



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 008**

51 Int. Cl.:

A61K 38/24 (2006.01)

A61K 31/575 (2006.01)

A61P 15/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00906177 .1**

86 Fecha de presentación : **23.02.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1156821**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.11.2001**

54 Título: **Tratamiento de la infertilidad.**

30 Prioridad: **24.02.1999 DK 1999 00256**
23.04.1999 US 130662 P
16.09.1999 DK 1999 01307

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

73 Titular/es: **NOVO NORDISK A/S**
Novo Alle
2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es: **Grondahl, Christian**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de la infertilidad.

5 **Campo de esta invención**

Esta invención se refiere a un método mejorado de fertilización *in vitro* (de ahora en adelante designado IVF).

Antecedentes de esta invención

10

Puesto que el primer embarazo por IVF fue obtenido en 1978, este procedimiento ha dado como resultado miles de embarazos y ha abierto una amplia frontera nueva de investigación y tratamiento para las parejas infértiles. Además, actualmente existe una necesidad significativa de modalidades mejoradas para el tratamiento de la infertilidad. Se considera que aproximadamente una de siete parejas experimenta problemas de subfertilidad o infertilidad.

15

La IVF de ovocitos humanos se ha convertido en un uso común para el tratamiento de la subfertilidad en mujeres y hombres. El tratamiento de IVF estándar incluye una fase larga de estimulación hormonal de la paciente, p. ej. 30 días, que se inicia extrayendo la hormona estimuladora del folículo propia de la paciente (de ahora en adelante designada FSH) y la hormona luteinizante (de ahora en adelante designada LH) mediante la hormona de liberación de gonadotropina (de ahora en adelante designada GnRH), y esto seguido de inyecciones de gonadotropinas exógenas, p. ej. FSH y/o LH, para asegurar el desarrollo de múltiples folículos preovulatorios y la aspiración de múltiples ovocitos madurados *in vivo* inmediatamente antes de la ovulación. El ovocito aspirado es posteriormente fertilizado *in vitro* y cultivado, normalmente durante los tres días anteriores a la transferencia de vuelta al útero en el estadio de 4-8 células. Se han hecho continuos esfuerzos para optimizar y simplificar este procedimiento. Sin embargo, el índice de embarazos global no puede ser significativamente superior a aproximadamente el 20% con las modalidades de tratamiento actuales. En una gran encuesta europea de pacientes de IVF, se descubrió que 7.2 ovocitos de 11.5 ovocitos aspirados por paciente había sufrido una reanudación de la meiosis inmediatamente antes de la fertilización, sólo 4.3 ovocitos fueron fertilizados y sólo 2.2 ovocitos alcanzaron el estadio embrionario de 8 células después de la fertilización y el cultivo *in vitro* (ESHRE, Edimburgo; 1997).

30

Debido a la calidad tan imprevisible de los embriones del estado de la técnica embrionaria actual, más de un embrión tiene que ser transferido sólo para tener una posibilidad razonable de éxito. En consecuencia, es común transferir 2-3 embriones (hasta 5 embriones en algunos países), lo que conlleva el efecto secundario muy extenso de embarazos múltiples suponiendo una incomodidad y riesgo muy grandes tanto para la paciente como para los niños. Además, ha sido estimado que los gastos aumentados para asistencia sanitaria debido a los nacimientos múltiples, (mellizos, trillizos etc.) está superando los gastos de la IVF totales.

35

Por lo tanto, hay varias desventajas en el tratamiento actual, las cuatro más notables siendo:

40

1. El riesgo de hiperestimulación ovárica con la inyección de gonadotropinas que es una condición potencial fatal que requiere hospitalización,

2. Embarazos múltiples (50-1.000 veces la frecuencia normal de mellizos y trillizos, respectivamente),

45

3. La existencia de segmentos de pacientes considerables que no toleran el método actual debido, p. ej. al síndrome del ovario poliquístico y muchas con diabetes, y

4. un riesgo potencial a largo plazo de cáncer.

