



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 323 693**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/522 (2006.01)

A61K 31/57 (2006.01)

A61K 38/09 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 38/24 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 15/08 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03782745 .8**

(96) Fecha de presentación : **29.12.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1578427**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **28.09.2005**

(54) Título: **Uso de agonistas de GnRH para apoyar la fase luteínica durante el tratamiento de la esterilidad.**

(30) Prioridad: **27.12.2002 FR 02 16810**
21.02.2003 US 448468 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.07.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.07.2009

(73) Titular/es: **PregLem S.A.**
12, chemin des Aulx
1228 Plan-les-Ouates, CH

(72) Inventor/es: **Loumaye, Ernest**

(74) Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

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

Uso de agonistas de GnRH para apoyar la fase luteínica durante el tratamiento de la esterilidad.

5 La presente invención se refiere al uso de un agonista de una hormona hipotalámica para la preparación de un agente farmacéutico para apoyar la fase luteínica durante el tratamiento de la esterilidad de mamíferos hembra y más específicamente de mujeres.

10 El ciclo menstrual de la mujer está compuesto por tres fases distintas (Yen S. y Jaffe R. 1986, Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical Management, W.B. Saunders Company, Filadelfia, PA, EE.UU.):

1. La fase folicular durante la cual se reclutan varios folículos ováricos, seguido por la selección y la dominancia de un folículo. Esta fase dura aproximadamente 12 días y se caracteriza por un aumento progresivo de los niveles de estradiol sérico y bajos niveles de progesterona. Esta fase es el resultado de la secreción de una hormona denominada FSH ("hormona foliculoestimulante") por la hipófisis anterior.
- 15 2. Una fase peri-ovulatoria (también denominada ovulación) que dura aproximadamente 48 horas y que se caracteriza por un súbito aumento de la LH sérica ("hormona luteinizante", otra hormona secretada por la hipófisis). Esta fase finaliza cuando se forma el "cuerpo lúteo". Esta fase incluye la siguiente secuencia de acontecimientos:
 - La maduración folicular final:
 - La esteroidogénesis del folículo cambia desde una secreción preferente de estradiol hasta una secreción preferente de progesterona.
 - El ovocito reanuda su meiosis.
 - La ovulación:
 - El folículo se rompe y el ovocito sale del ovario
 - Formación del cuerpo lúteo
 - El folículo vacío se reorganiza para formar el cuerpo lúteo.
3. La fase luteínica, durante la cual el cuerpo lúteo secreta una gran cantidad de progesterona así como cantidades algo menores de 17 OH-progesterona, estradiol, estrona y relaxina. Esta fase dura aproximadamente 14 días y depende de una secreción apropiada de LH por la hipófisis. Durante la fase luteínica, la progesterona actúa junto con el estradiol sobre las células del endometrio para proporcionar un entorno favorable para la implantación del embrión.

La fase luteínica puede ser deficiente. Esto puede resultar de un déficit de secreción de progesterona por el cuerpo lúteo. En este caso, los niveles de progesterona sérica son inferiores a 10 ng/ml. La deficiencia luteínica también puede resultar de un acortamiento de la fase luteínica (es decir, menos de 11 días). Las consecuencias clínicas de una deficiencia en la fase luteínica son el fallo en la implantación del embrión, o un aborto espontáneo si el embarazo ya se ha iniciado (Yen S. y Jaffe R. 1986, Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical Management, W.B. Saunders Company, Filadelfia, PA, EE.UU.).

Una deficiencia en la fase luteínica es una característica común de los ciclos durante los que se estimula el desarrollo folicular con agentes farmacológicos para el tratamiento de la esterilidad. Esto se ha notificado tanto en pacientes con anovulación que se someten a tratamiento de inducción de la ovulación como en pacientes con ovulación que se someten a estimulación del desarrollo folicular múltiple antes de la inseminación intrauterina (IIU) o antes de técnicas de reproducción asistida (TRA) tales como fecundación *in vitro* (FIV) e inseminación intracitoplasmática (ICSI). La deficiencia en la fase luteínica se ha observado en ciclos estimulados con citrato de clomifeno, FSH/hMG, FSH/hMG con un pretratamiento con agonista de GnRH ("hormona liberadora de gonadotropina") así como FSH/hMG con un tratamiento conjunto con antagonista de GnRH (Beckers NG *et al.* 2003, Comparison of non-supplemented luteal phase characteristics following the administration of r-hCG, r-hLH or GnRH agonist to induce final oocyte maturation in *in vitro* fertilisation patients. J. Clin. Endocrinol. Metab. 88: 4186-4192; Pritts E.A. y Atwood A.K. 2002, Luteal support in infertility treatment: a metaanalysis of the randomized trials. Hum Reprod 17: 2287-2299). La deficiencia en la fase luteínica se atribuye principalmente a los elevados niveles de estradiol sérico resultantes de la estimulación farmacológica de los ovarios. El apoyo farmacológico de la fase luteínica, también denominado "complementación luteínica", es obligatorio en tratamientos de la esterilidad con el fin de aumentar significativamente la tasa de implantación del embrión, la tasa de embarazo y para reducir la tasa de aborto espontáneo (Pritts E.A. y Atwood A.K. 2002, Luteal support in infertility treatment: a meta-analysis of the randomized trials. Hum Reprod 17: 2287-2299).

Se usan de manera rutinaria dos fármacos para el apoyo luteínico. El primero es progesterona natural, el segundo es la gonadotropina coriónica humana (hCG). La progesterona se administra por vía intramuscular (IM) o por vía vaginal. El objetivo terapéutico es aumentar los niveles de progesterona sérica. La HCG se administra por vía intra-

muscular (IM) o por vía subcutánea (SC). La HCG es un agonista de LH que se produce de manera natural y por tanto estimula la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo. En tratamientos de TRA, un apoyo luteínico mediante hCG o progesterona IM aumenta significativamente la tasa de embarazo (Pritts E.A. y Atwood A.K. 2002, Luteal support in infertility treatment: a meta-analysis of the randomized trials. Hum Reprod 17: 2287-2299). Las probabilidades de obtener un embarazo con hCG en comparación con la falta de apoyo luteínico son de 2,72 (IC: 1,56-4,90; $p < 0,05$) y con progesterona IM son de 2,38 (IC: 1,36-4,27; $p < 0,05$). La progesterona administrada por vía vaginal, aunque superior a la falta de apoyo luteínico, no es tan eficaz como la progesterona IM. Con progesterona vaginal, las probabilidades de obtener un embarazo son de 2,11 con un I.C. de 0,95-4,67 (NS). Además, la eficacia relativa de la progesterona IM frente a la progesterona vaginal es de 1,33 con un I.C. de 1,02-1,75, a favor de la vía IM ($p < 0,05$) (Pritts E.A. y Atwood A.K. 2002, Luteal support in infertility treatment: a meta-analysis of the randomized trials. Hum Reprod 17: 2287-2299).

Las desventajas de la progesterona IM son: (i) las inyecciones deben realizarse diariamente durante más de dos semanas, (ii) la disolución de progesterona es oleosa y por tanto las inyecciones son dolorosas, (iii) estas inyecciones pueden desencadenar una reacción inflamatoria e incluso un absceso estéril, (iv) las inyecciones IM no son fáciles de autoadministrarse por la paciente, por tanto requieren a menudo asistencia paramédica.

