

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902054474A1

Publication Date

20131128

Applicant

MAXIA NICOLETTA

Title

USO DELLA N-ACETIL-5-METOSSITRIPTAMINA O SUOI ANALOGHI PER FAVORIRE IL MECCANISMO DI IMPIANTO DELL' EMBRIONE, E RELATIVE COMPOSIZIONI E MEZZI DI COLTURA

"Uso della N-acetil-5-metossitriptamina o suoi analoghi per favorire il meccanismo di impianto dell'embrione, e relative composizioni e mezzi di coltura"

5 La presente invenzione si riferisce all'uso della N-acetil-5-metossitriptamina (melatonina) e/o suoi analoghi, per l'uso in campo medico o veterinario nella fecondazione assistita per la prevenzione del fallimento dell'impianto in utero dell'embrione
10 mediante somministrazione topica di una quantità efficace in un soggetto mammifero di sesso femminile che necessita di tale trattamento, e relative composizioni e mezzi di coltura.

L'impianto in utero dell'embrione umano è un
15 meccanismo complesso che coinvolge sia l'embrione, sia l'epitelio endometriale. Le fasi di apposizione, adesione e invasione coinvolgono una varietà di molecole che giocano un ruolo unico nel processo, il dialogo molecolare tra il concepito e l'endometrio
20 prevede interazioni tra cellule e tra cellule e fattori biochimici.

Questi meccanismi, qualora adeguatamente espressi o inibiti, contribuiscono a determinare lo stato di recettività o non-recettività dell'endometrio nei
25 confronti dell'embrione.

Lo stato di recettività o non-recettività endometriale, pur essendo un concetto ampiamente condiviso, è clinicamente difficile da definire: la normalità istologica dell'endometrio non implica

necessariamente una normalità funzionale; d'altro
canto l'espressione temporale e spaziale di
particolari strutture endometriali, denominate
pinopodi, è fortemente suggestiva dello stato stesso
5 di recettività.

L'impianto è una complessa sequenza di segnali che
sono cruciali per l'instaurarsi della gravidanza; si
suppone che un gran numero di mediatori molecolari
sotto l'influenza di segnali ovarici siano coinvolti
10 nell'interazione embrio-endometriale. Questi
mediatori comprendono un'ampia varietà di molecole
come ormoni, citochine, fattori di crescita, lipidi,
molecole di adesione e altro (1).

Il fallimento dell'impianto nelle tecniche di
15 procreazione medico assistita (PMA) rimane tuttora un
problema irrisolto ed è considerato una delle
maggiori cause di infertilità nelle donne sane.
Considerando poi, che la percentuale di impianto
delle tecniche di PMA è intorno al 25%, l'inadeguata
20 recettività uterina è ritenuta responsabile di circa
i due terzi di tutti i fallimenti (per un terzo è
ritenuto responsabile l'embrione) (2).

L'endometrio è recettivo all'invasione della
blastocisti per un intervallo di tempo limitato e
25 definito "finestra d'impianto". Il "dialogo" per la
sincronizzazione fra "ovulazione-prime fasi di
sviluppo embrionale-modificazioni cellulari
dell'epitelio endometriale per l'impianto" è tenuto
da una serie di messaggeri ormonali e biochimici.

Durante la "finestra d'impianto", l'epitelio endometriale esprime, mediante regolazione ormonale e biochimica, alcune strutture dette pinopodi, capaci di permettere l'adesione e l'invasione della
5 blastocisti.

La finestra d'impianto sarebbe caratterizzata secondo studi di microscopia elettronica (3) dalla massima espressività dei pinopodi.

La formazione dei pinopodi è considerata come un
10 marker specifico della recettività endometriale, essi appaiono circa una settimana dopo l'ovulazione, ma la loro completa espressione varia da paziente a paziente e sembra mantenersi per un solo giorno. (4)

L'espressione dei pinopodi è direttamente
15 proporzionale all'aumento dei livelli plasmatici del progesterone (5).

Il concetto di recettività endometriale o "finestra d'impianto", correlato all'espressione dei pinopodi, unanimemente accettato dalla comunità scientifica, è
20 da qualche decennio oggetto di studio per chi affronta le problematiche della riproduzione assistita.

In sintesi: il progesterone, l'ormone pro-gestazione, è il mediatore principale e intorno ad esso ruotano
25 una serie di altri mediatori che possono favorire l'evento impianto.

Da quanto sopra riportato, emerge come il problema dell'ottenimento della gravidanza mediante le tecniche di fecondazione assistita sia imputabile in

gran parte alle scarse conoscenze del fenomeno impianto.

Appare quindi evidente, anche alla luce delle numerose restrizioni legislative nel campo della
5 procreazione assistita, l'esigenza di ottimizzare la fase di impianto.

Gli autori della presente invenzione hanno ora riscontrato che uno dei mediatori in grado di svolgere un ruolo critico insieme al progesterone
10 nell'espressione dei pinopodi, con effetti molto positivi per l'annidamento embrionale è la N-acetil-5-metossi triptamina (melatonina).

La melatonina è prodotta dalla pineale, ghiandola neuroendocrina regolata dalla luce: il buio ne
15 stimola la sintesi e la secrezione.

L'uso della melatonina non presenta effetti collaterali, né problemi di sovradosaggio, né è riportata in letteratura alcuna controindicazione
(6).

20 Sono molteplici i vantaggi già noti e associati all'utilizzo della melatonina anche in processi diversi che possono interferire positivamente con l'impianto. A questo proposito, esiste inoltre una correlazione inversamente proporzionale con il
25 rischio di carcinoma dell'endometrio e i livelli sierici di melatonina con azione protettiva accertata.

È stato dimostrato da alcuni autori (7) che la melatonina inibisce la proliferazione delle cellule

atipiche endometriali, definite di Ishikawa, responsabile del carcinoma dell'endometrio. Attraverso esperimenti con radioligandi e antagonisti della melatonina come il luzindole, i risultati del
5 gruppo di ricercatori hanno dimostrato che l'effetto inibitore è esercitato dalla melatonina attraverso i recettori MT2 presenti nelle membrane delle cellule proliferative di Ishikawa.