50

Además, el aumento de peso, la hinchazón, las náuseas, los vómitos, el humor lábil y otras incomodidades de la paciente junto con la resistencia de las pacientes a inyectarse ellas mismas están consideradas como desventajas.

Es sabido a partir de WO 96/00235 que ciertos derivados del esteroide pueden ser usados para regular la meiosis. Un ejemplo de tal esteroide es 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trieno-3 β -ol (de ahora en adelante designado FF-MAS).

55

Aquí, el término compuestos MAS designa compuestos que median la meiosis de los ovocitos. Más específicamente, los compuestos MAS son compuestos que en la prueba descrita en el ejemplo 1 más abajo tienen un porcentaje de ruptura de la vesícula germinal (de ahora en adelante designada GVB) que es significativamente mayor que el control. Los compuestos MAS preferidos son aquellos que tienen un porcentaje de GVB de al menos el 50%, preferiblemente al menos el 80%.

60

Ejemplos de compuestos MAS están mencionados en WO 96/00235, 96/27658, 97/00884, 98/28323, 98/54965 y 98/55498; más específicamente en la reivindicación 1 de los mismos.

65

En WO 95/000265, algunas sustancias reguladoras de la meiosis potenciales fueron evaluadas en ratones hembra. 48 horas antes los animales del test fueron matados por dislocación cervical, se les dio una única inyección de gonadotropina menopáusica humana conteniendo 20 UI de FSH y 20 UI de LH. Los ovarios fueron eliminados, colocados en un medio de hipoxantina y liberados de tejidos extraños. Luego, los ovocitos fueron perforados y se les quitó los

folículos, se liberaron de las células del cúmulo y se cultivaron en un medio conteniendo un derivado regulador de la meiosis.

Actualmente, la maduración *in vitro* en seres humanos ha demostrado ser poco exitosa a pesar del interés sustancial y de los esfuerzos clínicos.

Un objeto de la presente invención es el de tratar la infertilidad humana.

Otro objeto de la presente invención es el de mejorar la maduración de los ovocitos humanos.

Otro objeto de la presente invención es el de mejorar la sincronía de la maduración nuclear, citoplásmica y/o membranosa de sus ovocitos.

Otro objeto de la presente invención es el de mejorar la fertilidad de los ovocitos.

Otro objeto de la presente invención es el de mejorar el nivel de implantación de ovocitos por maduración y fertilización humana *in vitro*.

Otro objeto de la presente invención es el de disminuir la incidencia de preembriones humanos con anomalías cromosómicas (aneuploidía).

Otro objeto de la presente invención es el de mejorar el índice de seccionamiento de preembriones humanos.

Otro objeto de la presente invención es el de mejorar la calidad de los preembriones humanos.

Resumen de esta invención

Se ha encontrado recientemente, de manera sorprendente, que el tratamiento de la IVF y el grado de efectos secundarios pueden ser mejorados sustancialmente si la mujer, durante un periodo consecutivo de 30 días, evita el tratamiento con una hormona hipotalámica y/o una hormona pituitaria o un agonista o antagonista de la misma o un derivado activo de la misma (de ahora en adelante este tratamiento se designará estimulación exógena) o si el tratamiento exógeno de la estimulación de la mujer dura sólo un periodo de tiempo corto, p. ej. menos de 7 días, preferiblemente menos de 4 días. Usando este método mejorado que implica menos o ninguna estimulación exógena, un compuesto MAS se utiliza para madurar y sincronizar activamente los ovocitos humanos *in vitro*, conduciendo a la fertilización y al desarrollo del embrión.

La invención está definida en las reivindicaciones.