Las desventajas de hCG como apoyo luteínico son: (i) su uso está asociado a un acontecimiento adverso raro pero potencialmente mortal denominado síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS), (ii) debe inyectarse, (iii) induce un falso positivo en la prueba de embarazo, retrasando el diagnóstico del embarazo, (iv) es un producto biológico extraído de la orina o de medios de cultivo que contienen sueros animales, y por tanto presenta un riesgo, al menos teórico, de contaminación por partículas infecciosas (por ejemplo, virus o priones) (Reichl H *et al.*, 2002 Prion transmission in blood and urines: what are the implications for recombinant and urinary-derived gonadotropins Hum Reprod 17: 2501-2508). Por todos estos motivos, muchos médicos se abstienen de usar hCG como apoyo luteínico.

Por tanto, el objeto de la presente invención es evitar las desventajas mencionadas anteriormente. Esto se ha logrado mediante el uso de un agonista de una hormona hipotalámica, es decir, un agonista de GnRH, para la preparación de una preparación farmacéutica para apoyar la fase luteínica durante el tratamiento de la esterilidad de mamíferos hembra y más específicamente de una mujer.

Según esta invención, el agente farmacéutico es adecuado para apoyar la fase luteínica tras una ovulación espontánea o tras la estimulación del crecimiento folicular, desencadenando la maduración folicular final y la ovulación con uno o más agentes adicionales.

En la descripción detallada de la aplicación de la invención que sigue, las siguientes expresiones corresponden a las siguientes definiciones:

El término “administración” significa dar una medicación a una paciente.

El término “folículo” se refiere a una estructura en el ovario que contiene y nutre al ovocito. El ovocito es el gameto femenino o la célula germinal femenina.

En su fase de desarrollo final, el folículo se convierte en antral. Esto significa que tiene una cavidad llena de líquido. En esta fase de desarrollo, el crecimiento del folículo depende de la secreción de FSH hipofisaria. El crecimiento del folículo puede seguirse midiendo el diámetro de la cavidad con un dispositivo de ultrasonidos. Normalmente, un diámetro del folículo preovulatorio mide entre 16 y 24 mm (Balasch J. 2001. Inducing follicular development in anovulatory patients and normally ovulating women: current concepts and the role of recombinant gonadotropins. En Textbook of Assisted Reproductive Techniques eds D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, Z. Shoham. Martin Dunitz 2001 págs. 425-446).

“Complejo cúmulo-ovocito” se refiere a un ovocito rodeado por una matriz mucinosa. El ovocito se libera del cúmulo tras la ovulación, durante la fecundación. Esto se produce principalmente gracias a una enzima denominada hialuronidasa que se secreta por espermatozoides.

La expresión “fase periovulatoria” incluye los acontecimientos que resultan del brusco aumento de LH sérica a la mitad del ciclo:

- “Maduración folicular final” se refiere a las modificaciones bioquímicas y biológicas que se producen en el folículo y en el complejo ovocito-cúmulo durante el aumento de LH a la mitad del ciclo pero antes de la rotura del folículo y la liberación del ovocito. En resumen, estas modificaciones incluyen: (i) un cambio en la esteroidogénesis de células granulosas que cambia desde una secreción principalmente de estradiol hacia una secreción principalmente de progesterona, (ii) la reanudación de la meiosis del ovocito que transforma el ovocito de una fase de vesícula germinal a una fase en metafase II.
- “Ovulación” se refiere al proceso mediante el cual el ovocito sale del ovario. En primer lugar, el folículo produce una protuberancia en la superficie del ovario, luego se rompe y se expulsa el complejo ovocito-cúmulo con el líquido folicular.

- “Formación del cuerpo lúteo” se refiere a la reorganización del folículo vacío tras la expulsión del complejo ovocito-cúmulo. Las células granulosas y las células tecales (las dos poblaciones celulares principales del folículo) experimentan luteinización y neovascularización para convertirse en un órgano que secreta progesterona.

5

Es de interés que en la jerga médica la palabra “ovulación” se usa a menudo para describir tanto los acontecimientos periovulatorios como la propia ruptura folicular. La expresión “fase luteínica” se refiere a la vida del cuerpo lúteo durante un ciclo espontáneo sin concepción. Su vida es en promedio de 14 días. La fase luteínica comienza el día después del aumento de LH a mitad de ciclo y finaliza el día antes del primer día de menstruación.

10

La expresión “apoyo luteínico” define las intervenciones terapéuticas durante la fase luteínica que pretenden complementar o sustituir la función del cuerpo lúteo para mejorar la implantación del embrión y el desarrollo del embarazo temprano. Actualmente, se usan dos agentes terapéuticos para el apoyo luteínico, es decir, hCG y progesterona natural.

15

La expresión “técnicas de reproducción asistida” (TRA) se refiere a intervenciones médicas que pretenden obtener un embarazo. Estos métodos implican, por definición, la manipulación de los gametos masculinos (los espermatozoides) y/o el gameto femenino (el ovocito). En los métodos de TRA usados más a menudo, se estimula en primer lugar el crecimiento folicular con uno o varios agentes farmacéuticos. A esto le siguen métodos para facilitar la fecundación tales como inseminación intrauterina (IIU) o fecundación *in vitro* (FIV). La IIU consiste en introducir una suspensión de espermatozoides en la cavidad uterina usando un catéter fino. La FIV consiste en primer lugar en recuperar los ovocitos del ovario usando una aguja de aspiración ecoguiada transvaginal. Luego, los ovocitos se incuban conjuntamente con espermatozoides *in vitro* para obtener una fecundación natural. La ICSI, que es una variación del método de FIV, es idéntica a la FIV excepto porque se obtiene la fecundación microinyectando un espermatozoide directamente en el citoplasma del ovocito. Los embriones que resultan de la FIV y la ICSI se mantienen en medio de cultivo durante algunos días antes de implantarlos en el útero de la paciente o de congelarlos para una implantación posterior.

25

La expresión “hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)” se refiere a una hormona peptídica secretada por una zona específica del cerebro denominada hipotálamo. Este decapeptido desempeña un papel central en los mecanismos de reproducción en muchas especies y específicamente en seres humanos. La GnRH actúa sobre una población celular específica en la hipófisis anterior en la que se une a un receptor de membrana específico. Activa este receptor provocando una secreción inmediata de LH y FSH en el torrente sanguíneo.

30

La expresión “agonista de GnRH” se refiere a análogos sintéticos o naturales de la GnRH nativa que tienen la capacidad de reconocer y activar receptores de GnRH. El agonista de GnRH para el apoyo de la fase luteínica se selecciona entre el grupo que consiste en busarelina, nafarelina, triptorelina, leuprorelina, goserelina, deslorelina e histrelina.

35

La expresión “hormona foliculoestimulante (FSH)” se refiere a una hormona hipofisaria que estimula el crecimiento del folículo ovárico. La FSH es parte de una familia de hormonas denominada las gonadotropinas. Se obtienen preparaciones terapéuticas de FSH humana mediante extracción a partir de líquidos biológicos ricos en FSH tales como la orina de mujeres postmenopáusicas. También puede extraerse FSH a partir de medio de cultivo en el que células modificadas genéticamente producen FSH humana (por ejemplo, recombinación de ADN de células CHO; Loumaye E., Howles C. 1999 Superovulation of Assisted Conception: The new Gonadotrophins. En Textbook of *In Vitro* Fertilization and Assisted Reproduction. P. Brinsden Eds, Parthenon Publishing). Para la presente invención, el término FSH se refiere a una mezcla de varias isoformas de FSH, así como a una isoforma de FSH específica que puede producirse de manera natural u obtenerse mediante un procedimiento técnico. El término FSH se refiere también a moléculas híbridas o moléculas químicas, a péptidos y peptidomiméticos que presentan actividad de FSH o bien mediante activación del receptor de FSH o bien mediante interacción bioquímica al nivel posterior al receptor en células diana de FSH.