Altro determinante da considerare è il periodo della
10 menopausa, durante il quale la melatonina diminuisce la sua produzione e infatti durante tale periodo il rischio di carcinoma endometriale risulta più elevato.

Ad esempio, studi *in vitro* e *in vivo* (6, 8) hanno
15 dimostrato una potente azione antiossidante della melatonina, un'azione superiore a quella del mannitolo, del glutatione e della vitamina E nella protezione da danno ossidativo dovuto a radicali idrossilici tossici e ad altri prodotti catabolici
20 cellulari derivanti da cambiamenti nel metabolismo degenerativo o proliferativo e da/per ossidazione lipidica.

La melatonina (9-10) ha inoltre importanti proprietà antiestrogeniche e stimola la produzione di
25 progesterone che si pone in antitesi con l'azione degli estrogeni stessi (elevati livelli di estrogeni si associano ad un peggiore esito delle tecniche di fecondazione assistita) (11).

A questo riguardo ricordiamo che la superovulazione

mediante gonadotropine indotta in cicli di PMA determina una iperestrogenizzazione con aumento dell'iperplasia endometriale, un fattore di rischio importante per il carcinoma endometriale sopra
5 menzionato.

Alcuni autori (12) affermano che esiste un sinergismo fra gonadotropina corionica umana (hCG) e melatonina: infatti la melatonina aumenta, incrementando tra l'altro la produzione di progesterone (sia *in vivo*
10 che *in vitro*), a 6-7 giorni dal picco ovulatorio di hCG.

A questo proposito si evidenzia come il picco di melatonina post-ovulatorio coincida esattamente con la finestra di impianto endometriale e con la
15 formazione della blastocisti (lo stadio di sviluppo embrionale in cui avviene l'annidamento in utero). La correlazione positiva tra melatonina e progesterone e negativa tra melatonina ed estradiolo verrebbe potenziata dall'hCG: infatti, in assenza di
20 quest'ultima, la melatonina ha un effetto molto blando sulla produzione di progesterone.

Forma oggetto della presente invenzione la N-acetil-5-metossi triptamina o un suo analogo, per l'uso in campo medico o veterinario nelle tecniche di
25 fecondazione assistita per la prevenzione del fallimento dell'impianto nell'utero mediante somministrazione topica di una quantità efficace in un soggetto mammifero di sesso femminile che necessita di tale trattamento.

Preferibilmente, detto analogo della N-acetil-5-metossi triptamina è scelto tra agomelatina, 6-idrossi melatonina solfato, serotonina, 5 idrossitriptofano o loro derivati.

5 In una forma di realizzazione preferita dell'invenzione il soggetto mammifero di sesso femminile è una donna affetta da infertilità o poliabortività.

Secondo un'ulteriore forma di realizzazione preferita, la somministrazione topica di N-acetil-5-metossi triptamina o un suo analogo, preferibilmente di N-acetil-5-metossi triptamina, avviene mediante irrigazione endometriale.

Ancora secondo un'ulteriore forma preferita di 15 realizzazione dell'invenzione, detta somministrazione topica viene effettuata in un'unica somministrazione al momento del prelievo ovocitario.

Preferibilmente, detto principio attivo è presente in una concentrazione variabile da 4×10^{-9} g/ml a 25×10^{-9} g/ml, ancora più preferibilmente superiore o 20 uguale a 10×10^{-9} g/ml.

In una forma di realizzazione alternativa, è possibile l'uso concomitante con una terapia sistemica a base di N-acetil-5-metossi triptamina, HCG o progesterone, o una loro combinazione, dal 25 giorno del prelievo ovocitario.

In forme alternative preferite di realizzazione della presente invenzione, le tecniche di riproduzione assistita sono scelte dal gruppo che consiste in

rapporti mirati; inseminazione intrauterina (IUI);
fertilizzazione in vitro (IVF); iniezione
intracitoplasmatica di spermatozoi (ICSI), iniezione
intracitoplasmatica di spermatozoi morfologicamente
5 selezionati (IMSI) e tecniche Tese-Tesa (Testicular
Sperm Aspiration-Extraction).

Costituisce un ulteriore oggetto della presente
invenzione una composizione atta alla
somministrazione topica comprendente N-acetil-5-
10 metossi triptamina o un suo analogo, o una loro
combinazione come principio attivo, in una quantità
efficace per la prevenzione del fallimento
dell'impianto nell'utero nella fecondazione
assistita, insieme ad uno o più eccipienti o
15 adiuvanti fisiologicamente accettabili.

Preferibilmente, detto principio attivo è presente
nella composizione in una concentrazione variabile da
4 x 10⁻⁹ g/ml a 25 x 10⁻⁹ g/ml, preferibilmente
superiore o uguale a 10 x 10⁻⁹ g/ml.

20 Secondo una forma di realizzazione preferita il
principio attivo nella suddetta composizione è
formulato come irrigazione endometriale in un mezzo
di coltura cellulare ad una concentrazione finale
variabile da 4 x 10⁻⁹ g/ml a 25 x 10⁻⁹ g/ml,
25 preferibilmente superiore o uguale a 10 x 10⁻⁹ g/ml.

Tale mezzo di coltura per blastocisti può
preferibilmente comprendere le seguenti componenti:

- fonte di D-glucosio
- antibiotico, preferibilmente Gentamicina

- albumina sierica umana
- amminoacidi essenziali e non essenziali, preferibilmente L-aurina,
- sali di calcio: calcio lattato, calcio pantotenato;
- 5 - sali di sodio: cloruro di sodio, bicarbonato di sodio e sodio piruvato;
- sali di potassio: cloruro di potassio, fosfato di potassio;
- 10 - sali di magnesio: magnesio cloruro, magnesio solfato;
- acqua;

e avere un pH compreso tra 7,5 e 7,8.