Brevemente, la presente invención se refiere a un método para la maduración de los ovocitos humanos *in vitro* en el que el óvulo o los óvulos inmaduro(s) que han sido recuperados de una mujer que, durante un periodo consecutivo de 30 días, ha sido tratada con una hormona hipotalámica y/o una hormona pituitaria o un derivado activo de la misma durante un periodo inferior a aproximadamente 7 días, preferiblemente inferior a aproximadamente 4 días, son madurados *in vitro* de una forma sincronizada usando un compuesto MAS tal y como se define en la presente durante un periodo de tiempo de 22-36 horas y en una dosificación en la gama de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 100 μ M. Las formas de realización preferidas de esta invención son aquellas establecidas en las subreivindicaciones más abajo.

Descripción detallada de esta invención

En referencia al ciclo femenino, una manera de realizar el tratamiento de la IVF de esta invención es la siguiente:

Alrededor de los días 6-9 del ciclo: Estimulación con FSH, p. ej. 75-600 UI al día, preferiblemente 150-225 UI al día, p. ej. durante 3 días.

Alrededor del día 9: los óvulos son recuperados de la mujer usando la aspiración guiada por ultrasonidos de folículos de tamaño pequeño a medio con un diámetro de aproximadamente 6-12 mm, preferiblemente 8-10 mm.

Alrededor del día 9-11: los óvulos son madurados con un compuesto MAS para estimular la meiosis. En esta fase de maduración, la concentración de compuesto MAS puede estar en la gama de aproximadamente 0.1-100 pmol por litro, p. ej. 10-20 μ mol por litro. Este medio puede contener albúmina de suero humano (de ahora en adelante designada HSA), p. ej. 0.8%, y puede además contener un poco de etanol, p. ej.; 0.4%, que ha sido usado para disolver MAS. La duración de esta fase de maduración está en la gama de alrededor de 22-36 horas.

Alrededor de los días 11-13: los óvulos son fertilizados *in vitro*.

Alrededor de los días 12-16: los óvulos son cultivados *in vitro* en un medio adecuado.

A partir de la aspiración de la víspera anterior, la mujer recibirá un estrógeno, p. ej. estrógeno valerato (2 x 10 mg por día). Dos días después, también recibirá un progestógeno, p. ej., *Progestane vagetoria*, a diario, que volverá el revestimiento del útero más propenso a recibir los futuros embriones. La duración de este tratamiento será diseñada individualmente para cada paciente. El médico puede elegir entre una variedad de estrógenos y progestógenos.

Alrededor del día 15-16: uno o más embriones son transferidos al útero de la mujer.

Por lo tanto, al fin y al cabo, el tratamiento completo dura aproximadamente 10-15 días.

Con referencia al ciclo femenino, otra forma de realizar el tratamiento por IVF de esta invención es el siguiente:

Alrededor de los días 2-8 del ciclo: Estimulación con FSH, p. ej. 75-600 UI al día, preferiblemente 150-225 UI al día, p. ej. durante 3 días, finalmente se extenderá hasta 6 días.

Alrededor del día 7-9: los óvulos son recuperados de la mujer usando la aspiración guiada por ultrasonidos de folículos de tamaño pequeño a medio con un diámetro de aproximadamente 6-15 mm, preferiblemente 8-12 mm.

Alrededor del día 7-11: los óvulos son madurados con un compuesto MAS para estimular la meiosis. En esta fase de la maduración, la concentración del compuesto MAS puede estar en la gama de aproximadamente 0.01-100 μmol por litro, p. ej.; 5-20 μmol por litro. Este medio puede contener albúmina de suero humano (de ahora en adelante designada HSA), p. ej. 0.8%, y puede además contener un poco de etanol, p. ej.; 0.1-0.4%, que ha sido usado para disolver MAS. La duración de esta fase de maduración está en la gama de alrededor de 22-36 horas.

Alrededor de los días 9-13: los óvulos son fertilizados *in vitro*.

Alrededor de los días 10-16: los óvulos son cultivados *in vitro* en un medio adecuado.