50

El término FSH incluye también preparaciones terapéuticas tales como hMG (gonadotropinas menopáusicas humanas) o preparaciones de FSH recombinante en las que se añade una pequeña cantidad de LH y/o hCG.

55

La expresión “moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM)” se refiere a todos los compuestos químicos o polipeptídicos que actúan total o parcialmente como activadores de los receptores de estrógenos, en particular a niveles hipotalámicos e hipofisarios. Los ejemplos de SERM incluyen clomifén/clomifeno, tamoxifén/tamoxifeno y raloxifén/raloxifeno.

60

La expresión “inhibidor de aromatasas” se refiere a todos los compuestos químicos, esteroideos y polipeptídicos que bloquean la actividad de una enzima denominada aromatasas. Esta enzima cataliza la conversión de andrógenos en estrógenos. Los ejemplos de inhibidores de aromatasas incluyen anastrozol, letrozol y exemestano.

65

La expresión “inhibidores de fosfodiesterasa” se refiere a todos los compuestos químicos que bloquean o inhiben las fosfodiesterasas. Las fosfodiesterasas son enzimas que inactivan nucleótidos cíclicos tales como AMP cíclico y GMP cíclico. La inhibición de esta actividad da como resultado la acumulación de estos nucleótidos cíclicos prolongando en el tejido diana la señal inducida por la FSH o LH. Un ejemplo de inhibidor de fosfodiesterasa es la teofilina.

La GnRH es un neuropéptido que estimula la secreción de LH y FSH por la hipófisis. En seres humanos, su composición de aminoácidos es <Glu¹-His²-Trp³-Ser⁴-Tyr⁵-His⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-Gly¹⁰-NH₂. En mujeres tras la pubertad, la liberación pulsátil de GnRH por el hipotálamo desempeña un papel clave en la fecundidad induciendo la secreción de gonadotropinas (FSH y LH) que da como resultado el ciclo menstrual. Los estados asociados a la deficiencia en la secreción de GnRH (anovulación del grupo I de la OMS: por ejemplo síndrome de Kallmann y amenorrea relacionada con pérdida de peso) se caracterizan por tanto por la ausencia de ovulación, ausencia de menstruación espontánea (amenorrea) y esterilidad. Este estado se ha tratado de manera satisfactoria mediante la administración de GnRH sintética, nativa (Shoham Z. *et al.* 1990; Induction of ovulation with pulsatile GnRH. *Baillière's Clin Obstet Gynaecol.* 4: 589-608). Con el fin de que sea eficaz, la administración de GnRH tiene que ser pulsátil, a una frecuencia de un pulso cada 60 a 90 minutos al comienzo de la fase folicular y aproximadamente un pulso cada 2 a 4 horas durante la fase luteínica (Hanker J.P. *et al.*; 1984, Frequency-varied versus unvaried pulsatile LH-RH substitution in hypothalamic amenorrhea). Además, se administra por vía intravenosa o por vía subcutánea, lo que impone a las pacientes llevar una bomba portátil durante varias semanas. Además de la carga de llevar esta bomba, no son raros acontecimientos adversos tales como flebitis, septicemia y absceso en el sitio de inyección (Molloy B.G. *et al.* 1985; Ovulation induction in clomiphene nonresponsive patients: the place of pulsatile gonadotrophin-releasing hormone in clinical practice. *Fertil. Steril.* 43: 26-33). Un estudio ha evaluado la administración nasal de GnRH nativa para mantener la fase luteínica tras inducir desarrollo folicular y ovulación mediante la administración intravenosa de GnRH nativa. Se administró de nuevo GnRH cada 4 horas para imitar el patrón secretor de GnRH endógeno. En la mitad de las pacientes, esto fue completamente ineficaz para apoyar la fase luteínica, y se encontró que la eficacia era sumamente dependiente de la frecuencia de pulsos de la fase folicular (Hanker J.P. *et al.*; 1984, Frequency-varied versus unvaried pulsatile LH-RH substitution in hypothalamic amenorrhea. *Europ. J. Obstet. Reprod. Biol.* 17: 103-119). También se ha intentado administrar frecuentemente GnRH nativa mediante las vías intravenosa y subcutánea en pacientes con secreción de GnRH disfuncional, pero con muy baja eficacia y resultado adverso similar (Molloy B.G. *et al.* 1985; Ovulation induction in clomiphene nonresponsive patients: the place of pulsatile gonadotrophin-releasing hormone in clinical practice. *Fertil. Steril.* 43: 26-33).

Se han sintetizado análogos derivados de la estructura de GnRH nativa y se han seleccionado para una actividad agonista que está potenciada en comparación con el péptido nativo. Este aumento de actividad se debe principalmente a una resistencia potenciada frente a la degradación y una afinidad superior por el receptor de GnRH hipofisario (Loumaye E *et al.*, 1982, Binding affinity and biological activity of gonadotropin releasing hormone agonists in isolated pituitary cells. *Endocrinology*; 111:730-736). Aunque inicialmente diseñados como posibles sustitutos de la GnRH nativa para estimular funciones gonadales, se encontró que estos agonistas inducían el efecto opuesto mediante la desensibilización rápida de las células hipofisarias. Por este motivo, en la práctica clínica, se usan para reducir la secreción de LH y FSH y suprimir funciones gonadales tanto en hombres como en mujeres. Las principales indicaciones terapéuticas de estos agonistas son el cáncer de próstata, la endometriosis y la prevención del aumento prematuro de LH durante la estimulación del desarrollo folicular antes de TRA (Loumaye E. 1990 The control of endogenous secretion of LH by gonadotrophin-releasing hormone agonists during ovarian hyperstimulation for *in-vitro* fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod.* 5:357-76).

Al contrario que con el uso común de agonistas de GnRH para inhibir la secreción de LH y FSH, el uso terapéutico de su propiedad agonista (para estimular la secreción de LH y FSH) ha sido muy limitado por lo que se sabe.

En los tratamientos de la esterilidad femenina, se ha usado la capacidad de estas sustancias para estimular la secreción de LH para desencadenar la ovulación a la mitad del ciclo (Lanzone, A *et al.*, 1989 LH surge induction by GnRH agonist at the time of ovulation. *Gynecol Endocrinol* 3: 213-220; Buckett W.M. *et al.*, 1998, Induction of the endogenous gonadotrophin surge for oocyte maturation with intra-nasal GnRH analogue (buserelina): effective minimal dose. *Hum Reprod* 13: 811-814, 1998; Fauser BC *et al.*, 2002, Endocrine profile after triggering of final oocyte maturation with GnRH agonist after co-treatment with the GnRH antagonist Ganirelix during ovarian hyperstimulation for *in vitro* fertilisation. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 709-715). Sin embargo, en este caso, se encontró también que la fase luteínica era deficiente y la tasa de embarazo era baja (Fauser BC *et al.*, 2002, Endocrine profile after triggering of final oocyte maturation with GnRH agonist after co-treatment with the GnRH antagonist Ganirelix during ovarian hyperstimulation for *in vitro* fertilisation. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 709-715; Beckers *et al.*, 2003, Comparison of non-supplemented luteal phase characteristics following the administration of r-hCG, r-hLH or GnRH agonist to induce final oocyte maturation in *in vitro* fertilisation patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 4186-4192).