Ancora preferibilmente detto mezzo di coltura è il
15 Sydney IVF @Blastocyst medium.

L'invenzione si riferisce altresì ad un mezzo di coltura cellulare *in vitro* o *in vivo*, comprendente le seguenti componenti:

- fonte di D-glucosio
- 20 - antibiotico, preferibilmente Gentamicina
- albumina sierica umana
- amminoacidi essenziali e non essenziali, preferibilmente L-aurina,
- sali di calcio: calcio lattato, calcio pantotenato;
- 25 - sali di sodio: cloruro di sodio, bicarbonato di sodio e sodio piruvato;
- sali di potassio: cloruro di potassio, fosfato di potassio;

- sali di magnesio: magnesio cloruro, magnesio solfato;

- acqua;

caratterizzato dal fatto di comprendere ulteriormente
5 N-acetil-5-metossi triptamina o un suo analogo, o una loro combinazione, in cui detto principio attivo è presente in una concentrazione variabile da 4×10^{-9} g/ml a 25×10^{-9} g/ml, preferibilmente superiore o uguale a 10×10^{-9} g/ml.

10 Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione un mezzo di coltura cellulare, per l'espansione di pinopodi e l'ottenimento di un modello di studio *in vitro*.

Tale mezzo di coltura cellulare può essere impiegato
15 anche per colture embrionali, realizzando ad esempio un terreno di coltura che è utilizzato per trasferire l'embrione in utero, un terreno che è quindi inserito in utero.

Aspetti particolarmente vantaggiosi dell'uso secondo
20 la presente invenzione sono legati alla modalità di somministrazione topica proposta che non compromette il ciclo di trattamento di PMA, essendo una modalità molto meno invasiva della biopsia endometriale già applicata in donne sottoposte a ciclo di PMA (13).

25 Infine, grazie alle proprietà di inibizione della sintesi delle prostaglandine (14), proprie della melatonina, questo lavaggio diminuisce le contrazioni dell'utero e favorisce ulteriormente l'impianto.

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo

illustrativo, ma non limitativo, secondo due forme preferite di realizzazione con particolare riferimento alle figure allegate, in cui:

- 5 - la Figura 1 mostra l'endometrio prima del trattamento con la composizione secondo la presente invenzione, quindi in assenza dei pinopodi;
- la Figura 2 mostra l'endometrio a 1/2 giorni dal trattamento con la composizione secondo la presente invenzione: inizia a vedersi la formazione dei
10 pinopodi;
- la Figura 3 mostra l'endometrio a 3/4 giorni dal trattamento con la composizione secondo la presente invenzione: massimo sviluppo dei pinopodi;
- la Figura 4 mostra l'endometrio a 5/6 giorni dal
15 trattamento con la composizione secondo la presente invenzione: inizia lo sfaldamento dei pinopodi che si mostrano irregolari (apoptosi cellulare).

A titolo esemplificativo, ma non limitativo della presente invenzione, si riportano di seguito gli
20 studi comparativi condotti (*in vitro* ed *in vivo*) dagli autori della presente invenzione per valutare l'incremento della percentuale d'impianto embrionale umano in tecnologie di PMA attraverso l'utilizzo di melatonina.

25 ESEMPIO 1: Studio *in vivo*

MATERIALI E METODI

La melatonina (o N-acetil-5-metossitriptamina; Numero CAS 73-31-4) utilizzata è stata ottenuta presso la Farmalabor come prodotto in polvere con titolo $\geq 99\%$.

Il mezzo di coltura utilizzato per la somministrazione della melatonina attraverso lavaggio (o irrigazione) endometriale all'interno della cavità uterina delle pazienti in seguito a prelievo ovocitario è il Sydney IVF® Blastocyst medium fornito dalla Cook Ireland Ltd. (Numero catalogo G20722 e G20929).

Tale mezzo di coltura è utilizzato normalmente per migliorare il clivaggio, differenziamento ed espansione in vitro della blastocisti.

Il terreno contiene D-glucosio, tutti i 20 L-amminoacidi essenziali, la L-aurina, Gentamicina, albumina sierica umana, calcio lattato, calcio pantotenato; cloruro di sodio, bicarbonato di sodio e sodio piruvato; cloruro di potassio, fosfato di potassio; magnesio cloruro, magnesio solfato; acqua purificata.

Altre caratteristiche del mezzo di coltura:

pH: 7,5 - 7,8 (utilizzo tampone bicarbonato).

Osmolarità: 280-290 mOsm/kg

Endotossine : < 0,4 EU/ml

MEA: ≥ 80%

Analisi statistica

E' stata condotta un'analisi statistica (IMPRUN.TXT) di regressione lineare a più variabili

Metodi statistici:

Il ruolo del numero di embrioni impiantati, della loro qualità e del procedimento di lavaggio con la soluzione contenente la melatonina nell'aumentare la

probabilità di concepimento è stato calcolato mediante regressione logistica non condizionale, aggiustando in funzione dell'età materna.

Il rapporto tra la probabilità di concepimento associata a ciascuna procedura (numero di embrioni, loro qualità ed applicazione del procedimento di lavaggio con Blastocyst medium contenente la melatonina) e la probabilità di concepimento in riferimento rispettivamente alla categoria inferiore di numero di embrioni (uno), alla qualità meno che ottimale degli embrioni impiantati, o alla assenza del procedimento di lavaggio, è stato definito come Odds Ratio (OR), ed è stato calcolato mediante regressione logistica non condizionale, aggiustando in funzione dell'età materna.

Nella regressione logistica, l'OR corrisponde all'antilogaritmo su base naturale del coefficiente di regressione β associato a ciascuna covariata nel modello di regressione.

Il valore così calcolato esprime pertanto il vantaggio ottenuto con ciascuna procedura, indipendentemente dalle altre condizioni.

Gli intervalli di confidenza al 95% (IF95%) a due code degli OR sono stati calcolati con la formula di Wald ($e^{\beta \pm (z_{\alpha/2} * se_{\beta})}$).

