



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 052**

51 Int. Cl.:
A61K 38/24 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04766306 .7**
86 Fecha de presentación : **23.07.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1673105**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.06.2006**

54 Título: **Uso de hormona estimuladora del folículo para reducir las aberraciones cromosómicas de los espermatozoides en los varones.**

30 Prioridad: **25.07.2003 EP 03102303**
26.02.2004 EP 04100760

73 Titular/es: **LABORATOIRES SERONO S.A.**
Zone Industrielle de l'Ourietaz
1170 Aubonne, CH

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

72 Inventor/es: **De Leo, Vincenzo y**
La Marca, Antonio

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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 hormona estimuladora del folículo para reducir las aberraciones cromosómicas de los espermatozoides en los varones.

Campo de la invención

Esta invención se refiere al uso de una sustancia seleccionada entre la Hormona Estimuladora del Folículo (FSH) y las variantes de la FSH para la preparación de una composición farmacéutica para reducir las alteraciones cromosómicas de los gametos en los varones. Más específicamente, la invención es para el uso en hombres que padecen aneuploidía de los espermatozoides, notablemente diploidía y disomía. La invención comprende adicionalmente el uso de formulaciones farmacéuticas que contienen Hormona Estimuladora del Folículo (FSH) y variantes de FSH para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de alteraciones cromosómicas de los gametos en varones.

Antecedentes de la invención

Se ha demostrado que un porcentaje considerable de hombres infértiles tienen un cariotipo anómalo y, por lo tanto, estos sujetos producen gametos con alteraciones cromosómicas. Además, que tengan un cariotipo normal no excluye la posibilidad de que estén presentes espermatozoides con alteraciones cromosómicas, ya que se pueden producir errores en la segregación cromosómica durante la división mitótica y/o meiótica en la espermatogénesis. Basándose en los primeros datos disponibles en la bibliografía (*Vegetii et al., 2000 Human Reproduction, 15(2), 351-365*), se ha sugerido que aproximadamente el 0,3-1,08% de los espermatozoides de los hombres sanos tienen aberraciones cromosómicas numéricas y que este porcentaje se vuelve superior al examinar los espermatozoides de hombres con oligospermia (0,7-9,44%) y teratospermia (1,3-3,9%). Estas alteraciones parecen estar relacionadas con los cromosomas sexuales y los autosomas, concretamente los cromosomas 1, 18, y 21. Estas anomalías en el cariotipo del esperma dan como resultado generalmente una reducción de la fertilidad y/o un aumento de la tasa de abortos, es decir, los hombres fértiles que producen gametos con alteraciones cromosómicas hacen que sus compañeras experimenten varios embarazos frustrados (*Egozcue et al., 2003, Placenta, 24, S62-S65; Egozcue et al., 2000, Human reproduction, 6, 93-105*).

La aberración cromosómica numérica caracterizada por cromosomas extra o perdidos se denomina “aneuploidía”.

Se conocen diferentes tipos de aneuploidías y se denominan según la clase de aberración numérica cromosómica: por ejemplo, la presencia de un cromosoma adicional en comparación con el número normal en células diploides se conoce como trisomía ($2n + 1$); la ausencia de un cromosoma en un par homólogo en células diploides se conoce como monosomía ($2n - 1$), mientras la pérdida de un par de cromosomas completo en células diploides es conocida como nulisomía ($2n - 2$), donde n es el número de los tipos de cromosomas.

Por analogía, en el caso de las células haploides, tales como los gametos, el término “aneuploide” caracteriza a los gametos que tienen una aberración numérica cromosómica, tal como, por ejemplo, a los que tienen un cromosoma extra o un cromosoma perdido. Estos gametos “aneuploides” formarán, cuando se fusionen con un gameto normal, un cigoto que tiene un número anómalo de cromosomas (aneuploidía). La mayoría de las veces, los cigotos aneuploides mueren durante el momento entre la concepción y el nacimiento. No obstante, en algunos casos, el cigoto se convierte en un vástago afectado por la “aneuploidía” y las consecuencias sobre el portador de esta aberración numérica cromosómica dependen de los cromosomas que están implicados.

El desarrollo de la aneuploidía gamética de los autosomas y los cromosomas sexuales es el resultado de errores, tales como la separación fallida de las cromátidas hermanas que se produce durante la mitosis de los espermatogonios y durante la primera y la segunda divisiones meióticas o tales como la separación fallida de los cromosomas homólogos en la meiosis. Cuando los cromosomas no logran al separarse durante la primera fase meiótica, todos los espermatozoides producidos tendrán un número aberrante de cromosomas (solamente $2n$:diploides o $0n$). Si los cromosomas no logran separarse durante la segunda fase meiótica, solamente 2 células haploides de las 4 que proceden del mismo espermatocito resultarán afectadas por la aberración numérica cromosómica.

Por lo tanto la producción de aneuploidías de los gametos constituye un serio factor de riesgo genético ya que inducen aneuploidía de los vástagos que ocasionan muchas anomalías en los fetos y en los lactantes viables.

Por ejemplo, la aneuploidía en el lactante puede ocasionar la infertilidad tardía del lactante, abortos espontáneos y mortalidad perinatal del lactante, malformaciones congénitas, retraso mental, y comportamiento anómalo (*Hook, 1985, en: Aneuploidy: Etiology and mechanisms. (eds.) V.L. Dellarco, P.E. Voytek, A. Hollander, págs. 7-33. New York: Plenum; Hecht et al., 1987, en: Aneuploidy, Part A: Incidence and etiology, (eds.) B.K. Vig. A.A. Sandberg, 9-49, New York: Alan R. Liss*), aumento de la sensibilidad a enfermedades infecciosas, alta propensión a la leucemia o desarrollo temprano de enfermedad de Alzheimer en el vástago.

Las aneuploidías en los autosomas tales como las monosomías siempre son letales para el feto mientras que las trisomías sólo son no letales cuando implican a los cromosomas 13, 18 y 21 pero son horribilmente discapacitantes para el vástago.

Los ejemplos de aneuploidías de los cromosomas sexuales comunes se encuentran en pacientes con el Síndrome de Klinefelter (47, XXY), que es la forma más común de aneuploidía en hombres y en pacientes (47, XYY) que es otra forma de aneuploidía descubierta por Sandberg y colaboradores.

5 Se ha observado la presencia de anomalías cromosómicas de los espermatozoides (tanto numéricas como estructurales) en un porcentaje considerable de pacientes infértiles (*Bourrouillou et al., 1985, Hum Genet, 71, 366-367*) y es ampliamente aceptado que la utilización de las técnicas de fertilización asistida permite que estos pacientes procreen, incrementando el riesgo de tener niños con alteraciones cromosómicas.