Sólo se ha notificado en la bibliografía médica un intento de usar agonista de GnRH durante la fase luteínica (Schmidt-Sarosi C. *et al.*, 1995, Ovulation triggering in clomiphene citrate-stimulated cycles: human chorionic gonadotropin versus a gonadotropin releasing hormone agonist. *J Ass. Reprod. & Genetics.* 12: 167-174). Sin embargo, este intento falló tal como se indica en el informe por los niveles de progesterona sérica anómalamente bajos, un déficit de progesterona a nivel del endometrio y una baja tasa de embarazo. Es de interés que también se ha notificado una reducción de los niveles de progesterona y de la duración de la fase luteínica tras sólo una o dos administraciones de un agonista de GnRH durante la fase luteínica de ciclos espontáneos (Lemay *et al.*, 1982, Sensitivity of pituitary and corpus luteum responses to single intranasal administration of buserelina in normal women. *Fertil Steril* 37: 193-200; Lemay *et al.*, 1983, Gonadotroph and corpus luteum responses to two successive intranasal doses of a luteinising hormone-releasing hormone agonist at different days after the mid-cycle luteinising hormone surge, *Fertil Steril* 39: 661-667). En esta segunda publicación, Lemay *et al.* han mostrado que la administración de un agonista de GnRH altera la función luteínica y podría conducir a un nuevo enfoque de interceptivos postcoitales.

Por tanto, todas las pruebas actualmente disponibles apuntan hacia un efecto negativo de los agonistas de GnRH sobre la función luteínica y en ningún caso a ningún efecto de apoyo. Por tanto, hasta la fecha, los expertos en la técnica consideran los agonistas de GnRH y se usan esencialmente como agente terapéutico para inhibir la secreción de LH y FSH a través de un mecanismo de desensibilización, en vez de estimular su secreción. Esto se ha mostrado en la solicitud de patente internacional WO95/16459 que da a conocer la administración a reses hembra de un análogo de LHRH para desensibilizar la hipófisis frente a la actividad de LHRH endógena.

De manera sorprendente, el solicitante ha mostrado que el uso de un agonista de GnRH según la invención en la preparación de un agente farmacéutico para el apoyo de la fase luteínica es completamente posible y conlleva ventajas significativas en comparación con agentes usados actualmente en esta indicación.

Pueden usarse agonistas de GnRH para el apoyo luteínico o bien tras una ovulación espontánea o bien tras la estimulación del crecimiento folicular y la inducción de la maduración folicular final y la ovulación con uno o varios agentes adicionales. En el último caso, el agente adicional que desencadena la maduración folicular final y la ovulación también puede seleccionarse entre agonistas de GnRH; puede usarse otro agonista o preferiblemente el mismo agonista que el usado para apoyar la fase luteínica. En algunas circunstancias, puede producirse un aumento de LH prematuro durante la fase de crecimiento del folículo. Esto tiene un efecto perjudicial sobre la viabilidad del ovocito y puede desencadenar incluso una ovulación prematura, dando como resultado la cancelación del ciclo de tratamiento. Con el fin de prevenir tal aumento de LH prematuro, se puede usar el agente farmacéutico adecuado para el apoyo de la fase luteínica tras la administración de un antagonista de GnRH que se administra durante los últimos días de estimulación del crecimiento del folículo (van Loenen AC *et al.*, 2002; GnRH agonists, antagonists and assisted conception. *Semin. Reprod. Med.* 20: 349-364). La administración del antagonista de GnRH se inicia normalmente o bien en un día de estimulación fijo (por ejemplo, 1 ó 6) o bien tan pronto como los folículos alcancen un diámetro medio de aproximadamente 12 a 14 mm (Kolibianakis EM *et al.*, 2003; Initiation of GnRH antagonist on day 1 as compared to day 6 of stimulation: effect on hormonal levels and follicular development in *in vitro* fertilization. *J. Clin Endocrinol Metab.* 88: 5632-5637). El antagonista de GnRH puede ser cetrorelix, ganirelix o antida administrado diariamente a una dosis de 0,1 a 1 mg/día hasta e incluyendo el día en el que se desencadena la ovulación, o como una única administración de 1 a 10 mg. El antagonista de GnRH puede ser también un antagonista no peptídico tal como TAK-013 (Takahito H. *et al.* 2003. Suppression of a Pituitary-Ovarian Axis by Chronic Oral Administration of a Novel Nonpeptide Gonadotropin-Releasing Hormone Antagonist, TAK-013, in Cynomolgus Monkeys *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003 88: 1697-1704. Sasaki S, *et al.* 2003 Discovery of a thieno[2,3-d]pyrimidine-2,4-dione bearing a p-methoxyureidophenyl moiety at the 6-position: a highly potent and orally bioavailable non-peptide antagonist for the human luteinizing hormone-releasing hormone receptor. *J Med Chem.* 2 de enero de 2003; 46(1):113-24).

Aunque la mayoría de las pacientes tienen un apoyo luteínico adecuado cuando reciben un agonista de GnRH según la presente invención, una minoría pueden tener todavía bajos niveles de progesterona sérica, por ejemplo inferiores a 10 ng/ml o una fase luteínica corta, por ejemplo inferior a 11 días. En este caso, se recomienda añadir al agonista de GnRH de la presente invención otro apoyo luteínico tal como progesterona natural, o un progestágeno, o hCG, o LH, o una o más isoformas de LH o de hCG, o un peptidomimético de LH o de hCG, o un análogo de LH o de hCG con una farmacocinética modificada, o un inhibidor de fosfodiesterasa, un modulador no peptídico del AMP cíclico o una combinación de dos o más de estos agentes.

Sin embargo, la combinación de uno o más de estos agentes farmacéuticos se realizará a menores dosis que las usadas cuando el agente se usa solo para apoyar la fase luteínica.

Según una aplicación específica de la presente invención, se estimula el crecimiento folicular con un agente foliculoestimulante empezando al comienzo de un ciclo espontáneo o tras la inducción de la menstruación con una píldora anticonceptiva o un progestágeno. Se seleccionarán agentes que estimulan el crecimiento folicular entre hMG, FSH derivada de la orina, FSH recombinante, una o más isoformas de FSH, miméticos de FSH, análogos de FSH con una farmacocinética modificada (por ejemplo, moléculas quiméricas), SERM, inhibidores de aromatasa, inhibidores de fosfodiesterasa o una combinación de dos o más de estos agentes.

Por ejemplo, se seleccionan SERM entre clomifén/clomifeno, tamoxifén/tamoxifeno o raloxifén/raloxifeno o una combinación de dos o más de estos agentes, mientras que pueden seleccionarse inhibidores de aromatasa entre anastrozol, letrozol o exemestano o una combinación de dos o más de estos agentes.

Igualmente, según la aplicación de esta invención, el uso de un inhibidor de fosfodiesterasa tal como teofilina, como agente que estimula el crecimiento folicular, permitirá prolongar el efecto ovárico de la FSH endógena y/o exógena impidiendo el catabolismo (es decir, la destrucción) de un segundo mensajero de la FSH, concretamente el AMP cíclico. A esta estimulación folicular le puede seguir el desencadenamiento de la maduración folicular final y la ovulación con uno o más de los siguientes agentes: hCG, o LH, o una o más isoformas de LH o de hCG, o un peptidomimético (análogo no peptídico) de LH o de hCG, o un análogo de LH o de hCG con una farmacocinética modificada, o un inhibidor de fosfodiesterasa o una combinación de dos o más de estos agentes.