Controlli di sterilità

Per effettuare i controlli di sterilità del mezzo di coltura addizionato con melatonina è stato impiegato uno strumento BACT/ALERT 3D-60 (BIOMERIEUX). I

flaconi di coltura Bact/ALERT trovano impiego nei sistemi di rilevazione microbica in procedure qualitative per il recupero e la rilevazione di microrganismi anaerobici e aerobici facoltativi (batteri) nel sangue e altri fluidi normalmente sterili come il Blastocyst medium utilizzato nella presente sperimentazione.

Il sistema di rilevazione microbica Bact/ALERT viene utilizzato per determinare se nei campioni di sangue o di altri fluidi normalmente sterili come il blastocyst medium da noi utilizzato, con sospetta batteriemia sono presenti microorganismi. Il sistema Bact/ALERT ed i flaconi di coltura offrono un sistema di rilevazione microbica e un terreno di coltura con condizioni ambientali e nutrizionali adatte ai microrganismi comunemente presenti nelle infezioni del sangue e di altri fluidi normalmente sterili.

I flaconi inoculati (da un min di 5 ml ad un massimo di 10 ml di campione in esame) vengono incubati nello strumento, dove sono sottoposti a monitoraggio continuo ai fini della rilevazione dell'eventuale crescita di microrganismi nei flaconi Bact/ALERT.

Il sistema di rilevazione microbica Bact/ALWERT utilizza un sensore colorimetrico e luce riflessa per monitorare la presenza e la produzione di anidride carbonica (CO₂) disciolta nel terreno di coltura.

I microorganismi eventualmente presenti nel campione metabolizzano i substrati nel terreno di coltura producendo anidride carbonica. La produzione di CO₂

determinata dalla crescita dei microorganismi induce il sensore gas permeabile verde-azzurro presente sul fondo di ogni flacone di coltura ad assumere una colorazione gialla.

5 La colorazione più chiara indica un aumento delle unità di riflettanza monitorale dal sistema.

La riflettanza del flacone viene monitorata e registrata dallo strumento ogni 10 minuti.

I flaconi di coltura sono determinati positivi o
10 negativi dal software di gestione dei sistemi di rilevazione microbica Bact/ALERT dopo 6 giorni di incubazione.

Non è necessario alcun intervento fino a quando lo
strumento Bact/ALERT non segnala un flacone di
15 coltura positivo o negativo.

Pazienti

Le pazienti sottoposte a fecondazione assistita sono state randomizzate il giorno del prelievo ovocitario in tre gruppi:

20 **Gruppo A:** 430 pazienti da sottoporre a irrigazione endometriale con 1,5 ml di soluzione fisiologica.

Gruppo B: 436 pazienti da sottoporre a irrigazione endometriale con una soluzione di 1,5 ml di soluzione fisiologica addizionato con concentrazione finale di
25 melatonina (10×10^{-9} g/ml).

Gruppo C: pazienti non sottoposte a irrigazione endometriale.

Arruolamento *in vivo* di pazienti sottoposte a fecondazione assistita per irrigazione endometriale

con concentrazione nota (concentrazione finale di 10×10^{-9} g/ml) di melatonina al momento del prelievo ovocitario e correlata visualizzazione ecoguidata del diametro di falda liquida creatasi nel fondo
5 dell'utero.

Prima di effettuare qualsiasi irrigazione endometriale sono stati eseguiti esami colturali per prova di sterilità a 2-4-6 giorni e una volta riscontrata la coltura negativa veniva utilizzata in
10 utero.

Lo studio è stato effettuato coinvolgendo pazienti in diversi centri privati specializzati in PMA, quali il Centro di BRA, il Centro Promea di Torino e di Cagliari, il Centro Genera di Perugia e il centro
15 pubblico policlinico di Bari. A tali centri è stato inviato il mezzo di coltura addizionato con melatonina dopo averlo sottoposto alle prove di sterilità per eseguire il seguente protocollo di trattamento.

20 In breve, il trattamento consiste in un lavaggio endometriale all'interno della cavità uterina senza alcuna cellula in cocultura, impiegando solo mezzo di coltura addizionato con la melatonina con concentrazione finale di 10×10^{-9} g/ml (precedenti
25 studi erano stati effettuati con un terzo e la metà della concentrazione finale poi mantenuta senza dare gli stessi risultati - dati non mostrati).

Eseguito il prelievo ovocitario, (momento corrispondente all'ovulazione dopo la

somministrazione dell'HCG nei protocolli di PMA) dopo aver controllato l'emostasi vaginale, è stata riacordata una siringa sterile da 2,5 ml ad un catetere intrauterino monolume con apertura apicale ed è stato aspirato il mezzo di coltura (Blastocyst medium) modificato con aggiunta di melatonina fino ad un volume di 1,5 ml.

E' stato introdotto il catetere nell'orifizio interno uterino con le medesime modalità con cui l'operatore effettua l'embryo-transfer (ET) convenzionale.

Quindi è stato iniettato lentamente il medium modificato e, a fine irrigazione, lo spessore della falda liquida endocavitaria è stato misurato con ecografia transaddominale (lavaggio ed ecografia devono essere contemporanei, la falda liquida arriva a circa 10 mm e poi scompare subito).

RISULTATI

In vivo lo studio multicentrico ha coinvolto 863 pazienti sottoposte a fecondazione assistita e a irrigazione endometriale (misure ecografiche falda liquida) con melatonina che a 3-4 giorni da questo sono state sottoposte a trasferimento embrionale.

Per quest'ultimo è stato calcolato con analisi statistica (IMPRUN. TXT) di regressione lineare a più variabili il CI (intervallo di confidenza o intervallo fiduciale) del 95%.

L'analisi univariata mostra che l'impianto di 3 embrioni comporta un significativo aumento, pari a circa 3 volte (OR=2,8, IF 95% 1,7-4,4), della

probabilità di concepimento.

Un numero di embrioni pari a due non appare invece sufficiente a migliorare la probabilità di concepimento (OR=1,0, IF 95% 1,7-4,4).