10 Los gametos aneuploides también se desarrollan en sujetos con oligoastenoteratozoospermia (OAT) con conjuntos de cromosomas normales puesto que los patógenos testiculares nocivos pueden desorganizar el delicado proceso de segregación cromosómica durante la espermatogénesis. Los gametos aneuploides también se pueden desarrollar en sujetos más mayores o en pacientes expuestos a agentes potencialmente aneuploidogénicos. Por esta razón, la evaluación de la frecuencia de aneuploidía en espermatozoides se está volviendo una etapa fundamental en el transcurso del
15 diagnóstico de los pacientes infértiles, concretamente si pretenden pasar por técnicas de fertilización asistida.

Los datos publicados indican que los pacientes con OAT tienen un incremento del porcentaje de espermatozoides con aneuploidía cromosómica hereditaria. Este aumento de la frecuencia de aneuploidía reduce la capacidad fertilizante de los espermatozoides durante las técnicas de fertilización asistida (*Storeng y col., 1998, Acta Obstet Gynecol Scand, 77(2), 191-197*).

Considerando el hecho de que los métodos de separación de espermatozoides utilizados durante la fertilización *in vitro* y la transferencia del embrión (FIVET) no modifican el porcentaje de esperma aneuploide, los pacientes con OAT tienen un gran riesgo de producir niños con aneuploidía cromosómica (*Pfeffer et al., 1999, Fertil Steril, 72, 472-478*).

El desarrollo de técnicas de fertilización tales como la fertilización *in vitro* (IVF) ha incrementado la importancia del control de las anomalías del cariotipo de los espermatozoides ya que pueden ser la causa de trastornos de fertilidad y/o conducir a la inducción de aberraciones cromosómicas en los vástagos (*Levron et al., 2001, Molecular and Cellular Endocrinology, 183, S23-S28*).

Los pacientes masculinos que se someten a IVF son generalmente compañeros de mujeres infértiles debido al factor tubal, la anovulación o la infertilidad idiopática u hombres que tienen una baja cantidad de espermatozoides.

35 La investigación en este área se ha hecho más relevante clínicamente en los últimos años con el desarrollo de la inyección de esperma intracitoplásmica (ICSI). Se ha demostrado que la ICSI es extremadamente útil para el tratamiento de la infertilidad, no obstante la transmisión de defectos citogénicos al vástago es una preocupación principal en esta técnica de fertilización y es un asunto comentado (*Ushijima et al., 2000, Human Reproduction, 15(5), 1107-1111; Levron et al., 2001, antes*). El riesgo es alto, por ejemplo, para el esperma de donantes con un alto grado de consanguinidad o translocación (*Baccetti et al., 2002, Contraception, 65, 283-287*). Los pacientes masculinos que experimentan ICSI son normalmente pacientes con oligo- y/o terato- y/o asteno-zoospermia leve o grave. Por otra parte, las muestras de esperma obtenidas mediante procedimientos quirúrgicos (Aspiración de Esperma Testicular: TESA; Extracción de Esperma Testicular: TESE; Aspiración de Esperma Epididimal Microquirúrgica: MESA; Aspiración de Esperma Epididimal Percutánea: PESA) también son tratadas por la ICSI.

45 Por esta razón, la aneuploidía espermática debe ser evaluada en todos los pacientes que pretenden experimentar técnicas de fertilización asistida.

Sería deseable desarrollar métodos para reducir la tasa de aneuploidía tal como la diploidía en espermatozoides, especialmente en hombres que pretenden someterse a Técnicas de Reproducción Asistida (ART).

Se conoce la hormona estimulante del folículo (FSH) por su papel en el inicio del desarrollo de las células de Sertoli y en su estimulación para controlar los espermatogonios. Se ha sugerido mediante estudios experimentales que la FSH está presente en las células de Sertoli y en las células germinales redondas que expresan ambas el receptor de FSH (*Baccetti et al., 1998, Human Reproduction, 12, 9, 1955-1968*).

Además, las terapias con FSH exógena inducían mejoras en la morfología y la ultraestructura del esperma en hombres que tienen alteraciones en el acrosoma, la cromatina y los axonemas visualizadas mediante microscopía electrónica (*Baccetti et al., 1997, The FASEB Journal, 12, 1045-1054*) y en hombres con oligoastenozoospermia idiopática (*Ben-Rafael, 2000, Fertility and Sterility, 73(1) 24-30; Strehler et al., 1997, Journal of Andrology, 18(4), 439-447*).

La FSH se utiliza para inducir la espermatogénesis en hombres que padecen oligospermia. Un régimen en el que se utilizan 150 UI de FSH 3 veces a la semana combinado con 2.500 UI de hCG (Gonadotropina Coriónica humana) dos veces por semana ha resultado acertado para obtener una mejora en el recuento de esperma en hombres que padecen hipogonadismo hipogonadotrófico (*Burgues et al., 1997, Hum. Reprod., 12, 980-6*). Se ha utilizado una dosis elevada (150 UI) de FSH para tratar la oligospermia idiopática (*Iacono et al., 1996, J. Urol., 102, 81-4*).

Estos estudios se han centrado en el incremento de la tasa de fertilidad y en mejoras de la morfología y la ultraestructura del esperma como se visualiza mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)/Microscopía de Transmisión de Electrones (TEM).

La aneuploidía no afecta a los carioplasmas cuando se observan mediante SEM/TEM y no se corresponde con las características de SEM/TEM, esto es, un semen con características normales en SEM/TEM puede estar afectado por aneuploidía. *Baccetti et al., 1997*, antes, sugieren que los pacientes con defectos genéticos no deben ser tratados con FSH.

10 Compendio de la invención

Un objeto de la invención es proporcionar un método para la reducción y/o prevención de las alteraciones cromosómicas de los gametos en un varón, notablemente la aneuploidía de los espermatozoides incluyendo la diploidía y la disomía, preferiblemente en hombres que deseen someterse a técnicas de fertilización asistida, por medio del cual se administra al varón que lo necesita una cantidad farmacéuticamente eficaz de FSH o variante de FSH.

En un primer aspecto, la invención proporciona el uso de una sustancia seleccionada entre la Hormona Estimuladora del Folículo (FSH) y las variantes de la FSH para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la reducción de alteraciones cromosómicas de los gametos en un varón, notablemente de la aneuploidía de los espermatozoides, incluyendo la diploidía y la disomía.

La invención es útil en un método para reducir las alteraciones cromosómicas numéricas de los gametos en un sujeto varón, notablemente de la aneuploidía de los espermatozoides, incluyendo la diploidía y la disomía, que comprende administrar una dosis eficaz de una sustancia seleccionada entre FSH y una variante de FSH al paciente.

La invención es útil en un método para prevenir la aparición de aberraciones cromosómicas en el vástago de un sujeto varón, que comprende administrar una dosis eficaz de una sustancia seleccionada entre FSH y una variante de FSH al sujeto varón antes de la concepción.

30 Descripción detallada de la invención

Los siguientes párrafos proporcionan las definiciones de diversos términos, y se pretende aplicarlas uniformemente en toda la memoria y en las reivindicaciones a menos que una definición establecida expresamente de otro modo proporcione una definición diferente.

