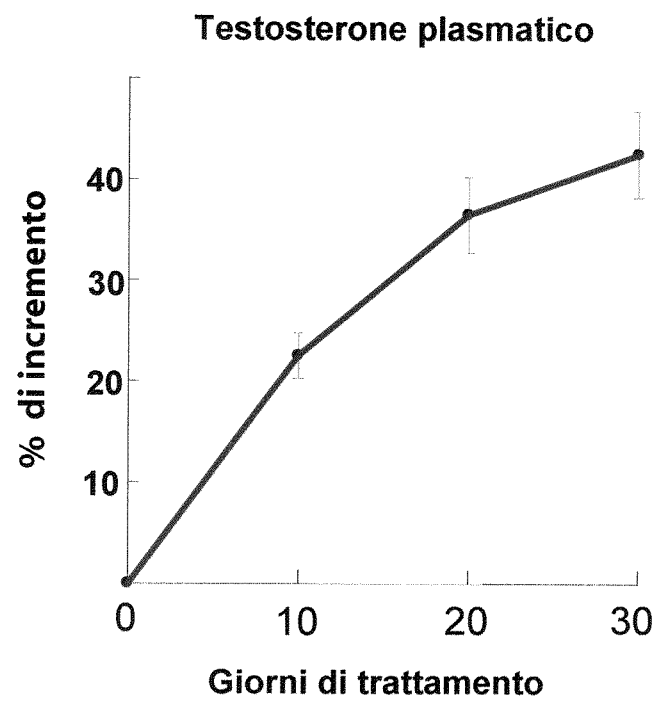


Fig.2

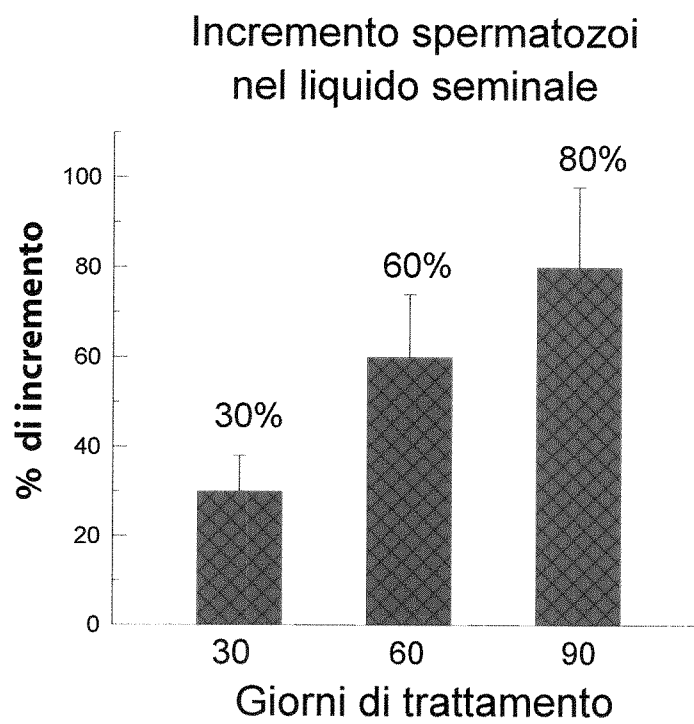


Fig.3

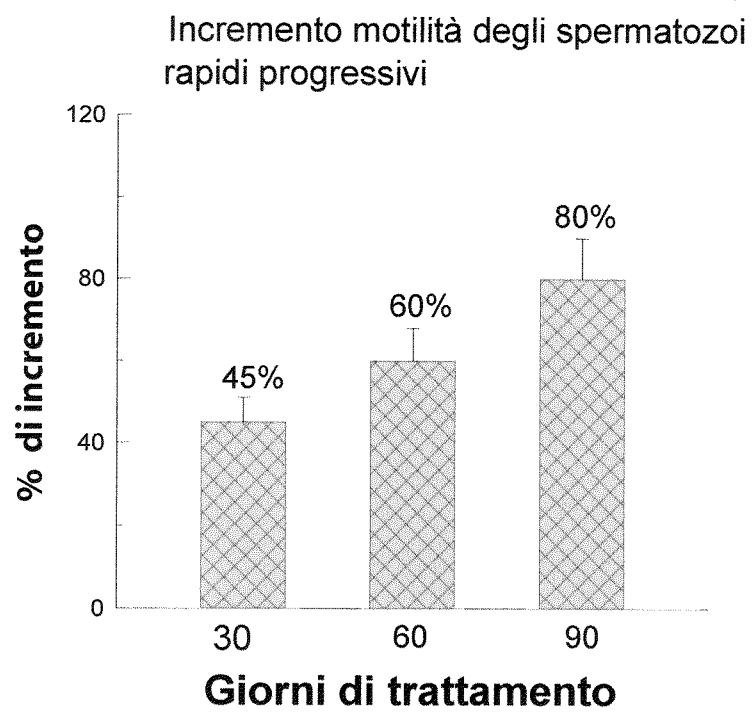
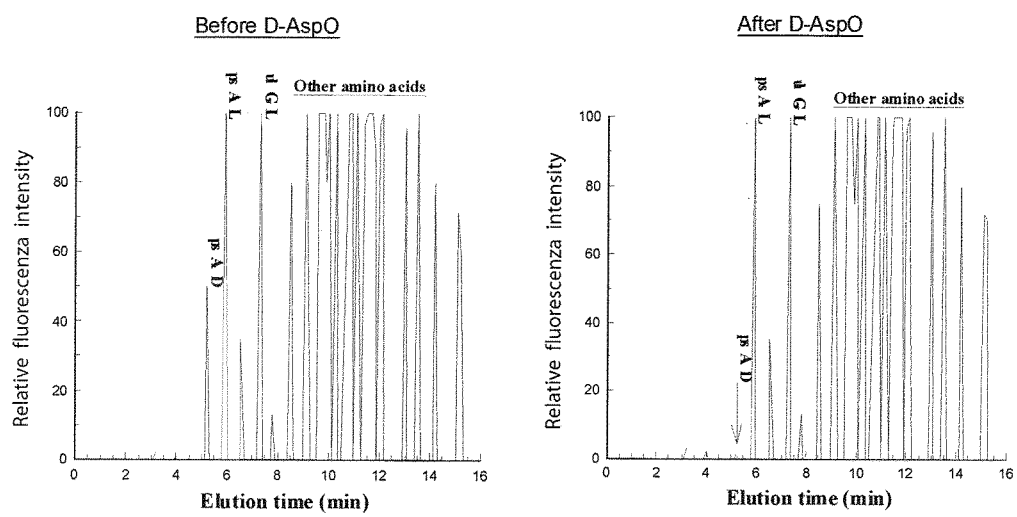


Fig.4

Fig.5