5 D'altra parte, anche la qualità ottimale degli embrioni impiantati appare essere un fattore importante nell'aumentare la probabilità di concepimento (OR = 2.9, IF 95% 1.8 - 4.7).
10 Nell'analisi univariata, lo stesso grado di rilevanza appare associato al ricorso alla procedura di lavaggio (OR = 2.2, IF 95% 1.6 - 2.9).

L'analisi multivariata permette di controllare l'effetto indipendente di ciascuna variabile, al netto, quindi, dell'effetto delle altre procedure applicate e dell'età materna. In questo caso, il
15 ricorso alla procedura di lavaggio raddoppia la probabilità di successo del concepimento (OR = 2.2, IF 95% 1.6 - 3.0).

Un miglioramento analogo risulta associato
20 all'impianto di tre embrioni, piuttosto che all'impianto di un solo embrione (OR = 2.1, IF 95% 1.2 - 3.7), e al ricorso ad embrioni di qualità ottimale (OR = 1.9, IF 95% 1.1 - 3.3).

Il ricorso a tutte le tre procedure precedentemente
25 riportate sembra pertanto costituire la scelta di elezione nelle procedure di fecondazione assistita.

In conclusione, gli studi *in vivo* hanno dimostrato che l'irrigazione di melatonina delle cellule endometriali consente di ottenere il doppio delle

gravidezze rispetto agli altri due gruppi che non si diversificavano significativamente.

Ciò consente di ottenere un valido e innovativo presidio per l'aumento delle percentuali d'impianto
5 in tecniche di fecondazione assistita (ART).

ESEMPIO 2: Studio *in vitro*

MATERIALI E METODI

La melatonina e il mezzo di coltura impiegati sono i medesimi utilizzati per lo studio *in vivo*.

10 *Microscopia elettronica (SEM)*

E' stato utilizzato un microscopio elettronico ad emissione di campo ad alta risoluzione modello FE HITACHI S 4000 operante a 15-20 KW.

Allestimento preparati

15 Piccoli pezzi di tessuto endometriale di circa 1 mm di grandezza subito dopo il prelievo dalla paziente sono stati posti in una soluzione fissativa composta da paraformaldeide 1% e gluteraldeide 0,5% in tampone cacodilato 0,1 M pH 7,2 per un tempo di 3 ore.

20 Dopo questa fissazione i pezzi vengono lavati in PBS 20 min x 3 volte (1 ora totale) e quindi si effettua la post fissazione in una soluzione di tetrossido di osmio 2% e ferrocianuro di potassio 2,5%.

Il preparato viene mantenuto al buio per 3 ore quindi
25 si procede ad un lavaggio accurato in rotazione in PBS, con 4 ricambi di 20 min ciascuno.

Si procede alla disidratazione dei campioni di tessuto con acetone in serie ascendente con 3 ricambi in 1 ora per ogni gradazione 50%-70%-80%-90%-95% e 2

ricambi con acetone puro.

A questo punto si procede all'essiccazione al punto critico con CO₂ liquida nell'apposito apparecchio ad alta pressione che sostituisce l'acetone al 10% con
5 CO₂ liquida, poi si porta lentamente alla temperatura di punto critico e la CO₂ evapora. A questo punto i campioni di tessuto sono perfettamente anidri e possono essere montati sui portapreparati del microscopio elettronico.

10 I campioni vengono attaccati con uno speciale biadesivo conduttore di elettricità e per posizionarli si usano due sottilissimi aghi e il preparato è pronto per essere osservato con microscopio elettronico a scansione (SEM).

15 *Campioni biologici*

Previo consenso informato, sono stati posti in coltura frammenti di endometrio prelevato da pazienti sottoposte ad isteroscopia diagnostica.

Per ogni paziente sono stati allestiti due bracci:
20 una parte del tessuto è stata messa in coltura con terreno convenzionale Blastocyst Medium privo di melatonina, una parte con terreno convenzionale Blastocyst medium addizionato con melatonina.

Allestimento colture

25 Coltura *in vitro* di endometrio (prelevato mediante isteroscopia dalle pazienti sottoposte a controlli pre-fecondazione assistita) con melatonina per 3-6 giorni e correlata visualizzazione di pinopodi mediante microscopia elettronica (SEM).

RISULTATI

Gli studi *in vitro* hanno dimostrato che la cocoltura da 3 a 5 giorni di tessuto endometriale in provetta con aggiunta permanente di melatonina, comporta un
5 aumento indiscutibile dei pinopodi (a livello di microscopia elettronica (SEM)), a prescindere dall'età della paziente e dalla fase del ciclo mestruale in cicli spontanei o manipolati con stimolazione farmacologica di super-ovulazione,
10 rispetto alla coltura di controllo. Tali pinopodi sono strutture definite fra i marker più importanti d'impianto che per ogni donna (con variabilità di 5 giorni, ovvero una donna può mestruare a 26 giorni con ciclo corto o mestruare a 33 giorni) è di 48 ore.
15 Di fatto, i due terzi del successo nell'instaurarsi di una gravidanza dipendono dal corretto momento d'impianto, l'altro terzo dipende dalla qualità dell'embrione.

L'esame al microscopio elettronico SEM ha dimostrato
20 che l'aggiunta di melatonina porta ad una completa espressione morfologica dei pinopodi come mostrato nelle Figure 1-4.

Ciò sottolinea l'importanza dei pinopodi durante la finestra d'impianto e l'aumento dell'espressione
25 degli stessi indotta in coltura con terreni addizionati con melatonina.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Simon C, Martin JC, Pellicer A. Clin obst & gynaecol, 2000 14; (5) 127: 815-826.