La “oligozoospermia” se caracteriza por un semen que contiene un bajo recuento de esperma. Normalmente se diagnostica en hombres cuando la concentración de esperma es $<20 \times 10^6/\text{ml}$.

La “astenozoospermia” se caracteriza por un semen que tiene una motilidad del esperma deteriorada. Se diagnostica normalmente en hombres cuando menos del 50% de los espermatozoides tienen una progresión directa o menos del 25% de los espermatozoides tienen una rápida progresión lineal.

La “teratozoospermia” por un semen que tiene esperma con una morfología anómala. Se diagnostica normalmente en hombres cuando menos del 30% de espermatozoides tienen una morfología normal.

La “oligoastenoteratozoospermia” se caracteriza por un semen que tiene las tres variables citadas previamente para la calidad del esperma, que están todas alteradas. Según los criterios de la OMS, se diagnostica cuando los pacientes presentan los siguientes parámetros: densidad $<20 \times 10^6$ espermatozoides/ml, motilidad de grado 3 $< 25\%$ y/o motilidad de grado 2 más 3 $< 50\%$, y morfología normal en menos del 30% de los espermatozoides.

El término “cariotipo” hace referencia a la constitución cromosómica de un individuo, incluyendo el número de cromosomas y cualquier anomalía posible.

Las enfermedades ilustrativas en las que están implicadas aberraciones cromosómicas incluyen el síndrome de Down, el síndrome de Klinefelter (XXY), el síndrome de Turner (XO), el síndrome de la triple X, el síndrome de Tetra X, el síndrome de Penta X, el síndrome XYY, las monosomías o las polisomías de cualquier cromosoma incluyendo los cromosomas 7, 10, 11, 13, 18, 21, X e Y, la aneuploidía de los cromosomas sexuales en hombres con mosaicismo cromosómico (XY/XXY) y cromosomas X múltiples (p. ej., XXXXY; XXXYY).

El término “administrar” o “administración” significa introducir una formulación de la presente invención en el organismo de un paciente que lo necesita para tratar una enfermedad o condición.

El término “aberración cromosómica” se utiliza para las anomalías cromosómicas e incluye aberraciones numéricas cromosómicas tales como poliploidía y aneuploidía que incluyen la presencia de al menos un cromosoma extra o la ausencia de un cromosoma. La aneuploidía en células haploides tales como los gametos incluye la diploidía.

La “aneuploidía” y la “poliploidía” son condiciones en las que una célula tiene un número de cromosomas diferente del número haploide (“n”) o del número diploide (“2n”) normal.

ES 2 284 052 T3

Como es sabido, en plantas superiores y animales, cada tipo específico de cromosoma está normalmente presente en forma de dos copias de cromosomas homólogos (estado diploide). Por ejemplo, en humanos, el número diploide es 46.

5 Después de la conclusión de las dos divisiones celulares que forman las células sexuales, esto es los gametos (el espermatozoide y el óvulo), cada espermatozoide y óvulo resultantes normalmente encierran solamente una copia de cada cromosoma (estado haploide). Por ejemplo, en humanos, el número haploide normal (número de cromosomas en células haploides tales como los gametos) es 23.

10 La unión del espermatozoide y el óvulo durante la fertilización da como resultado un “zigoto” que contiene un cromosoma homólogo de origen paterno y otro de origen materno, restaurándose la constitución cromosómica diploide normal.

15 Una célula somática normal debe tener un contenido cromosómico diploide de 23 pares, o 46 cromosomas en total.

Por lo tanto, una célula somática aneuploide tiene un número de cromosomas que es distinto de dos veces el número haploide normal ($2n$). Por ejemplo, una célula somática aneuploide puede ser una célula que tiene una trisomía, es decir, una célula que tiene tres copias de un cromosoma, o una monosomía, es decir, una célula que tiene una única copia de un cromosoma. La aneuploidía puede ser resultado de la no disyunción cromosómica durante la mitosis. Una
20 célula poliploide es una célula que tiene un número de cromosomas que es algún múltiplo del número haploide normal mayor que el número diploide habitual, es decir, $2n$. Por ejemplo, una célula poliploide puede ser triploide ($n=69$) o tetraploide ($n=92$).

En una célula haploide, tal como un gameto, el estado natural es haploide, representando n cromosomas. La aneuploidía significa que la célula tiene un número de cromosomas que es distinto de n . Por ejemplo, un cromosoma
25 puede estar perdido ($n-1$), o puede ser añadido ($n+1$) tal como en la disomía, o el número de cromosomas puede ser duplicado tal como en la diploidía ($2n$).

La “disomía” en las células se caracteriza por la presencia de un cromosoma extra. En las células haploides, tales
30 como los gametos, la disomía se caracteriza por cromosomas $n+1$.

La “diploidía” en las células se caracteriza por la duplicación del número de cromosomas. En las células haploides, tales como los gametos, la diploidía se caracteriza por $2n$ cromosomas.

35 El término “paciente” representa un mamífero macho que es tratado por una enfermedad o condición. Los pacientes tienen el siguiente origen, humano, ovino, porcino, equino, bovino, conejos y similares, pero no están limitados a ellos.

El término “Tecnología de Reproducción Asistida” incluye IVF (Fertilización *In Vitro*), ICSI (inyección de espermatozoide intra-citoplásmica).
40

Por “cantidad eficaz”, se quiere significar una cantidad de FSH suficiente para reducir las alteraciones cromosómicas en un sujeto macho, especialmente para reducir la tasa de aneuploidía, incluyendo diploidía y disomía en un paciente macho. La cantidad de FSH puede ser determinada rutinariamente por los expertos en la técnica. La cantidad del compuesto realmente administrada será determinada típicamente por un médico, a la luz de las circunstancias
45 relevantes, incluyendo la condición a tratar, la ruta de administración seleccionada, el compuesto real administrado, la edad, el peso, y la respuesta del paciente individual, los niveles de FSH endógenos del paciente, y similares. La “cantidad eficaz” se puede obtener alternativamente mediante la duración del tratamiento. Típicamente, la duración del tratamiento incluye tratamientos de al menos un mes, tres meses, seis meses o un año.

50 Se pretende que la expresión “farmacéuticamente aceptable” abarque cualquier portador o sal que no interfiera sustancialmente en la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el anfitrión al que se administra.

El término “recombinante” hace referencia a preparaciones de FSH o variantes de FSH que se producen por medio
55 del uso de la tecnología del ADN recombinante.