A partir de la aspiración de la víspera anterior, la mujer recibirá un estrógeno, p. ej. estrógeno valerato (2 x 10 mg por día). Dos días después, también recibirá un progestógeno, p. ej., *Progestane vagetoria*, a diario, que volverá el revestimiento del útero más propenso a recibir los embriones futuros. La duración de este tratamiento será diseñada individualmente para cada paciente. El médico puede elegir entre una variedad de estrógenos y progestógenos.

Alrededor del día 13-16: uno o más embriones son transferidos al útero de la mujer.

Por lo tanto, al fin y al cabo, el tratamiento completo dura aproximadamente 10-15 días.

La mayoría de las fases del tratamiento y procedimiento anteriores se realizan conforme a una manera conocida y las fases restantes son realizadas en cierto modo conocido *per se*. Más detalles sobre la eliminación de los ovocitos de los folículos en el ovario, el cultivo de los ovocitos aislados, el medio de cultivo que debe ser usado, la fertilización con esperma, y la transferencia del embrión a la trompa de Falopio pueden ser encontrados en la bibliografía, por ejemplo, en la especificación de la patente estadounidense n°. 5,693,534.

Según esta invención, el compuesto MAS se añade al medio de cultivo usado. En este medio, la cantidad del compuesto MAS está en la gama de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 100 μM .

El riesgo reducido de efectos secundarios hace que el método según la presente invención sea una alternativa atractiva a los métodos actuales en los que se usa GnRH durante aproximadamente 22 días y se usa FSH durante aproximadamente 9 días antes de que los óvulos sean recuperados y, luego, se usa un progestógeno durante varias semanas. Por lo tanto, en el método según la presente invención, el periodo en el que la paciente es tratada con una hormona hipotalámica y/o una hormona pituitaria se reduce de aproximadamente el 80-90%. El periodo de tratamiento total con los métodos actuales es de aproximadamente 4 semanas. Por lo tanto, usando el método conforme a la presente invención, el periodo total de tratamiento se reduce aproximadamente un 50-60%.

Las hormonas hipotalámicas son hormonas presentes en el hipotálamo humano. Las hormonas pituitarias son hormonas presentes en la glándula pituitaria humana. Las hormonas gonadotrópicas son hormonas segregadas por el lóbulo anterior del pituitario en vértebras y por la placenta mamífera, que controlan la actividad de las gónadas. Químicamente, éstas son glicoproteínas. Ejemplos de hormonas gonadotrópicas son FSH, LH y gonadotropina coriónica, p. ej. la gonadotropina coriónica humana (de ahora en adelante designada hCG). FSH estimula el crecimiento de los folículos ováricos y sus ovocitos en el ovario y la formación de espermatozoides en los testículos. FSH puede, p. ej., ser FSH menopáusica o FSH recombinante. En las mujeres, LH activa el tejido productor de estrógenos de los ovarios para producir progesterona, probablemente promueve las fases finales del desarrollo de los folículos ováricos, inicia la maduración del ovocito final, induce a la ovulación y en los mamíferos inicia el desarrollo del cuerpo lúteo. Estas hormonas son conocidas. Es obvio para el trabajador experto en la técnica que, de forma alternativa, se pueden utilizar agonistas o antagonistas de estas hormonas. Es también obvio para el trabajador experto en la técnica que, de forma alternativa, se pueden usar análogos activos de estas hormonas. Algunos de estos agonistas, antagonistas y análogos son conocidos y otros pueden ser preparados por el proceso conocido *per se*. Ejemplos de procesos de este tipo conocidos son la síntesis química y la ingeniería genética.

ES 2 286 008 T3

En una forma de realización preferida, la presente invención se refiere a un método en el que el periodo en el que dicha mujer ha sido tratada con una hormona hipotalámica y/o una hormona pituitaria o un derivado activo es 0 (cero) días.