2. Lédée-Bataille N, Laprée-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G. *Hum Reprod*, 2002 Jan 17; (1): 213-218.
3. Nardo LG, Sabatini L, Rai R, Nardo F. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2002 Mar 10; 101 (2): 104-8.
4. Nikas G, Makrigiannakis A. *Ann N Y Acad Sci*, 2003 Nov; 997: 120-3.
5. Stavreus-Evers A, Mandelin E, Koistinen R, Aghajanova L, Hovatta O, Seppälä M. *Fertil Steril*, 2006 Jun; 85 (6): 1803-11. Erratum in: *Fertil Steril*. 2006 Aug; 86 (2): 498.
6. Brzezinski A. *N Engl J Med*, 1997 Jan 16; 336 (3): 186-95.
7. Kobayashi Y, Itoh MT, Kondo H, Okuma Y, Sato S, Kanishi Y, Hamada N, Kiguchi K, Ishizuka B. *J Pineal Res*, 2003 Sep; 35 (2): 71-4.
8. Aydogan S, Yerer MB, Goktas A. Melatonin and nitric oxide. *J Endocrinol Invest*, 2006 Mar; 29 (3): 281-7.
9. Sandyk R, Anastasiadis PG, Anninos PA, Tsagas N. *Int J Neurosci*, 1992 Feb; 62 (3-4): 243-50.
10. Sandyk R, Anastasiadis PG, Anninos PA, Tsagas N. *Int J Neurosci*, 1992 Jan; 62 (1-2): 89-96.
11. Simón C, Garcia Velasco JJ, Valbuena D, Peinado JA, Moreno C, Remohí J, Pellicer A. *Fertil Steril*, 1998 Aug; 70 (2): 234-9.
12. Tang PL, Chan TY, Tang GW, Pang SF. *Gynecol Obstet Invest.*, 1998;45(4):247-52.
13. Ubaldi F, Bourgain C, Tournaye H, Smitz J,

Steirteghem A, Devroey P. Fertil Steril, 1997 Mar
67, 3: 521-526.

14. Schaeffer HJ, Sirotkin AV. Adv Exp Med Biol.
1995; 395:547-548.

RIVENDICAZIONI

1. N-acetil-5-metossi triptamina o un suo analogo, per l'uso in campo medico o veterinario nella fecondazione assistita per la prevenzione del
5 fallimento dell'impianto nell'utero mediante somministrazione topica di una quantità efficace in un soggetto mammifero di sesso femminile che necessita di tale trattamento.
2. N-acetil-5-metossi triptamina o un suo analogo
10 secondo la rivendicazione 1, in cui detto analogo è scelto tra agomelatina, 6-idrossi melatonina solfato, serotonina, 5 idrossitriptofano o loro derivati.
3. N-acetil-5-metossi triptamina o un suo analogo secondo ognuna delle rivendicazioni 1-2, in cui detto
15 soggetto mammifero di sesso femminile è una donna affetta da infertilità o poliabortività.
4. N-acetil-5-metossi triptamina o un suo analogo secondo ognuna delle rivendicazioni 1-3, in cui detta
20 somministrazione topica avviene mediante irrigazione endometriale.
5. N-acetil-5-metossi triptamina o un suo analogo, secondo ognuna delle rivendicazioni 1-4, in cui detta somministrazione topica viene effettuata in un'unica somministrazione al momento del prelievo ovocitario.
- 25 6. N-acetil-5-metossi triptamina o un suo analogo, secondo ognuna delle rivendicazioni 1-5, in cui detto principio attivo è presente in una concentrazione variabile da 4×10^{-9} g/ml a 25×10^{-9} g/ml, preferibilmente superiore o uguale a 10×10^{-9} g/ml.

7. N-acetil-5-metossi triptamina o un suo analogo secondo ognuna delle rivendicazioni 1-6, per l'uso concomitante mediante somministrazione sistemica di N-acetil-5-metossi triptamina, HCG o progesterone, o
5 una loro combinazione, dal giorno del prelievo ovocitario.

8. N-acetil-5-metossi triptamina o un suo analogo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti, in cui le tecniche di fecondazione assistita sono scelte
10 dal gruppo che consiste in rapporti mirati; inseminazione intrauterina (IUI); fertilizzazione in vitro (IVF); iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi (ICSI), iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi morfologicamente selezionati (IMSI) e
15 tecniche Tese-Tesa (Testicular Sperm Extraction).

9. Composizione atta alla somministrazione topica comprendente N-acetil-5-metossi triptamina o un suo analogo, o una loro combinazione come principio attivo, preferibilmente N-acetil-5-metossi
20 triptamina, in una quantità efficace per la prevenzione del fallimento dell'impianto nell'utero nella fecondazione assistita, insieme ad uno o più eccipienti o adiuvanti fisiologicamente accettabili.

10. Composizione secondo la rivendicazione 9, in cui detto principio attivo è presente in una
25 concentrazione variabile da 4×10^{-9} g/ml a 25×10^{-9} g/ml, preferibilmente superiore o uguale a 10×10^{-9} g/ml.

11. Composizione secondo ognuna delle rivendicazioni

9-10, in cui detto principio attivo è formulato come irrigazione endometriale in un mezzo di coltura cellulare ad una concentrazione finale variabile da 4×10^{-9} g/ml a 25×10^{-9} g/ml, preferibilmente superiore o uguale a 10×10^{-9} g/ml.

12. Composizione secondo la rivendicazione 11, in cui detto mezzo di coltura per blastocisti, comprende le seguenti componenti:

- fonte di D-glucosio
 - 10 - antibiotico, preferibilmente Gentamicina
 - albumina sierica umana
 - amminoacidi essenziali e non essenziali, preferibilmente L-aurina,
 - sali di calcio: calcio lattato, calcio pantotenato;
 - 15 - sali di sodio: cloruro di sodio, bicarbonato di sodio e sodio piruvato;
 - sali di potassio: cloruro di potassio, fosfato di potassio;
 - 20 - sali di magnesio: magnesio cloruro, magnesio solfato;
 - acqua;
- e ha un pH compreso tra 7,5 e 7,8.