La tasa de aneuploidía, diploidía o disomía se puede determinar por medio de la evaluación de las anomalías cromosómicas numéricas en los espermatozoides eyaculados por ejemplo mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), especialmente FISH multicolor (Egozcue *et al.*, 2003, antes). La FISH implica la hibridación de sondas
60 de ADN específicas marcadas con fluorocromos a secuencias de ADN complementarias de los cromosomas diana, seguido de detección de las sondas unidas bajo un microscopio de fluorescencia como describen Shi *et al.*, 2001, *Reproduction*, 121, 655-666. Para realizar el análisis de FISH sobre muestras de semen de donantes con cantidades extremadamente bajas de espermatozoides, se ha desarrollado una técnica de descondensación/desnaturalización simultánea con microondas para incrementar el número de espermatozoides analizables para su uso en la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) (Rademaker *et al.*, 2001, *Cytogenet Cell Genet.* 95(3-4), 143-5). Un ejemplo de un protocolo FISH para
65 determinar la tasa de aneuploidía o diploidía se detalla en el Ejemplo nº 1.

Los niveles de testosterona en suero basal se pueden medir mediante inmunoensayos ELISA/quimioluminiscentes disponibles en el mercado.

Se pretende que la expresión “variante de FSH” abarque aquellas moléculas que difieren en la secuencia de aminoácidos, el patrón de glicosilación o el enlace inter-subunidades de la FSH humana pero que muestran actividad de FSH. Los ejemplos incluyen CTP-FSH, una FSH recombinante modificada de efecto prolongado, que consiste en la subunidad α de tipo salvaje y una subunidad β híbrida en la cual el péptido carboxi terminal de hCG se ha fusionado al C-terminal de la subunidad β de FSH, como se describe en (*La Polt et al., 1992, Endocrinology, 131, 2514-2520 o Kelin et al., 2003, Human Reprod. 2003, 18, 50-56*). También está incluido CTP-FSH de cadena sencilla, una molécula de cadena sencilla, que consiste en las siguientes secuencias (de N-terminal a C-terminal):

β FSH	β hCG-CTP(113-145)	α FSH
-------------	--------------------------	--------------

donde β FSH significa la subunidad β de FSH, β hCG CTP (113-145) significa el péptido carboxi terminal de hCG y α FSH significa la subunidad α de FSH, como describen *Klein et al., 2003*. Otros ejemplos de variantes de FSH incluyen moléculas de FSH que tienen sitios de glicosilación adicionales incorporados a la subunidad α y/o β , como se describe en la publicación WO 01/58493, concretamente como se describe en las reivindicaciones 10 y 11 y moléculas de FSH con enlaces S-S entre subunidades, como se describe en la publicación WO 98/58957.

Las variantes de FSH referidas en la presente memoria también incluyen las delecciones carboxi terminales de la subunidad beta que son más cortas que la proteína madura completa.

Las FSH utilizadas en la invención pueden ser “recombinantes” o de una fuente natural.

Las variantes de FSH utilizadas en la invención pueden ser “recombinantes” u obtenidas mediante síntesis química.

Un ejemplo de tecnología de ADN recombinante para producir FSH se describe en la publicación WO 85/01958.

Un ejemplo de un método de expresión de FSH en el que se utiliza la tecnología recombinante es por transfección de células eucarióticas con las secuencias de ADN que codifican una subunidad alfa y beta de FSH, proporcionadas en un vector o en dos vectores teniendo cada subunidad un promotor separado, como se describe en las patentes Europeas núms. EP0211894 y EP0487512.

Otro ejemplo del uso de la tecnología recombinante para producir FSH es mediante el uso de la recombinación homóloga para insertar un segmento regulador heterólogo en conexión operativa con secuencias endógenas que codifican una o ambas subunidades de FSH, como se describe en la patente Europea núm. EP0505500.

Asimismo se contemplan métodos tales como los descritos en la publicación WO99/57263, donde una de las subunidades se inserta heterológamente en una célula, y la otra subunidad se expresa mediante la activación de las secuencias genómicas por inserción de un segmento regulador heterólogo mediante recombinación homóloga. La invención puede ser utilizada con cualquiera de estos métodos de expresión de FSH.

La FSH humana recombinante que es adecuada para su uso en la invención, es por ejemplo, GONAL-f® (FSH, Folitropina alfa) de SERONO.

La FSH utilizada según la presente invención puede ser purificada a partir de fuentes biológicas, tales como fuentes urinarias, por ej. FSH urinaria o urofolitropina (uFSH). Las metodologías aceptables incluyen las descritas por *Hakola, 1997, Molecular and Cellular Endocrinology, 127:59-69; Keene et al., 1989, J. Biol. Chem., 264:4769-4775; Cerpa-Poljak et al., 1993, Endocrinology, 132:351-356; Dias et al., 1994, J. Biol. Chem., 269:25289-25294; Flack et al., 1994, J. Biol. Chem., 269:14015-14020 y Valove et al., 1994, Endocrinology, 135:2657-2661*; Patente de los Estados Unidos 3.119.740 y Patente de los Estados Unidos núm. 5.767.067.

La FSH o la variante de FSH puede ser formulada para inyectable, ya sea intra-muscular o subcutánea, preferiblemente subcutánea.

La formulación de FSH puede ser liofilizada, en cuyo caso se disuelve en agua para inyectables inmediatamente antes de la inyección. La formulación de FSH también puede ser una formulación líquida, en cuyo caso se puede inyectar directamente, sin disolución previa.

La formulación de FSH puede estar en formatos líquidos de dosificación individual o múltiple, en viales, o ampollas. Los formatos de una sola dosis deben permanecer estables y potentes en el almacenamiento antes de su uso. Los formatos de múltiples dosis no solamente deben permanecer estables y potentes en el almacenamiento antes de su uso, sino que también deben permanecer estables, potentes y relativamente libres de bacterias a lo largo del período de administración del régimen múltiple, después de que el sello de la ampolla haya sido comprometido. Por esta

ES 2 284 052 T3

razón, los formatos de múltiples dosis a menudo contienen un agente bacteriostático, tal como, por ejemplo, alcohol bencílico, meta-cresol, timol o fenol, preferiblemente alcohol bencílico o meta-cresol. Las formulaciones de una sola dosis también pueden comprender un agente bacteriostático.

5 La FSH o las variantes de FSH se pueden formular con excipientes y estabilizantes conocidos, por ejemplo, sacarina y manitol. La formulación también puede comprender un antioxidante, tal como metionina. Puede comprender adicionalmente un tensioactivo, tal como TWEEN (preferiblemente TWEEN 20) o Pluronic (preferiblemente Pluronic F68).

10 La FSH se formula corrientemente para inyección intramuscular (IM) o subcutánea (SC). Se suministra en forma liofilizada (sólida) en viales o ampollas de 75 UI/vial y 150 UI/vial con un período de durabilidad antes de la venta de un año y medio a dos años cuando se almacena a 2-25°C. La solución para inyectables se forma reconstituyendo el producto liofilizado con agua para inyectables (WFI). Dependiendo de la respuesta del paciente, se pueden utilizar hasta tres ciclos de tratamiento con dosis crecientes de FSH. Con las formulaciones liofilizadas, se requiere que el
15 paciente reconstituya un nuevo vial de sustancia liofilizada con diluyente y los administre inmediatamente después de la reconstitución en una pauta diaria: por ejemplo: [Package insert N1700101A, publicado en Febrero de 1996, para Fertinex® (urofolitropina purificada para inyectables) para la inyección subcutánea, por Serono Laboratories, Inc., Randolph, MA]; Metrodin HP®; la pluma Gonol F® (Serono Laboratories, Inc.), esto es multi-dosis de FSH pre-cargada y lista para su uso.