5 En una forma de realización adicional preferida, la presente invención se refiere a un método en el que la mujer ha sido tratada de infertilidad, y/o para mejorar la maduración de sus ovocitos, y/o para mejorar la sincronía de la maduración nuclear, citoplásmica y/o membranosa de sus ovocitos, y/o para mejorar la fertilidad de sus ovocitos, y/o para mejorar el nivel de implantación de sus ovocitos por la maduración y fertilización humana *in vitro*.

10 En una forma de realización adicional preferida, la presente invención se refiere a un método en el que el periodo consecutivo fue un ciclo menstrual.

En una forma de realización preferida adicional, la presente invención se refiere a un método donde las hormonas fueron hormonas de liberación gonadotrópica o un agonista o antagonista de las mismas o análogos de las mismas u
15 hormonas gonadotrópicas o un agonista o antagonista de las mismas o análogos de las mismas.

En una forma de realización adicional preferida, la presente invención se refiere a un método donde la hormona gonadotrópica fue FSH o un agonista o antagonista de la misma o análogos de la misma.

20 En una forma de realización adicional preferida, la presente invención se refiere a un método donde el periodo en el que la paciente ha sido tratada con FSH o un agonista o antagonista de la misma o análogos de la misma, antes de la recuperación del óvulo, fue inferior a 7 días, preferiblemente inferior a 4 días, y es al menos 1 día.

En una forma de realización adicional preferida, la presente invención se refiere a un método en el que el periodo en el que la paciente ha sido tratada con FSH o un agonista o antagonista de la misma o análogos de la misma fue 2, 3
25 o 4 días.

En una forma de realización preferida adicional, la presente invención se refiere a un método en el que no se utiliza gonadotropina coriónica, p. ej. gonadotropina coriónica humana o un agonista o antagonista de la misma o análogos de la misma.
30

En una forma de realización preferida adicional, la presente invención se refiere a un método en el que no se utiliza la hormona de liberación gonadotrópica, p. ej. GnRH, o un agonista o antagonista de la misma o análogos de la misma.

35 En una forma de realización preferida adicional, la presente invención se refiere a un método en el que la dosificación del compuesto MAS está en la gama de aproximadamente 0.01 μM por litro hasta aproximadamente 100 μM por litro, preferiblemente en la gama de aproximadamente 0.1 μM por litro hasta aproximadamente 100 μM por litro.

En una forma de realización preferida adicional, la presente invención se refiere a un método en el que el compuesto
40 MAS es uno de los compuestos mencionados en WO 96/00235, 96/27658, 97/00884, 98/28323, 98/54965 y 98/55498; más específicamente los compuestos mencionados en la reivindicación 1 de estos documentos.

En una forma de realización preferida adicional, la presente invención se refiere a un método en el que el compuesto MAS es FF-MAS.
45

Adicionalmente, la presente invención se refiere a un kit farmacéutico en forma de dosificación unitaria para el uso por la fertilización *in vitro* comprendiendo 1-8 dosificaciones unitarias separadas, dicho kit comprendiendo menos de 7, preferiblemente menos de 4, y al menos 1 unidad de dosificación separada para la administración secuencial diaria de una hormona hipotalámica y/o una hormona pituitaria o un derivado activo para la administración secuencial diaria
50 y 1 unidad de dosificación de un compuesto MAS. Este kit puede tener las características preferidas anteriormente descritas.

La presente invención está ilustrada con mayor detalle por los ejemplos siguientes, que, no obstante, no deben ser interpretados como limitadores. Las características descritas en la descripción precedente, en los siguientes ejemplos
55 y en las reivindicaciones pueden, tanto por separado como en cualquier combinación de las mismas, ser sustanciales para realizar la invención en diversas formas de la misma.