Según otra aplicación de la presente invención, a la estimulación del crecimiento folicular y la inducción de la ovulación les sigue un procedimiento de recuperación de ovocitos o de IIU. Los ovocitos se usarán para maduración *in vitro*, fecundación *in vitro* para su transferencia posterior al útero para una inseminación. Son aceptables todos los métodos de inseminación y la selección de un método es una decisión médica. Se recomiendan actos sexuales e IIU

el día tras desencadenarse la ovulación, y se repetirán finalmente el día después. Para la FIV e ICSI, la recuperación de los ovocitos debe realizarse en el plazo de un tiempo muy preciso, es decir, de 34 a 40 horas tras desencadenarse la maduración folicular final. Para recuperar los ovocitos, se aspira el líquido folicular usando una aguja guiada con ultrasonidos. El líquido aspirado se examina bajo un microscopio binocular para identificar complejos cúmulo-ovocito. Se transfieren esos complejos a un medio de cultivo apropiado y se conservan en un incubador manteniendo condiciones de temperatura, humedad y gas bien definidas y adecuadas.

Según la presente invención, el apoyo de la fase luteínica proporcionado por el agonista de GnRH tal como se definió anteriormente puede estar asociado a un agente adicional implicado en la implantación del embrión. De hecho, si la implantación del embrión requiere un endometrio preparado con un apoyo luteínico adecuado, también se sabe que otros factores tales como citocinas desempeñan un papel crítico en este proceso (Lessey BA. The role of the endometrium during embryo implantation. Hum Reprod 2000; supl. 15 6:39-50). Un ejemplo específico es el papel crítico desempeñado por el factor inhibidor de la leucemia (LIF) en la implantación del embrión (Stewart CL *et al.* Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. Nature 1992; 359:76-9). En pacientes que tienen problemas de implantación relacionados con una deficiencia en LIF relativa o absoluta, se recomienda añadir al agonista de GnRH para el apoyo luteínico tal como se describe en la presente invención, LIF natural o nativo, o LIF recombinante, o un análogo de LIF de agonista peptídico o no peptídico y/u otra citocina implicada en mecanismos de implantación del embrión.

El agente farmacéutico que contiene el agonista de GnRH usado para el apoyo de la fase luteínica para el tratamiento de la esterilidad de mamíferos hembra, más específicamente de una mujer, puede estar en una variedad de formulaciones bien conocidas y se administra por vía intranasal.

En casos en los que el agonista de GnRH se incluye en una suspensión, la formulación puede contener agentes de suspensión, como por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de polioxietilensorbitol y sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de estas sustancias, entre otras. Formulaciones intranasales útiles de un agonista de GnRH pueden contener estabilizadores y tensioactivos. Entre los tensioactivos farmacéuticamente aceptables están derivados de aceite de ricino polioxietilenado, tales como triricinoleato de polioxietilen-glicerol, también conocido como aceite de ricino polioxil 35 (CREMOPHOR EL), o aceite de ricino hidrogenado polioxil 40 (CREMOPHOR RH40) ambos disponibles de BASF Corp.; monoésteres de ácidos grasos de polioxietilen (20) sorbitano, tales como monolaurato de polioxietilen (20) sorbitano (TWEEN 80), monoestearato de polioxietilen (20) sorbitano (TWEEN 60), monopalmitato de polioxietilen (20) sorbitano (TWEEN 40), o monolaurato de polioxietilen 20 sorbitano (TWEEN 20) (todos disponibles de ICI Surfactants de Wilmington, Del.); ésteres de poliglicerilo, tales como oleato de poliglicerilo; y aceite de palmiste polioxietilado (LABRAFIL, disponible de Gattefosse Corp.). Preferiblemente, el tensioactivo será entre aproximadamente el 0,01% y el 10% en peso de la composición farmacéutica. Entre los estabilizadores útiles farmacéuticamente están antioxidantes tales como sulfito de sodio, metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, formaldehído sulfoxilato sódico, dióxido de azufre, ácido ascórbico, ácido isoascórbico, tioglicerol, ácido tioglicólico, clorhidrato de cisteína, acetilcisteína, palmitato de ascorbilo, hidroquinona, galato de propilo, ácido nordihidroguayarático, hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado, alfa-tocoferol y lecitina. Preferiblemente, el estabilizador será entre aproximadamente el 0,01% y el 5% en peso de la composición farmacéutica. Las suspensiones también pueden incluir agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetracético, sus derivados y sales del mismo, dihidroxietilglicina, ácido cítrico y ácido tartárico entre otros. Adicionalmente, puede mantenerse una fluidez apropiada de una suspensión, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos, tales como los mencionados anteriormente.

Esta invención también prevé el uso de agonistas de GnRH en forma de sal farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de tales sales pueden incluir sales de sodio, potasio, calcio, aluminio, oro y plata. También se contemplan sales formadas con aminas farmacéuticamente aceptables tales como amoniaco, alquilaminas, hidroxialquilaminas, N-metilglucamina y similares. Ciertos compuestos básicos también forman sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de adición de ácido. Por ejemplo, átomos de pirido-nitrógeno pueden formar sales con un ácido fuerte, mientras que compuestos que tienen sustituyentes básicos tales como grupos amino forman también sales con ácido más débiles. Ejemplos de ácido adecuados para la formación de sales son ácido clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, cítrico, oxálico, malónico, salicílico, málico, fumárico, succínico, ascórbico, maleico, pamoico, metanosulfónico y otros ácidos minerales y carboxílicos bien conocidos por los expertos en la técnica. Las sales se preparan poniendo en contacto la forma de base libre con una cantidad suficiente del ácido deseado para producir una sal de la manera convencional. Las formas de base libre pueden regenerarse tratando la sal con una disolución de base acuosa diluida adecuada tal como bicarbonato de sodio, amoniaco, carbonato de potasio y NaOH acuoso diluido. Las formas de base libre difieren de sus formas de sal respectivas un tanto en ciertas propiedades físicas, tales como solubilidad en disolventes polares, pero las sales de ácido y base son por lo demás equivalentes a sus formas de base libre respectivas para los fines de la invención. Se pretende que todas las sales de ácido y base de este tipo sean sales farmacéuticamente aceptables dentro del alcance de la invención y todas las sales de ácido y base se consideran equivalentes a las formas libres de los compuestos correspondientes para los fines de la invención.

El agonista de GnRH puede seleccionarse entre una GnRH nativa de mamíferos o cualquier otra especie animal, o un agonista peptídico sintético, o recombinante, de GnRH, o una molécula quimérica de GnRH. La última molécula puede incluir una parte funcional, peptídica o no peptídica, de GnRH y se obtendrá por métodos de biología molecular conocidos por los expertos en la técnica. El agonista de GnRH tendrá preferiblemente una alta afinidad por el receptor