20 Los ejemplos de las formulaciones para FSH se enumeran más abajo:

En EP0618808 (Applied Research Systems ARS Holding N.V.) se describe una composición farmacéutica que comprende una mezcla íntima sólida de gonadotropina y una cantidad estabilizante de sacarosa sola o combinada con glicina.

En PCT/EP2004/050432 (Applied Research Systems ARS Holding N.V.) se describe una composición farmacéutica de FSH y Pluronic.

30 En EP0448146 (AKZO N.V.) se describe una gonadotropina estabilizada que contiene producto liofilizado que comprende una parte en peso de gonadotropina; y de 200 a 10.000 partes en peso de un estabilizador de sal de ácido dicarboxílico asociado con la gonadotropina.

En EP0853945 (Akzo Nobel N.V.) se describe una formulación que contiene gonadotropina líquida caracterizada porque la formulación comprende una gonadotropina, cantidades estabilizantes de un ácido policarboxílico o una sal del mismo y un compuesto tioéter.

Se pueden aumentar los niveles de FSH en un macho que padece alteraciones cromosómicas de los gametos, elevando los niveles de FSH endógena por medio de la administración de agonistas de FSH, por ejemplo los agonistas de FSH descritos en las publicaciones WO 0209706 y WO 0008015.

En una realización, la invención proporciona el uso de una sustancia seleccionada entre la Hormona Estimulante del Folículo (FSH) y las variantes de la FSH para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la reducción de alteraciones cromosómicas de los gametos en un macho, notablemente aberraciones numéricas en
45 espermatozoides tales como la aneuploidía de los gametos, incluyendo la diploidía y la disomía.

La invención es útil en un método para tratar y/o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con alteraciones cromosómicas de los gametos en machos, notablemente aberraciones numéricas en espermatozoides tales como aneuploidía de los gametos, incluyendo diploidía y disomía, que comprende administrar a un sujeto macho que lo necesita una cantidad eficaz de una sustancia seleccionada entre FSH y variantes de FSH, donde el sujeto puede ser un ser humano o un animal.

La invención es útil en un método para reducir las alteraciones cromosómicas de los gametos en un macho, notablemente las aberraciones numéricas en espermatozoides tales como la aneuploidía de los gametos, incluyendo la diploidía y la disomía, que comprende administrar una dosis eficaz de una sustancia seleccionada entre FSH y las variantes de FSH al paciente.

La invención es útil en un método para prevenir la aparición de aberraciones cromosómicas en los vástagos de un sujeto macho, que comprende administrar una dosis eficaz de una sustancia seleccionada entre la FSH y las variantes de FSH al macho, antes de la concepción.

La invención es útil en un método de fertilización *in vitro*, incluyendo ICSI, que comprende la etapa de tratar al donante de los espermatozoides, antes de la recogida de los espermatozoides, con una cantidad de FSH o variante de FSH suficiente para prevenir o reducir las aberraciones cromosómicas en los espermatozoides.

La invención es útil en un método de fertilización *in vitro*, incluyendo ICSI, que comprende la etapa de detectar la aneuploidía y/o la diploidía en los espermatozoos de un paciente mediante la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), tratar al donante de espermatozoides aneuploides y/o diploides antes de la recogida de los esper-

matozoides, con una cantidad de FSH o variante de FSH suficiente para evitar o reducir las aberraciones cromosómicas en los espermatozoides.

En una realización preferida de la invención el macho es un ser humano.

En otra realización preferida de la invención, la sustancia es FSH.

En otra realización preferida de la invención, la sustancia es rFSH.

En otra realización preferida de la invención, el macho presenta una aberración cromosómica numérica en los espermatozoides.

En otra realización preferida de la invención, la aberración cromosómica numérica en espermatozoides es la diploidía.

En otra realización preferida de la invención, la aberración cromosómica numérica en espermatozoides es la disomía de los cromosomas sexuales.

En otra realización preferida de la invención, el macho presenta una aneuploidía en los espermatozoides de al menos o aproximadamente el 1%.

En otra realización preferida de la invención, el macho presenta una diploidía en los espermatozoides de al menos o aproximadamente el 0,5%.

Otro grupo preferido de pacientes está representado por machos que presentan una diploidía de al menos o aproximadamente el 0,8%.

Otro grupo preferido de pacientes está representado por machos que presentan una aneuploidía y un nivel en suero basal de testosterona total de al menos o aproximadamente 5.000 pg/ml.

En otra realización preferida de la invención, la administración de la sustancia se realiza en días alternos.

En otra realización preferida de la invención, la sustancia se administra a, o aproximadamente a, 75 a 300 UI/dosis, preferiblemente a 150 UI/dosis.

En otra realización preferida de la invención, el paciente macho se someterá a Tecnología de Reproducción Asistida tal como IVF (fertilización *in vitro*) e ICSI (inyección de espermatozoides intracitoplásmica).

En otra realización preferida de la invención, el tratamiento del paciente macho con una sustancia seleccionada entre FSH y variantes de FSH, se realiza durante al menos un tiempo seleccionado entre una semana, un mes, tres meses, seis meses y un año, preferiblemente al menos tres meses antes de someterse a la Tecnología de Reproducción Asistida.

En una realización más preferida, la invención proporciona el uso de rFSH para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la reducción de la aneuploidía de los espermatozoides en un paciente.

La invención es útil en un método para reducir la aneuploidía de los espermatozoides en un paciente, que comprende administrar una dosis eficaz de una sustancia seleccionada entre rFSH al paciente.

A continuación se describirá la invención por medio de los siguientes Ejemplos, que no se deben considerar, en modo alguno, limitantes de la presente invención. Los Ejemplos harán referencia a las Figuras especificadas en la presente memoria más abajo.

Descripción de las figuras

La Figura 1 representa la variación de los porcentajes de aneuploidía total en diferentes fases del tratamiento, esto es, 150 UI/día en días alternos (-45: 45 días antes del tratamiento; 0: el día del tratamiento antes del tratamiento; 90: 90 días después del inicio del tratamiento).

La Figura 2 representa la variación de los porcentajes de diploidía respectivamente en diferentes fases del tratamiento, esto es, 150 UI/día en días alternos (-45: 45 días antes del tratamiento; 0: el día del tratamiento antes del tratamiento; 90: 90 días después del inicio del tratamiento).

La Figura 3 representa la variación del porcentaje de disomía total en diferentes fases del tratamiento, esto es, 150 UI/día en días alternos (-45: 45 días antes del tratamiento; 0: el día del tratamiento antes del tratamiento; 90: 90 días después del inicio del tratamiento).