Ejemplo 1

60 Método usado para elegir compuestos MAS

Los ovocitos fueron obtenidos de ratones hembra inmaduros (C57BL/6J X DBA/2J F1, Bomholtgaard, Dinamarca) que pesaban 13-16 gramos, que fueron mantenidos bajo temperatura controlada (20-22°C), luz (luces en 06.00-18.00) y humedad relativa (50-70%). Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 0.2 ml de gonadotropinas (Gonal-F, Serono) conteniendo 20 UI de FSH y 48 horas más tarde los animales fueron matados por dislocación cervical. Los
65 óvulos fueron seccionados y los ovocitos fueron aislados en un medio Hx (ver más abajo) bajo un estereomicroscopio por rotura manual de los folículos usando un par de agujas de calibre 27. Los ovocitos esféricos que presentaban una vesícula germinal intacta (de ahora en adelante designada GV) fueron divididos en ovocitos incluidos en el cúmulo

(de ahora en adelante designados CEO) y en ovocitos desnudos (de ahora en adelante designados NO) y colocados en un medio esencial α -mínimo (α -MEM sin ribonucleósidos, Gibco BRL, Cat. N°. 22561) suplementados con 3 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma Cat. No. A-7030); 5 mg/ml de albúmina de suero humano (HSA, Statens Seruminstitut, Dinamarca); 0.23 mM de piruvato (Sigma, Cat. No S-8636); 2 mM de glutamina (Flow Cat. N°. 16-801); 100 IU/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina (Flow, Cat n°. 16-700). Este medio fue suplementado con 3 mM de hipoxantina (Sigma Cat. No. H-9377) y se denominó medio Hx. Los ovocitos fueron enjuagados tres veces en el medio Hx y los ovocitos de tamaño uniforme fueron divididos en grupos de CEO y NO. CEO y NO fueron cultivados en multiplacas de 4 pocillos (Nunc, Dinamarca) en las que cada pocillo contenía 0.4 ml de medio Hx y el compuesto para ser testado en una concentración de 10 μ M. Un pocillo de control (es decir; 35-45 ovocitos cultivados en un medio idéntico sin adición del compuesto de prueba) fue siempre cultivado simultáneamente con 3 pocillos de la prueba (35-45 ovocitos por pocillo suplementados con el compuesto de prueba). Los ovocitos fueron cultivados en una atmósfera humedecida con el 5% de CO₂ en aire durante 24 horas a 37°C. Hacia el final del periodo de cultivo, el número de ovocitos con GV, GVB y cuerpos polares (de ahora en adelante designados PB), respectivamente, fueron contados usando un estereomicroscopio (Wildt, Leica MZ 12). El porcentaje de GVB, definido como porcentaje de ovocitos sometidos a GVB por número total de ovocitos en ese pocillo, fue calculado como:

$$\% \text{ GVB} = ((\text{Número de GVB} + \text{número de PB}) / \text{número total de ovocitos}) \times 100$$

Ejemplo 2

Las pacientes para la fertilización *in vitro* (IVF) normalmente son sometidas a un largo protocolo de gonadotropina (4 semanas) el cual conduce a la aspiración de los ovocitos madurados *in vivo*. Estos ovocitos son posteriormente fertilizados *in vitro* y reemplazados como 4-8 embriones celulares en el útero de la paciente por un catéter cervical.