de GnRH (por ejemplo, una K_d entre 10^{-13} M y 10^{-6} M; prueba de afinidad de unión de GnRH) (Loumaye E. *et al.* 1982; Binding affinity and biological activity of gonadotropin releasing hormone agonists in isolated pituitary cells. *Endocrinology*. 111: 730-736). Además, será sumamente potente para estimular la liberación de LH por la hipófisis, lo que puede documentarse en un bioensayo *in vitro* usando células hipofisarias de rata (por ejemplo, ED_{50} entre 10^{-13} M y 10^{-6} M; prueba de bioensayo de GnRH) (Loumaye E. *et al.*, 1892. Binding affinity and biological activity of gonadotropin releasing hormone agonists in isolated pituitary cells. *Endocrinology*. 111:730-736). Los agonistas de GnRH para el apoyo de la fase luteínica que pueden usarse según esta invención se conocen bien y se seleccionan del grupo que consiste en busarelín/buserelina ($<Glu^1-His^2-Trp^3-Ser^4-Tyr^5-D-Ser(t-But)^6-Leu^7-Arg^8-Pro^9-EA$), leuprolélin/leuprorelina ($<Glu^1-His^2-Trp^3-Ser^4-Tyr^5-D-Leu^6-Leu^7-Arg^8-Pro^9-EA$), triptorelín/triptorelina ($<Glu^1-His^2-Trp^3-Ser^4-Tyr^5-D-Trp^6-Leu^7-Arg^8-Pro^9-Gly^{10}-NH_2$), goserelín/goserelina ($<Glu^1-His^2-Trp^3-Ser^4-Tyr^5-D-Ser(t-But)^6-Leu^7-Arg^8-Pro^9-AZA-Gly^{10}-NH_2$), y nafarelina ($<Glu^1-His^2-Trp^3-Ser^4-Tyr^5-D-Nal-(2)^6-Leu^7-Arg^8-Pro^9-Gly^{10}-NH_2$), deslorelin/deslorelina e histrelina. La mayoría de estos agonistas están comercialmente disponibles mientras que los otros se conocen de la bibliografía. Más específicamente, el agonista de GnRH se seleccionará entre un grupo de sustancias que consiste en busarelín/buserelina, nafarelín/nafarelina, triptorelín/triptorelina, leuprolélin/leuprorelina, goserelín/goserelina, deslorelin/deslorelina e histrelín/histrelina, una combinación de dos o más de estos agonistas.

Todos estos agonistas de GnRH para el apoyo de la fase luteínica tienen en común que tienen una farmacocinética modificada en comparación con GnRH nativa (natural). Esto da como resultado una biodisponibilidad superior de estos agonistas de GnRH debido a que se mantienen disponibles para los receptores hipofisarios durante un periodo prolongado tras su administración.

El agente farmacéutico que contiene el agonista de GnRH usado para el apoyo de la fase luteínica para el tratamiento de la esterilidad se administrará en el plazo de los tres primeros días tras desencadenarse la ovulación hasta el momento en el que el embarazo está bien establecido. Preferiblemente, la administración empezará tan pronto como el primer día tras desencadenarse la ovulación. La dosis de agonista es variable y dependerá esencialmente del agonista usado, sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas, así como su modo de administración. Según esta invención, el agonista de GnRH preferido usado será la buserelina, la vía de administración será la intranasal, en una o varias dosis diarias de entre 50 y 400 μg , preferiblemente 100 μg .

La frecuencia de administración del agonista de GnRH también es crítica y debe definirse para cada agonista con respecto a sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas así como su formulación. Según el uso preferido, el agente farmacéutico que contiene buserelina que va a usarse para apoyar la fase luteínica durante el tratamiento de la esterilidad, se administrará a una frecuencia de entre dos veces al día (en promedio en un intervalo de 12 horas) y una administración cada día, pero preferiblemente una administración cada día (aproximadamente, una vez cada 24 horas). El periodo de administración total del agonista de GnRH debe cubrir al menos el periodo pre, peri y postimplantación temprano del embrión. Tras la implantación, el embrión garantizará de hecho progresivamente su propio apoyo luteínico a través de la secreción de hCG por células trofoblásticas. Prácticamente, esto significa una duración de la administración del agonista de entre 7 y 28 días. Preferiblemente, la duración total de la administración de buserelina será de 14 días.

La estimulación del crecimiento folicular con FSH o compuestos derivados debe durar en promedio 10 días. La respuesta ovárica a la estimulación se monitoriza midiendo, con ultrasonidos, el número y el diámetro de todos los folículos en crecimiento. Un método adicional para esta monitorización es medir los niveles de estradiol sérico (Shoham, 2001, Drug used for controlled ovarian stimulation: clomiphene citrate and gonadotropins. En *Textbook of Assisted Reproductive Techniques* eds D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, Z. Shoham. Martin Dunitz 2001. págs. 413-424; Balasch, 2001, Inducing follicular development in anovulatory patients and normally ovulating women: current concepts and the role of recombinant gonadotropins. En *Textbook of Assisted Reproductive Techniques* eds D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, Z. Shoham. Martin Dunitz 2001 págs. 425-446).

Para agentes que estimulan la FSH endógena, tales como SERM e inhibidores de aromatasa, se administran habitualmente por vía oral durante un periodo de entre uno y siete días empezando al comienzo de un ciclo menstrual (Fisher *et al.* 2002, A randomized double-blind comparison of the effects of clomiphene citrate and the aromatase inhibitor letrozole on ovulatory function in normal women. *Fertil Steril* 78: 280-285). Una tercera posibilidad es usar inhibidores de fosfodiesterasa que aumentarán y prolongarán el efecto ovárico de la FSH endógena y/o exógena impidiendo el catabolismo (inactivación y destrucción) de un segundo mensajero de la FSH, es decir, el AMP cíclico.

Cuando se selecciona un agonista de GnRH para desencadenar la maduración folicular final, será preferiblemente el mismo que el agonista usado para el apoyo de la fase luteínica. Según la presente invención, se prefiere usar buserelina como agonista de GnRH y el modo preferido de administración será una única administración intranasal, a una dosis de entre 50 y 600 μg , siendo la dosis preferida de 200 μg . Una variación de la presente invención también prevé una preparación farmacéutica adecuada para una liberación retardada y controlada del agonista tal como se define en la presente invención. Por ejemplo, el agonista de GnRH puede incorporarse en una matriz de polímero biocompatible que permite una liberación retardada y controlada. Todos los polímeros biocompatibles, bien conocidos por los expertos en la técnica, son candidatos potenciales para usarse en esta invención.

Un aspecto adicional de la presente invención es proporcionar una herramienta para el tratamiento denominada comúnmente "kit" tal como se define en las reivindicaciones, que incluirá uno o varios agentes adicionales para desencadenar la maduración folicular final, la ovulación y el agonista de GnRH para apoyar la fase luteínica. Prefe-

riblemente, el agente adicional usado para desencadenar la maduración folicular final y la ovulación será el mismo que el agonista usado para apoyar la fase luteínica. Según la presente invención, el agonista de GnRH preferido es la buserelina. Preferiblemente, el agente adicional usado para desencadenar la maduración folicular final y la ovulación, así como el agonista usado para el apoyo luteínico, se formularán en una dosificación y unidad, o múltiples unidades, suficientes para de uno a tres, pero preferiblemente un ciclo de tratamiento. El producto formulado puede incluirse en un envase o un dispositivo de administración que facilita la administración del agonista de GnRH a la paciente.

Todas las realizaciones descritas anteriormente pueden aplicarse a este aspecto particular de la presente invención para tratar la esterilidad usando agonistas de GnRH para apoyar la fase luteínica.

La presente invención así como las diversas formas de aplicarla se ilustran mediante los siguientes ejemplos que no son limitativos:

Ejemplo 1

Las pacientes que padecen una esterilidad desconocida, o esterilidad que resulta de endometriosis de leve a moderada, o una esterilidad que resulta de una alteración leve o moderada del esperma de su pareja, y que no han concebido a pesar de actos sexuales regulares durante un periodo de uno o dos años, se someten habitualmente a asistencia médica. El tratamiento usado más a menudo es estimulación ovárica unida a una IIU (Hughes G.H. 1997, The effectiveness of ovulation induction and intra-uterine insemination in the treatment of persistent infertility: a meta-analysis. Hum Reprod. 12: 1865-1872). Se realizó un estudio de búsqueda de dosis de grupos paralelos, aleatorizado, prospectivo en esta población de pacientes. Tras obtener el consentimiento informado por escrito, se confirmó la elegibilidad de la paciente y en el día 1 a 5 de su siguiente menstruación, la paciente tomó por vía oral durante 5 días, 25 mg/día de exemestano, un inhibidor de aromatasas.