Abreviaturas

Kg (kilogramos), **mg** (miligramos), **min** (minuto), **ml** (mililitro), **mM** (milimolar), **m²** (metro cuadrado), **ng** (nanogramo), **pg** (picogramo).

ART (Técnica de Reproducción Asistida), **BMI** (índice de masa corporal), **CEP** (Sondas de Enumeración Cromosómica), **DAPI** (4,6-diamino-2-fenilindol), **DHEA** (Deshidro-epiandrosterona), **DTT** (ditiotritol, Biorad), **EDTA** (ácido etilendiaminotetraacético), **FIVET** (Fertilización *In Vitro* y Transferencia de Embriones), **FISH** (Hibridación *in situ* con Fluorescencia), **FSH** (Hormona Estimuladora del Folículo), **hCG** (Gonadotropina Coriónica humana), **ICSI** (Inyección de Esperma Intracitoplásmica), **IM** (intra-muscular), **IVF** (Fertilización *In Vitro*), **UI** (Unidad Internacional), **LIS** (sal de litio de ácido 3,5-di-yodosalicílico), **MESA** (Aspiración de Esperma Epididimal Microquirúrgica), **OAT** (oligoastenoteratozoospermia), **PESA** (Aspiración de Esperma Epididimal Percutánea), **rFSH** (FSH Recombinante), **RIA** (Radioinmunoensayo), **RT** (temperatura ambiente), **SEM** (Microscopía Electrónica de Barrido), **SC** (subcutáneo), **SCC** (cloruro de sodio/citrato de sodio), **TEM** (Microscopía Electrónica de Transmisión), **TESA** (Aspiración de Esperma Testicular), **TESE** (Extracción de Esperma Testicular), **TSH** (Hormona Estimuladora del Tiroides), **uFSH** (FSH urinaria), **USP** (Farmacopea de los Estados Unidos), **WFI** (Agua para Inyectables).

Ejemplos

La invención se ilustrará por medio de los siguientes ejemplos que no se deben considerar limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Efecto de GONAL-f® (hFSH recombinante de SERONO) sobre la aneuploidía en espermatozoides de varones infértiles humanos (8 pacientes)

a) Selección de pacientes infértiles

Se determina la infertilidad de los pacientes después de una consulta andrológica que comprende registro de espermiograma, medición hormonal (Androstenediona (A), testosterona total (Ttot), DHEA, Prolactina (PRL), TSH, tiroxina libre (FT4) y microdelección del cromosoma Y.

Los valores normales son los siguientes:

A: 1.200-5.000 ng/ml; **T tot:** 1.500-11.400 pg/ml; **PRL:** 2-15 ng/ml; **FT4:** 50-120 ng/ml; **FSH:** 0,7-10 mUI/ml.

Se obtienen muestras de sangre entre las 9-11 a.m. Las medidas se realizan por medio de kits de RIA o ELISA comerciales.

b) Tasas de aneuploidía/diploidía en la determinación de cromosomas sexuales mediante análisis FISH antes del tratamiento

Las muestras recientes de esperma se lavaron con NaCl 150 mM y Tris-HCl 10 mM (pH 8), se aplicaron en frotis sobre portas de vidrio y se secaron al aire. Después se fijaron en metanol-ácido acético 3:1 durante 10 minutos. Los portas se deshidrataron en etanol frío al 70%, 80% y 100% y se secaron al aire. Las muestras se hincharon tratándolas con DTT (ditiotritol, Biorad) 0,01 M en Tris-HCl 0,1 M (pH 8) y después LIS (sal de litio de ácido 3,5-di-yodosalicílico, Sigma) en el mismo tampón, verificando que la cabeza del espermatozoo se había hinchado. Los portas, enjuagados en 2X SSC (pH 7) y secados al aire, se deshidrataron y se desnaturalizaron en formamida al 70% (Aldrich) 2X SSC a 73°C durante 4 minutos. Después se deshidrataron rápidamente en una serie de etanol graduada a 0°C y se secaron al aire.

Durante esta última etapa, se utilizaron CEP (Chromosome Enumeration Probes, Vysis, IL, USA) - sondas de ADN satélite para los cromosomas X, Y y 18 unidas directamente con diferentes fluorocromos. La mezcla de sondas se desnaturalizó durante 5 minutos a 73°C en un baño de agua. La hibridación se llevó a cabo a 37°C en una cámara húmeda durante 12 horas. Después los portas se lavaron con 0,4X SSC-0,3% de NP40 durante 2 minutos a 73°C, rápidamente en 2X SSC - 0,1% de NP40 a RT y finalmente se montaron con DAPI 125 ng/ml en solución protectora de las señales fluorescentes (solución "antidesvanecimiento") (Vysis, IL, USA). Se analizaron un total de 3.500-5.000 espermatozoides mediante FISH coloreado triple.

Criterios de puntuación

La eficacia de hibridación global era de >99%. Los núcleos de los espermatozoides se puntuaron según el criterio de Martin *et al.*, 1995, Mol. Reprod. Dev. 42(1):89-93. Los núcleos de los espermatozoides se puntuaban solamente si están intactos, no solapados y tienen un límite claramente definido.

ES 2 284 052 T3

En el caso de la aneuploidía, se confirmó la presencia de cola en los espermatozoides. Un espermatozoide se consideraba disómico si las dos manchas fluorescentes eran del mismo color, de tamaño, forma e intensidad equiparables y se situaban dentro del borde de la cabeza del espermatozoide al menos un dominio aparte.

La diploidía se reconocía por la presencia de dos manchas fluorescentes dobles, que seguían los criterios anteriores. La observación y puntuación se realizó en un Microscopio Optico Leitz Aristoplan equipado con aparato de fluorescencia, con un filtro de triple paso de banda para Fluorocromos Aqua, Orange, Green (Vysis, IL, USA) y un filtro monocromo para DAPI.

Se seleccionaron los pacientes que tenían las siguientes características:

La diploidía representaba el 50,24% de la aneuploidía total observada antes del tratamiento.

- Prueba positiva para la presencia de diploidía $\geq 0,8\%$ mediante medición FISH de los espermatozoides eyaculados como se ha descrito antes.
- Niveles en suero de FSH < 10 UI/ml.

Se excluyeron del estudio los pacientes que presentaban al menos una de estas características:

- Índice de masa corporal $[(BMI = \text{peso (kg)}/\text{altura (m}^2\text{)} \times 100] < 30$;
- Presencia de infección en las vías espermáticas (esto es, clamidia, ureaplasma, micoplasma) en la línea base;
- Trastornos autoinmunitarios conocidos;
- Trastornos y/o patologías de tiroides;
- Hepatopatías crónicas;
- Presencia de condiciones patológicas concomitantes que estén contraindicadas en el tratamiento con FSH.

c) Protocolo de tratamiento

Se administró a los pacientes una dosis igual a 150 UI (2 viales s.c.) en días alternos durante 3 meses.

d) Determinación de las tasas de aneuploidía/diploidía mediante análisis FISH después del tratamiento. Las tasas de aneuploidía y diploidía en cromosomas sexuales se miden mediante análisis FISH después del tratamiento siguiendo el protocolo detallado antes (b).