Maduración *in vitro* con FF-MAS

Procedimiento

Todas las pacientes de IVF pueden de forma potencial recibir este tratamiento, en la gama de edad de 20 a 45 años que presenten o no el síndrome poliquístico ovárico (PCO) y con o sin un ciclo regular. En el caso de un ciclo irregular o amenorrea (sin actividad cíclica) este procedimiento podría ser precedido de un anticonceptivo oral durante varios periodos (1-10 meses) y retirado tras la iniciación del siguiente procedimiento. Al principio (día 1-6, preferiblemente día 3-6) del ciclo (día 1 = primer día de menstruación), la paciente será clínicamente examinada y recibirá o no un pequeño estímulo de FSH individual diseñado para cada paciente (duración: 1-7 días, dosis: 75 UI a 750 UI, preferentemente 3-4 días con dosis de 150 a 300 UI de FSH de base recombinante o urinaria) usando o no un antagonista de GnRH y con o sin hCG. Los folículos de tamaño pequeño a medio (tamaño: folículos de 4 a 16 mm, preferiblemente de 8 a 12 mm) serán aspirados guiados por ultrasonidos usando una presión de succión baja/reducida y unas agujas especialmente diseñadas (más rígidas). Se examinará el fluido aspirado para encontrar los complejos de ovocitos del cúmulo (COC) y una vez identificados bajo el estereomicroscopio (usando o no filtros del embrión), el COC será puesto en cultivo. Se puede utilizar una amplia variedad de medios de cultivo de ovocitos o componentes de los medios conocidos por el trabajador experto, no obstante los ovocitos serán inducidos a reanudar la maduración meiótica por exposición a FF-MAS. La albúmina de suero humano (HSA) puede ser añadida o no al medio. En el caso de ser añadida, puede estar en una concentración de 0.1 a 100 mg/ml, preferentemente de 5 a 15 mg/ml o de 0.5 a 1.5% (volumen/volumen). La formulación de FF-MAS puede estar en forma de una solución madre de etanol, DMSO u otra solución de solvente orgánico o puede estar en forma de pocillos secos revestidos de FF-MAS/HSA preparados para el uso añadiéndose al medio de cultivo apropiado. La duración de la maduración *in vitro* puede variar entre 4 y 60 horas, preferentemente entre 30 y 40 horas. La concentración de FF-MAS puede variar entre 0.01 μ M y 100 μ M, preferiblemente entre 0.1 μ M y 100 μ M, más preferiblemente entre 5 μ M y 30 μ M, incluso más preferiblemente entre 10 μ M y 30 μ M. Después de la maduración *in vitro*, los ovocitos pueden ser fertilizados por IVF convencional o por inyección del esperma intracitoplasmático (de ahora en adelante designado ICSI) o mediante los métodos de fertilización apropiados futuros conduciendo a cigotos fertilizados y el embrión en desarrollo puede ser transferido en el día 1 al día 6 después de la fertilización, preferentemente en el día 2 a 3, bien como una transferencia de un único óvulo o como una transferencia de varios óvulos. La paciente puede recibir progesterona y/o terapia estrogénica antes y después de la transferencia en protocolos individuales diseñados para cebar y mantener el linaje endométrico receptivo apropiado.

En comparación con los procedimientos conocidos, se obtuvieron mejores resultados usando el procedimiento anterior.

Ejemplo 3

Uso de FF-MAS para la maduración *in vitro* de ovocitos humanos

Se comenzó una estimulación ovárica breve en la paciente con FSH recombinante con una dosis diaria de promedio de 225 en el día 2 del ciclo y se continuó hasta un total de tres veces en días alternos, es decir; 2°, 4°, y 6° día del ciclo. Al menos 3 folículos de 10 mm o más en el día 7 conducen a la aspiración de folículos inmaduros de un tamaño entre 8-12 mm. Los folículos fueron aspirados y los ovocitos inmaduros incluidos en el cúmulo (estadio GV)

fueron cultivados en un sistema de cultivo de ovocitos conteniendo un medio de cultivo *in vitro* (IVC) conteniendo un medio de cultivo *in vitro* estándar (IVC) (IVF 20 (que está disponible por Scandinavian IVF Science AB, Gothenburg, Suecia)) conteniendo además albúmina de suero humano (0.8%) y FF-MAS (5 μ M). Todos los ovocitos fueron cultivados en condiciones normales a 37°C en la incubadora. Cada ovocito fue cultivado en un pocillo en un plato de cultivo de cuatro cámaras como sistema del medio de cultivo. La duración de la exposición al medio de cultivo con el tratamiento fue de 30 horas antes de que se realizara ICSI o fertilización *in vitro*. Los preembriones fueron evaluados para el estadio de seccionamiento y la fragmentación / morfología en los días 1, 2 y 3 post ICSI/IVF. Después de 3 días de cultivo, una selección de los mejores preembriones, normalmente dos preembriones, fueron sustituidos en la paciente.