Se siguió la respuesta ovárica al tratamiento en regularmente usando ultrasonidos transvaginales y midiendo los niveles de estradiol sérico. Normalmente, se realizó una primera evaluación en el día 6 de la estimulación. Se registró el número y el tamaño de cada folículo. Cuando al menos uno, y como máximo tres folículos alcanzaron un diámetro medio de 16 mm o más, y ese nivel de estradiol sérico no indica un riesgo significativo de OHSS (es decir, estradiol sérico < 1500 pg/ml), se asignó la paciente aleatoriamente para recibir o bien una administración de agonista de GnRH para desencadenar la ovulación o bien una inyección de 5000 UI de hCG (grupo control). Para ese fin, la dosis de buserelina administrada por vía intranasal fue de 200 µg. Entre 12 y 48 tras desencadenarse la ovulación, la pareja de la paciente proporcionó una muestra de esperma, tras de 2 a 5 días de abstinencia. Se separaron los espermatozoides móviles del líquido seminal, espermatozoides muertos, leucocitos y desechos celulares usando un método adecuado tal como "swim-up" ("nadar hacia arriba") o un gradiente de Percol. Ese mismo día, se usó la suspensión de espermatozoides móviles para realizar una inseminación intrauterina con un catéter insertado en la cavidad uterina a través del cuello uterino. El procedimiento puede repetirse al día siguiente. Desde ese día y durante un periodo de 14 días, la paciente o bien no recibió ningún tratamiento adicional (pacientes del grupo control de hCG) o bien recibió 100 µg de buserelina cada día IN, o cada dos días o cada tres días. Estas administraciones de buserelina se autoadministraron por la paciente. Estas administraciones intranasales tardaron menos de un minuto, no necesitaron preparación ni material y no conllevaron el riesgo de reacciones adversas locales tales como dolor y absceso. Se realizó una prueba de embarazo el día 14 de la fase luteínica y se registró la fecha de la menstruación para la paciente que no concibió. Los resultados presentados en las tablas 1-3 demuestran un apoyo luteínico dependiente de la dosis mediante la administración de un agonista de GnRH durante la fase luteínica. La buserelina administrada una vez al día proporcionó una fase luteínica más larga, niveles de progesterona y estradiol superiores en la fase luteínica tardía y una tendencia hacia una tasa de embarazo clínico superior.

TABLA 1

Duración de la fase luteínica (media ± DE) y resultados de la prueba de embarazo en los cuatro grupos de tratamiento

Grupos de tratamiento	hCG	Buserelina 100 µg/3 días	Buserelina 100 µg/2 días	Buserelina 100 µg/día
Paciente (n)	5	5	6	6
Duración de la fase luteínica (días)	14,8 ± 1,1	14,8 ± 1,7	14,8 ± 3,3	15,3 ± 0,5

ES 2 323 693 T3

Prueba de embarazo positiva	0/5	1/5	2/6	2/6
Embarazo clínico	0/5	0/5	1/6	2/6

TABLA 2

Niveles de progesterona sérica de la fase luteínica en pacientes que no concibieron (ng/ml $\pm$ DE)

Grupos de tratamiento	Día 0	Día 1	Día 4	Día 7	Día 9	Día 11	Día 14
hCG	0,5 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,6	6,0 $\pm$ 4,7	12,3 $\pm$ 5,4	13,1 $\pm$ 3,5	9,7 $\pm$ 2,8	3,3 $\pm$ 1,7
Buserelina 100 μ g/3 días	0,7 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,2	5,1 $\pm$ 2,0	11,5 $\pm$ 3,6	10,8 $\pm$ 6,6	10,0 $\pm$ 3,7	3,3 $\pm$ 2,4
Buserelina 100 μ g/2 días	0,9 $\pm$ 0,7	1,3 $\pm$ 0,8	7,6 $\pm$ 3,2	11,7 $\pm$ 4,6	8,2 $\pm$ 6,4	8,3 $\pm$ 6,5	5,8 $\pm$ 4,7
Buserelina 100 μ g/día	1,1 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,3	6,2 $\pm$ 2,3	13,9 $\pm$ 2,9	16,2 $\pm$ 7,5	14,1 $\pm$ 3,3	8,4 $\pm$ 4,3

TABLA 3

Niveles de estradiol sérico de la fase luteínica en pacientes que no concibieron (pg/ml: media $\pm$ DE)

Grupos de tratamiento	Día 0	Día 1	Día 4	Día 7	Día 9	Día 11	Día 14
hCG	227 $\pm$ 74	189 $\pm$ 65	114 $\pm$ 35	166 $\pm$ 37	213 $\pm$ 41	190 $\pm$ 59	100 $\pm$ 52
Buserelina 100 μ g/3 días	182 $\pm$ 76	325 $\pm$ 160	106 $\pm$ 61	144 $\pm$ 118	109 $\pm$ 88	123 $\pm$ 61	82 $\pm$ 31
Buserelina 100 μ g/2 días	247 $\pm$ 79	164 $\pm$ 75	139 $\pm$ 77	70 $\pm$ 19	65 $\pm$ 15	75 $\pm$ 44	124 $\pm$ 68
Buserelina 100 μ g/día	175 $\pm$ 071	213 $\pm$ 133	179 $\pm$ 101	163 $\pm$ 30	232 $\pm$ 77	200 $\pm$ 30	154 $\pm$ 85