Se encontró una reducción en la diploidía en un -54% en un tamaño de muestra de 8 pacientes consecutivos (intervalo de confianza del 95%: -20% a -87%; $n=3$; $p=0,02$).

Se encontró una reducción en la frecuencia de aneuploidía de los cromosomas sexuales en un tamaño de la muestra de 8 pacientes consecutivos.

Ejemplo 2

Efecto de GONAL-f® sobre la diploidía y la aneuploidía en 19 varones infértiles humanos

a) Selección de los pacientes

Se seleccionaron un total de 23 pacientes varones infértiles de 18 a 55 años de edad. Su infertilidad se determina según el protocolo detallado en el Ejemplo 1.

b) Tratamiento

Se administró a 19 pacientes una dosis igual a 150 UI (2 viales s.c.) en días alternos durante 3 meses y 4 pacientes no se trataron.

Los porcentajes de aneuploidía total, diploidía y disomía total se miden mediante la prueba FISH (ver Ejemplo 1) 45 días antes del tratamiento (-45), el día del tratamiento antes del tratamiento (0).

La aneuploidía total se calcula como la suma de la diploidía y la disomía total. Se calculan los porcentajes de disomías específicas (disomía de los cromosomas sexuales y disomía del cromosoma 18). La disomía del cromosoma sexual se analiza adicionalmente en porcentajes detallados de disomía para los cromosomas XX, YY y XY.

c) *Mediciones de las variables*

Después de 3 meses de tratamiento (90), los pacientes experimentan los mismos reconocimientos que se realizaron al principio del estudio y se repiten las pruebas FISH para medir cada parámetro de aneuploidía, diploidía y disomía.

d) *Análisis estadístico de las medidas*

La significación estadística de las diferencias entre las medias se calcula utilizando el protocolo detallado en el Ejemplo 1.

Los efectos del tratamiento de 3 meses con GONAL-f® sobre la aneuploidía total y la diploidía se refieren respectivamente en las Figuras 1 y 2.

Se observan una reducción del 38,4% en la aneuploidía total y una reducción del 40,7% en la diploidía.

El efecto del tratamiento de 3 meses con GONAL-f® sobre la disomía total es referido en la Figura 3. El principal efecto de reducción sobre la disomía total observado después del tratamiento se debe a la reducción de la disomía sexual total (-29,3%). Se ha encontrado que la principal contribución a la reducción de la disomía sexual total se debe a la reducción del porcentaje de la disomía XX (-35,5%) y la disomía YY (-50%).

Estos resultados muestran que un tratamiento con FSH recombinante en hombres puede reducir significativamente la aneuploidía total, especialmente la diploidía y la disomía de los cromosomas sexuales.

Ejemplo 3

Efecto de GONAL-f® sobre la diploidía y la aneuploidía en 22 varones infértiles humanos

Se han analizado los datos estadísticos para 3 pacientes más que fueron seleccionados en el Ejemplo 2 pero que no fueron incluidos en los cálculos del Ejemplo 2.

Los efectos mostrados en el Ejemplo 2 sobre la aneuploidía total, la diploidía y la disomía sexual se confirman para la muestra de pacientes ampliada (22 pacientes); se observan una reducción del 32% en la aneuploidía total, una reducción del 33% en la diploidía y una reducción del 26% en la disomía sexual total.

Se ha encontrado que la principal contribución a la reducción en la disomía sexual total se debe a una reducción en el porcentaje de disomía XX (-32%) y disomía XY (-21%).

Ejemplo 4

Efecto de GONAL-f® sobre la diploidía y la aneuploidía en 6 varones infértiles humanos

El protocolo utilizado era el mismo que el utilizado en el Ejemplo 2, excepto que la dosis administrada de FSH era de 300 UI en días alternos y el número de pacientes inscritos era de 6.

El análisis de las variables después de 90 días de tratamiento se realizó como se describe en el Ejemplo y también mostró un descenso en las aberraciones cromosómicas (aneuploidía, diploidía, disomía de los cromosomas sexuales totales, disomía de los cromosomas XY, YY, XX).

Para la significación estadística, los resultados de los 6 pacientes con la dosis más alta (300 UI) se acumularon a los del estudio en los 22 pacientes que recibían la dosis más baja (dosis de 150 UI del Ejemplo 3).

Este análisis acumulado dio como resultado las siguientes conclusiones: el tratamiento con FSH condujo a una reducción del 30% en la aneuploidía total, una reducción del 32% en la diploidía, una reducción del 28% en la disomía sexual total, se observaban una reducción del 23% en la disomía de los cromosomas XY y una reducción del 30% en la disomía de los cromosomas XX.

Por lo tanto, el incremento del número de pacientes, si bien incrementaba la significación estadística confirmaba el efecto beneficioso del tratamiento con FSH en la aneuploidía masculina.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de una sustancia seleccionada entre la Hormona Estimuladora del Folículo (FSH) y una variante de la FSH para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la reducción de alteraciones cromosómicas de los gametos en un macho.
2. El uso según la reivindicación 1, donde las alteraciones cromosómicas de los gametos son alteraciones numéricas.
- 10 3. El uso según las reivindicaciones 1 o 2, donde las alteraciones cromosómicas numéricas de los gametos son la diploidía de los espermatozoides.
- 15 4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las alteraciones cromosómicas numéricas de los gametos son la disomía de los cromosomas sexuales.
5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el macho es un ser humano.
6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sustancia es FSH.
- 20 7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sustancia es rFSH.
8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sustancia se administra en días alternos.
- 25 9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sustancia se administra en una cantidad de o aproximadamente de 75 a 300 UI/dosis.
10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sustancia se administra en una cantidad de o aproximadamente de 150 UI/dosis.
- 30 11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sustancia es rFSH y el macho humano padece una aneuploidía de los gametos.