13. Composizione secondo la rivendicazione 12, in cui detto mezzo di coltura è il Sydney IVF @Blastocyst medium.

14. Mezzo di coltura cellulare *in vitro* o *in vivo*, comprendente:

- fonte di D-glucosio

- antibiotico, preferibilmente Gentamicina
- albumina sierica umana
- amminoacidi essenziali e non essenziali, preferibilmente L-aurina,
- 5 - sali di calcio: calcio lattato, calcio pantotenato;
- sali di sodio: cloruro di sodio, bicarbonato di sodio e sodio piruvato;
- sali di potassio: cloruro di potassio, fosfato
- 10 di potassio;
- sali di magnesio: magnesio cloruro, magnesio solfato;
- acqua;

caratterizzato dal fatto di comprendere ulteriormente

15 N-acetil-5-metossi triptamina o un suo analogo, o una loro combinazione, in cui detto principio attivo è presente in una concentrazione variabile da 4×10^{-9} g/ml a 25×10^{-9} g/ml, preferibilmente superiore o uguale a 10×10^{-9} g/ml.

20 15. Uso del mezzo di coltura cellulare secondo la rivendicazione 14, per l'espansione di pinopodi e l'ottenimento di un modello di studio *in vitro*.

CLAIMS

1. N-acetyl-5-methoxy tryptamine or an analogue thereof, for use in the medical or veterinary field in assisted reproduction for the prevention of implantation failure into the uterus by topical administration of an effective amount in a mammalian subject female in need of such treatment.
2. N-acetyl-5-methoxy tryptamine or an analogue thereof, according to claim 1, wherein said analogue is selected from agomelatine, 6-hydroxymelatonin, serotonin, 5 hydroxytryptophan or their derivatives.
3. N-acetyl-5-methoxy tryptamine or an analogue thereof, according to any one of claims 1-2, wherein said female mammalian subject is a woman suffering from infertility or polyabortion.
4. N-acetyl-5-methoxy tryptamine or an analogue thereof, according to any one of claims 1-3, wherein said topical administration is via endometrial irrigation.
5. N-acetyl-5-methoxy tryptamine or an analogue thereof, according to any one of claims 1-4, wherein said topical administration is carried out in a single administration at the time of oocyte retrieval.
6. N-acetyl-5-methoxy tryptamine or an analogue thereof, according to any one of claims 1-5, wherein said N-acetyl-5-methoxy tryptamine or analogue thereof is present in a concentration ranging from 4×10^{-9} g/ml to 25×10^{-9} g/ml, preferably greater than or equal to 10×10^{-9} g/ml.
7. N-acetyl-5-methoxy tryptamine or an analogue thereof, according to any one of claims 1-6, for use with a contemporaneous systemic administration of N-acetyl-5-methoxy tryptamine, HCG or progesterone, or a combination thereof, from the day of oocyte retrieval.

8. N-acetyl-5-methoxy tryptamine or an analogue thereof, according to any one of the preceding claims, wherein the assisted reproduction techniques are selected from the group consisting of planned copulation; intrauterine insemination (IUI); in vitro fertilization (IVF); intracytoplasmic sperm injection (ICSI), intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) techniques and Tesa-Tese (Testicular Sperm Aspiration-Extraction).

9. Composition suitable for topical administration comprising N-acetyl-5-methoxy tryptamine or an analogue thereof, or a combination thereof as active ingredient, preferably N-acetyl-5-methoxy tryptamine, in an amount effective for the prevention of implantation failure into the uterus in assisted fertilization, together with one or more physiologically acceptable excipients or adjuvants.

10. Composition according to claim 9, wherein said active ingredient is present in a concentration ranging from 4×10^{-9} g/ml to 25×10^{-9} g/ml, preferably greater than or equal to 10×10^{-9} g/ml.

11. Composition according to any one of claims 9-10, wherein said active ingredient is formulated as an endometrial irrigation in a medium for cell culture to a final concentration ranging from 4×10^{-9} g/ml to 25×10^{-9} g/ml, preferably greater than or equal to 10×10^{-9} g/ml.

12. Composition according to claim 11, wherein said culture medium for blastocyst, comprises the following components:

- source of D-glucose;
- Antibiotic, preferably gentamicin;
- Human serum albumin;
- Essential and non-essential amino acids, preferably L-aurine,
- Calcium salts: calcium lactate, calcium pantothenate;

- Sodium salts: sodium chloride, sodium bicarbonate and sodium pyruvate;
- Potassium salts: potassium chloride, potassium phosphate;
- Salts of magnesium: magnesium chloride, magnesium sulfate;
- Water;

and has a pH between 7.5 and 7.8.

13. Composition according to claim 12, wherein said culture medium is the Sydney IVF ® Blastocyst medium.

14. Cell culture medium *in vitro* or *in vivo*, comprising:

- source of D-glucose;
- Antibiotic, preferably gentamicin;
- Human serum albumin;
- Essential and non.essential amino acids, preferably L-aurine,
- Calcium salts: calcium lactate, calcium pantothenate;
- Sodium salts: sodium chloride, sodium bicarbonate and sodium pyruvate;
- Potassium salts: potassium chloride, potassium phosphate;
- Salts of magnesium: magnesium chloride, magnesium sulfate;
- water;

characterized in that it further comprises N-acetyl-5-methoxy tryptamine or an analogue thereof, or a combination thereof, wherein said active ingredient is present in a concentration ranging from 4×10^{-9} g/ml to 25×10^{-9} g/ml, preferably greater than or equal to 10×10^{-9} g/ml.

15. Use of the cell culture medium according to claim 14, for the growth of pinopodes and the obtaining of an *in vitro* model study.