Ejemplo 2

A las pacientes del ejemplo 1 que no se quedaron embarazadas después de 3 a 6 ciclos de IIU, se les propuso un tratamiento con FIV o ICSI. Estos tratamientos se proponen de manera franca a pacientes cuya causa de esterilidad es un problema tubárico grave, o una endometriosis grave o una alteración grave del esperma de la pareja. Estas pacientes pueden tratarse antes de su ciclo de FIV o ICSI con un anticonceptivo oral para programar de manera precisa su ciclo de menstruación. Esto se hace para un mejor manejo de la pareja y de la agenda del centro de TRA. Cuando se produjeron las menstruaciones, se realizó una estimulación ovárica con FSH a una dosis de entre 75 y 600 UI al día basándose en las características de la paciente (por ejemplo: edad, estado de la reserva ovárica, peso, etc.). Se realizó este tratamiento con FSH, pero también puede incluir citrato de clomifeno o un inhibidor de aromatasas. De cinco a 7 días tras el comienzo de la estimulación, o cuando los folículos principales alcanzaron un diámetro medio de 14 mm, se administró un antagonista de GnRH para prevenir un aumento de LH prematuro en la sangre. Se monitorizó el crecimiento folicular usando ultrasonidos vaginales y midiendo los niveles de estradiol sérico. Se realizaron estos controles cada 2 a 3 días. Cuando al menos dos folículos alcanzaron un diámetro medio de 16 mm o más, cuando el número total de folículos no excedía de 25 a 30, y cuando la concentración de estradiol sérico no indicaba un riesgo de hiperestimulación ovárica (nivel de estradiol sérico < 4000 pg/ml), la paciente recibió una administración de agonista de GnRH para desencadenar la maduración folicular final. Para ese fin, recibió entre 50 y 600 µg de buserelina por vía intranasal, siendo la dosis preferida de 200 µg. El momento de administración de buserelina fue muy preciso ya que definía el momento del procedimiento de recuperación de ovocitos que debe realizarse entre 35 y 38 horas tras el desencadenamiento. El segundo día tras la administración de GnRH, se admitió a la paciente en la unidad clínica de TRA para el procedimiento de recuperación de ovocitos. Se recuperaron ovocitos mediante aspiración transvaginal ecoguiada de los folículos. Se realizó este procedimiento con anestesia ligera. Se examinaron los líquidos foliculares aspirados bajo microscopio binocular para identificar complejos ovocito-cúmulo. Se transfirieron estos complejos a un medio de cultivo apropiado y se mantuvieron en un incubador en condiciones de temperatura, gas y humedad adecuadas. Varias horas tras la recuperación, se inseminaron los ovocitos o bien mediante incubación conjunta en una suspensión de espermatozoides móviles, o bien mediante inyección directa de un espermatozoide en el citoplasma del ovocito usando un micromanipulador. La paciente salió del centro de TRA ese mismo día. El día anterior al procedimiento de recuperación de ovocitos, y durante un periodo de 14 días, la paciente recibió entre 3 veces al día y una vez cada tres días (preferiblemente una vez al día) una administración intranasal de 50 a 400 µg de buserelina, preferiblemente de 100 µg. Estas administraciones intranasales tardaron menos de un minuto, no necesitaron ninguna preparación específica ni material y no conllevaron el riesgo de reacciones adversas locales tales como dolor y absceso. El día tras la inseminación, se evaluó la fecundación de los ovocitos visualizando bajo un microscopio la presencia de dos pronúcleos en el citoplasma. Se observó la primera fase de escisión de los embriones en el plazo de las siguientes 48 horas. La transferencia de los embriones al útero se realizó habitualmente el día 3 tras la recuperación de los ovocitos o más tarde si el cultivo de embriones se continuó hasta la fase de blastocisto. Lo más a menudo, se implantaron dos embriones si la paciente tenía menos de 35 años de edad, y se implantaron tres si la paciente tenía más de 35 años de edad. El día 13, tras desencadenar la maduración folicular final, se realizó una prueba de embarazo midiendo la concentración de hCG en la orina o sangre (suero) de la paciente. Una prueba de hCG positiva significa incuestionablemente que la paciente estaba embarazada dado que no recibió hCG exógena.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un agonista de una hormona hipotalámica en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la esterilidad en mamíferos hembra, **caracterizado** porque el agonista es un agonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) seleccionado del grupo que consiste en buserelina, nafarelina, triptorelina, leuprorelina, goserelina, deslorelina e histrelina, y en el que el medicamento es para apoyar la fase luteínica y es para su administración intranasal en una o varias dosis diarias de entre 50 y 400 μg y su administración se inicia en el plazo de los tres primeros días tras desencadenarse la ovulación, o bien
 - i) tras una ovulación espontánea, o bien
 - ii) tras la estimulación del crecimiento folicular, desencadenando la maduración folicular final y la ovulación, con al menos un agente adicional,
 y en el que la duración de la administración del agonista de GnRH es de entre 7 y 28 días.
2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el agente adicional que desencadena la maduración folicular final y la ovulación es un agonista de GnRH seleccionado del grupo que consiste en buserelina, nafarelina, triptorelina, leuprorelina, goserelina, deslorelina e histrelina.
3. Uso según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el agente adicional que desencadena la maduración folicular final y la ovulación es el mismo u otro agonista de GnRH que el agonista de GnRH usado para apoyar la fase luteínica.
4. Uso según las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque el medicamento se usa tras la administración de un antagonista de GnRH durante los últimos días de estimulación del crecimiento folicular.
5. Uso según las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque el medicamento se administra en combinación con otro agente de apoyo luteínico seleccionado del grupo que comprende progesterona natural, un progestágeno, hCG, LH, una o más isoformas de LH o de hCG, un peptidomimético de LH o de hCG, un inhibidor de fosfodiesterasa, un modulador no peptídico del AMP cíclico o una combinación de dos o más de los mismos.
6. Uso según las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque el medicamento se administra en combinación con una citocina que está implicada en mecanismos de implantación del embrión.
7. Uso según la reivindicación 6, **caracterizado** porque la citocina se selecciona del grupo que comprende LIF nativo, LIF recombinante.
8. Uso según las reivindicaciones 1-7, **caracterizado** porque el agente adicional que estimula el crecimiento folicular se selecciona del grupo que comprende gonadotropinas menopáusicas humanas (hMG), hormona foliculoestimulante derivada de la orina (FSH), FSH recombinante, una o varias isoformas de FSH, miméticos de FSH, análogos de FSH con una farmacocinética modificada, moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM), inhibidores de aromatasas, inhibidores de fosfodiesterasa o una combinación de dos o más de los mismos.
9. Uso según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el SERM se selecciona del grupo que comprende clomifeno, tamoxifeno o raloxifeno o una combinación de dos o más de los mismos.
10. Uso según la reivindicación 8, **caracterizado** porque los inhibidores de aromataza se seleccionan del grupo que comprende anastrozol, letrozol o exemestano o una combinación de dos o más de los mismos.
11. Uso según las reivindicaciones 1-10, **caracterizado** porque el agente adicional que desencadena la maduración folicular final y la ovulación se selecciona del grupo que comprende hCG, LH, una o más isoformas de hCG o LH, peptidomiméticos de LH y hCG, inhibidores de fosfodiesterasa o una combinación de dos o más de los mismos.
12. Uso según las reivindicaciones 8 u 11, **caracterizado** porque los inhibidores de fosfodiesterasa son teofilina.
13. Uso según cualquier reivindicación de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el agonista de GnRH es buserelina.
14. Uso según la reivindicación 13, **caracterizado** porque la administración de buserelina se inicia el primer día tras desencadenarse la ovulación.
15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la buserelina es para administración por vía intranasal a una dosis de 100 μg .
16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se administra buserelina durante 14 días.

ES 2 323 693 T3

17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el agonista de GnRH que desencadena la maduración folicular final y la ovulación es la buserelina y es para administración por vía intranasal, una vez a una dosis de entre 50 y 600 μg .

5 18. Uso según la reivindicación 17, **caracterizado** porque la buserelina es para administración por vía intranasal a una dosis de 200 μg .

10 19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el mamífero hembra es una mujer.

20. Kit para su uso en el tratamiento de la esterilidad en mamíferos hembras que incluye:

15 - un agonista de GnRH seleccionado del grupo que consiste en buserelina, nafarelina, triptorelina, leuprorelina, goserelina, deslorelina e histrelina y en el que el agonista de GnRH es para apoyar la fase luteínica y es para administración intranasal, en una o varias dosis diarias de entre 50 y 400 μg , y su administración se inicia en el plazo de los 3 primeros días tras desencadenarse la ovulación o bien

i) tras una ovulación espontánea, o bien

20 ii) tras la estimulación del crecimiento folicular, desencadenando la maduración folicular final y la ovulación, con al menos un agente adicional, y en el que la duración de la administración del agonista de GnRH es de entre 7 y 28 días,

25 - uno o más agentes adicionales para desencadenar la maduración folicular final y la ovulación según las reivindicaciones 2, 3, 11, 12, 17 y 18.

21. Kit para pacientes según la reivindicación 20, **caracterizado** porque el agonista de GnRH y el uno o más agentes adicionales se formulan en dosificación y unidad requeridas para un ciclo de tratamiento.