Figura 1

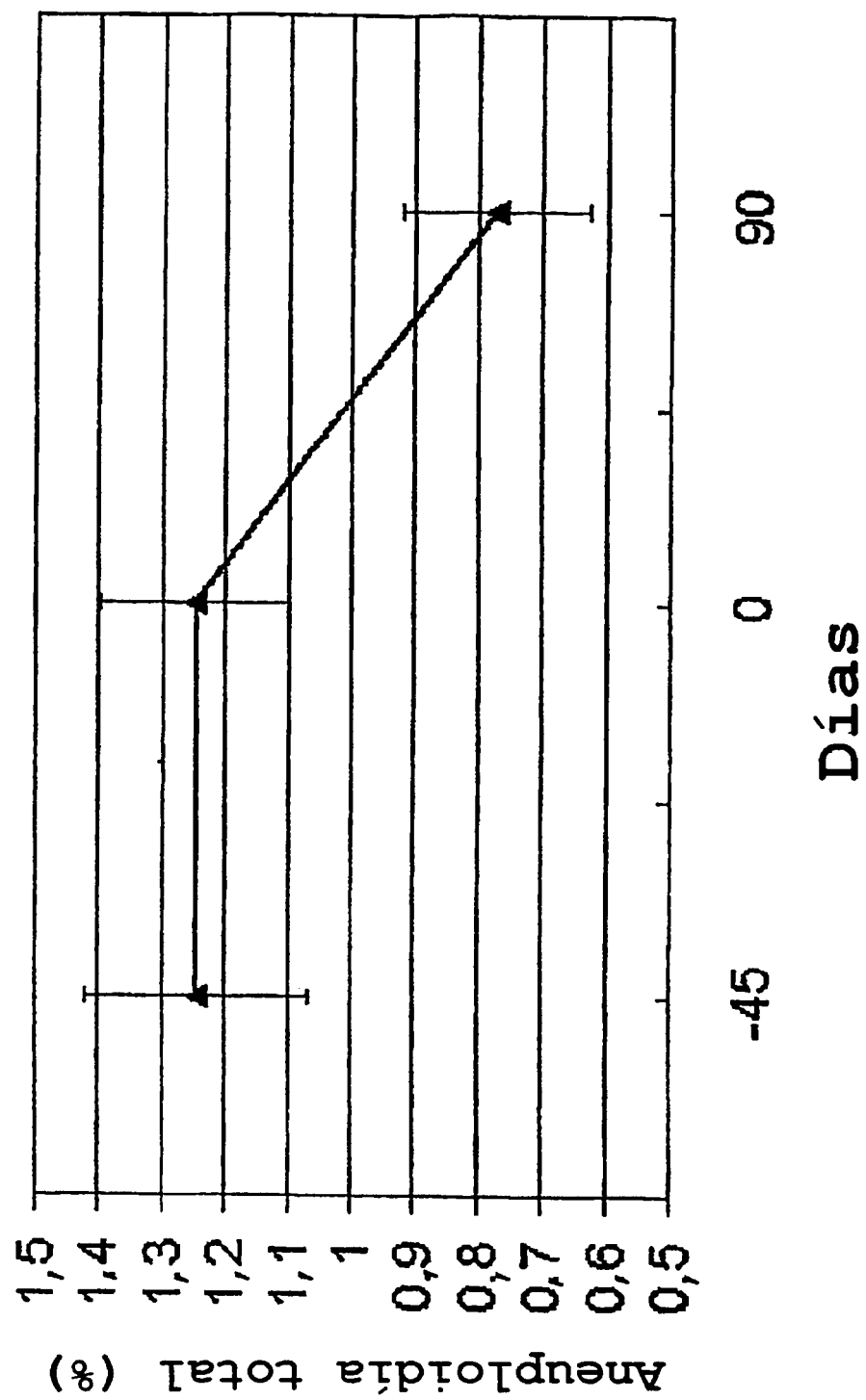


Figura 2

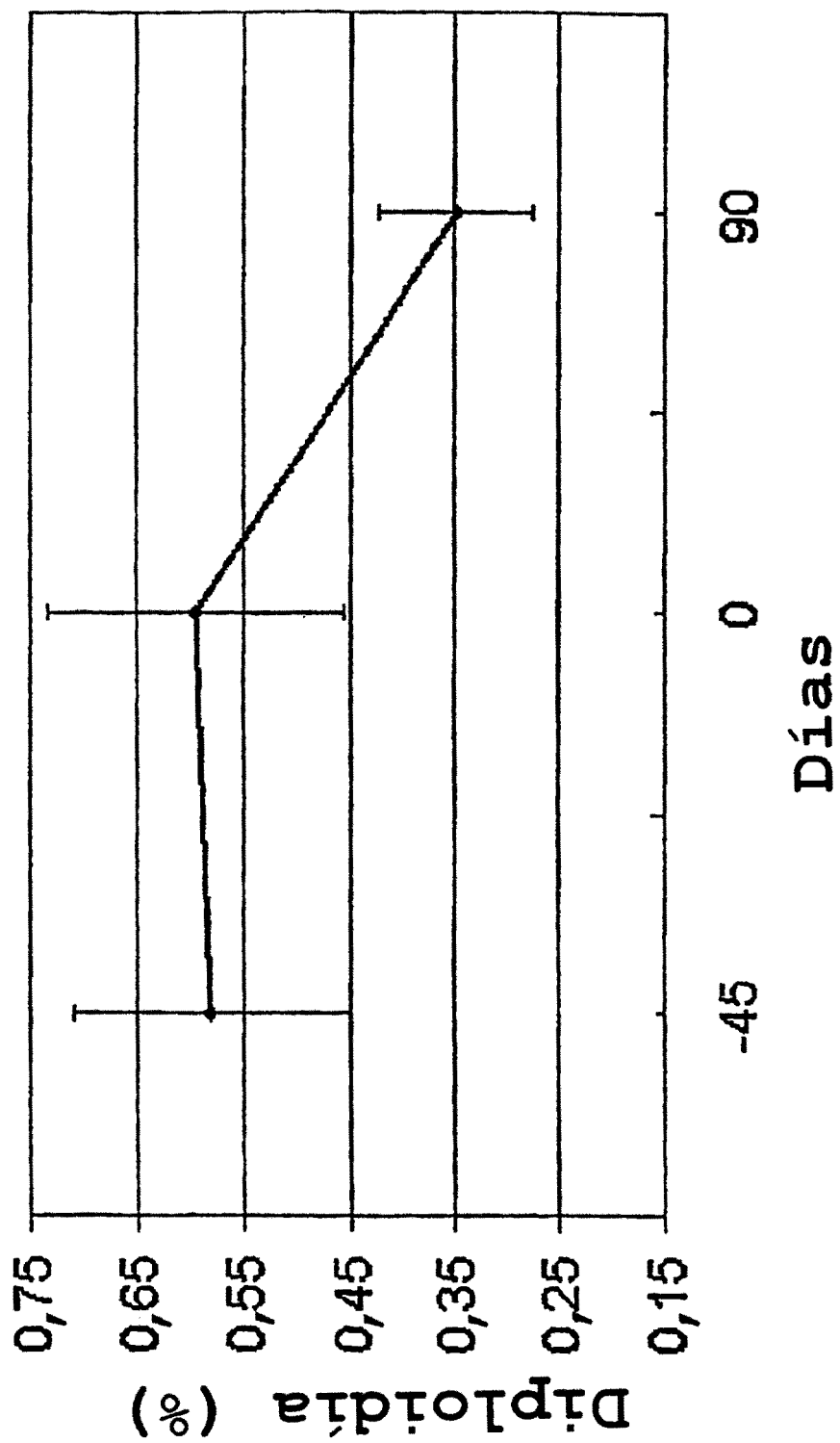


Figura 3