En comparación con los procedimientos conocidos, se obtuvo un resultado clínico similar. No obstante, en este ejemplo, en comparación con los procedimientos conocidos, se utilizó una exposición hormonal reducida y, en consecuencia, se obtuvo un perfil de efectos secundarios reducido.

Ejemplo 4

Usando el procedimiento descrito en el ejemplo 3 con condición de que en vez de que se usara FF-MAS en una concentración de 5 μ M, se usara FF-MAS en una concentración de 20 μ M, se obtuvo un resultado clínico similar en este procedimiento que el que se obtuvo con los procedimientos conocidos. No obstante, en este ejemplo, comparado con los procedimientos conocidos, se usó una exposición hormonal reducida y, consecuentemente, se obtuvo aquí un perfil de efectos secundarios reducido.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la maduración de ovocitos humanos *in vitro* donde el óvulo u óvulos recuperados de una mujer quien, durante un periodo consecutivo de 30 días, ha(n) sido tratado(s) con una hormona hipotalámica y/o una hormona pituitaria o un derivado activo durante un periodo que es inferior a aproximadamente 7 días, preferiblemente inferior a aproximadamente 4 días, ha(n) sido madurado(s) usando un compuesto MAS tal y como se define en la presente durante un periodo temporal de 22-36 horas y en una dosificación en la gama de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 100 μ M.
- 10 2. Método según la reivindicación 1 donde dicha mujer ha sido tratada de infertilidad, y/o para mejorar la maduración de sus ovocitos, y/o para mejorar la sincronía de maduración nuclear, citoplásmica y/o membranosa de sus ovocitos, y/o para mejorar la fertilidad de sus ovocitos, y/o para mejorar el nivel de implantación de sus ovocitos por maduración y fertilización humana *in vitro*.
- 15 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el periodo en el que dicha mujer ha sido tratada con una hormona hipotalámica y/o una hormona pituitaria o un agonista o antagonista de la misma o un derivado activo es 0 (cero) días.
- 20 4. Método según la reivindicación precedente donde el periodo consecutivo fue un ciclo menstrual.
- 5 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde las hormonas son hormonas de liberación gonadotrópica o un agonista o antagonista de las mismas o análogos de las mismas u hormonas gonadotrópicas o un agonista o antagonista de las mismas o análogos de las mismas.
- 25 6. Método según la reivindicación precedente donde la hormona gonadotrópica fue FSH o un agonista o antagonista de la misma o análogos de la misma.
- 30 7. Método según la reivindicación precedente donde el periodo en el que la paciente ha sido tratada con FSH o un agonista o antagonista de la misma o análogos de la misma, antes de la recuperación del óvulo, fue inferior a 7 días, preferiblemente inferior a 4 días, y es al menos de 1 día.
- 35 8. Método según la reivindicación precedente donde el periodo en el que la paciente ha sido tratada con FSH o un agonista o antagonista de la misma o análogos de la misma es de 2, 3 o 4 días.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que no se utilizó gonadotropina coriónica, p. ej. gonadotropina coriónica humana o un agonista o antagonista de la misma o análogos de la misma.
- 40 10. Método según la reivindicación precedente en el que no se utilizó la hormona de liberación de gonadotropina, p. ej. GnRH, o un agonista o antagonista de la misma o análogos de la misma.
11. Método según la reivindicación precedente donde el compuesto MAS es FF-MAS.
- 45 12. Kit farmacéutico en forma de dosificación unitaria para el uso para la fertilización *in vitro* comprendiendo 1-8 dosificaciones unitarias separadas, dicho kit comprendiendo menos de 7, preferiblemente menos de 4, y al menos 1 unidad de dosificación separada para la administración secuencial diaria de una hormona hipotalámica y/o una hormona pituitaria o un derivado activo de la misma para la administración diaria secuencial y 1 unidad de dosificación de un compuesto MAS.