FIG.1

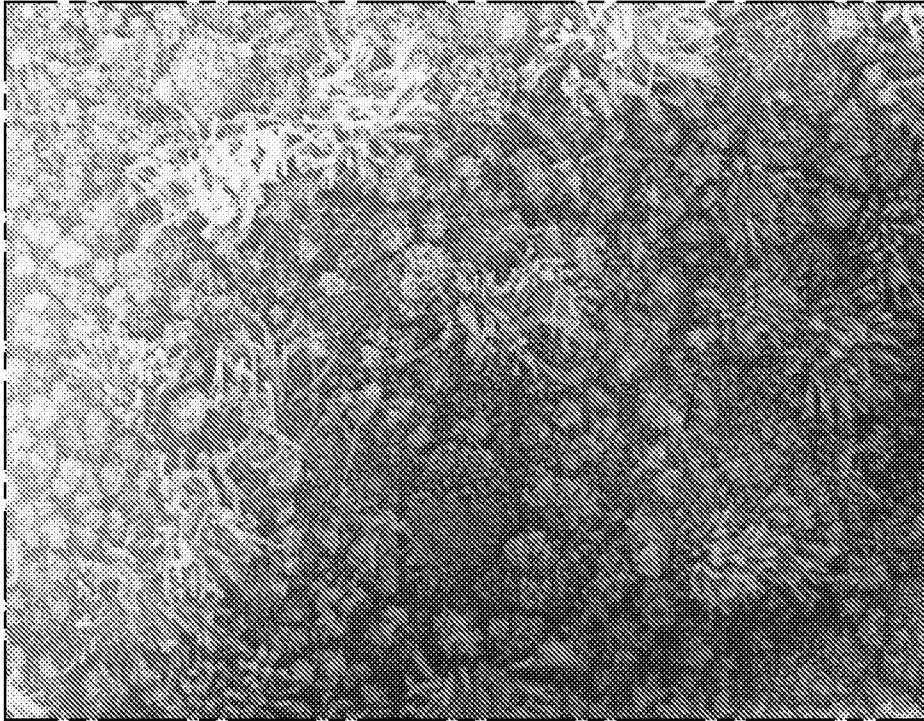


FIG.2

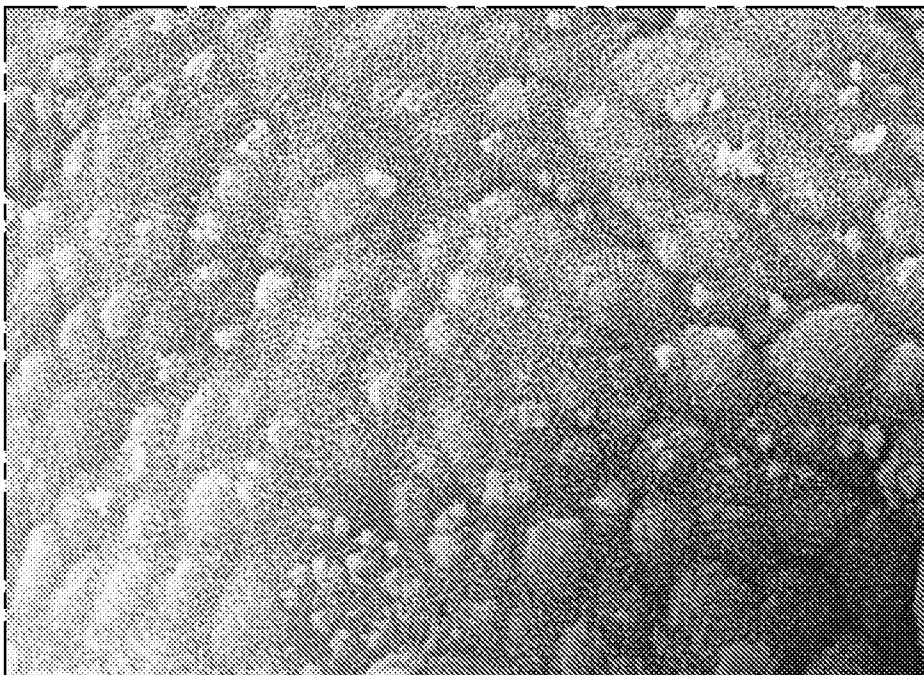


FIG.3

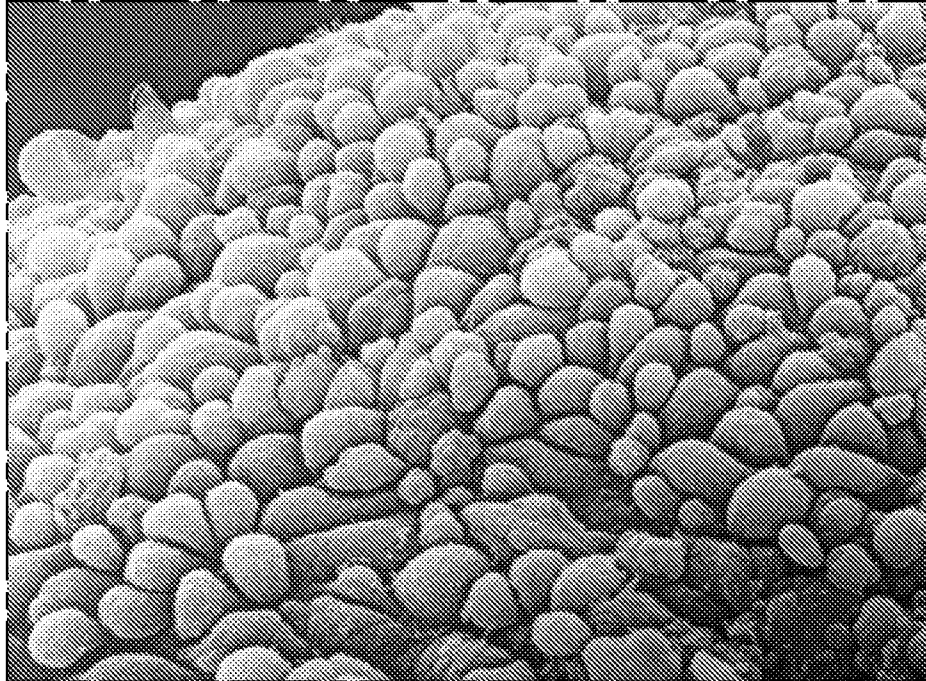


FIG.4

