

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 028**

51 Int. Cl.:

A61K 38/24 (2006.01)

A61P 15/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2004** **E 04735774 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013** **EP 1633389**

54 Título: **Combinación unitaria de FSH y hCG**

30 Prioridad:

03.06.2003 US 452926

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.03.2014

73 Titular/es:

**FERRING B.V. (100.0%)
P.O. BOX 3129 2130 KC POLARISAVENUE 144
2132 JX HOOFFDORP, NL**

72 Inventor/es:

FILICORI, MARCO

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 451 028 T3

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

Combinación unitaria de FSH y hCG

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a formulaciones de gonadotropina novedosas. Más específicamente, la invención se refiere a formulaciones farmacéuticas, útiles para estimulación ovárica, en las que están presentes tanto la hormona estimulante del folículo (FSH) como la gonadotropina coriónica humana (hCG).

Antecedentes de la invención

10 Los procedimientos de tecnología de reproducción asistida (TRA) normalmente requieren tratamiento con gonadotropinas exógenas para estimular el crecimiento y la maduración de los folículos ováricos. Cuando se usan gonadotropinas para tratar mujeres anovulatorias, el objetivo es repetir el ciclo menstrual normal, cuando un folículo dominante individual madura antes de la inducción de la ovulación. En cambio, para mujeres que se someten a fecundación *in vitro* (FIV), se emplea la estimulación ovárica controlada (EOC) para estimular el crecimiento y la maduración de varios folículos ováricos, produciendo múltiples ovocitos, que se recuperan entonces para su uso en el de procedimiento de FIV.

15 A pesar de los avances recientes en TRA, la estimulación ovárica a través de gonadotropinas exógenas no es satisfactoria de manera uniforme debido, en parte, a las respuestas individuales variables al tratamiento con gonadotropinas. Esta variabilidad complica el tratamiento de la paciente y puede dar como resultado nacimientos múltiples y potencialmente complicaciones potencialmente mortales.

20 Las gonadotropinas se secretan por la glándula pituitaria bajo el control de la hormona liberadora de gonadotropina hipotalámica (GnRH). La hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH) son las hormonas de la pituitaria esenciales para la maduración folicular (foliculogénesis) y la luteinización. Se requiere la FSH para la acumulación folicular (es decir, el crecimiento temprano de folículos ováricos) al comienzo del ciclo menstrual espontáneo, y también apoya la foliculogénesis en fase intermedia y tardía.

25 Se administra terapéuticamente FSH para inducir foliculogénesis en mujeres anovulatorias y mujeres que se someten a EOC. En los métodos de estimulación ovulatoria tradicionales, se administra FSH durante todo el tratamiento hasta el momento en que se recuperan los ovocitos. Esta estimulación continuada mediante FSH puede producir concepciones múltiples y el estado potencialmente mortal, síndrome de hiperestimulación ovárica (SHEO). Disminuir la dosificación de FSH puede reducir el riesgo de SHEO, pero dosificaciones de FSH bajas producen cantidades de folículo inadecuadas y por tanto disminuyen las probabilidades de éxito en la reproducción asistida.

30 La LH funciona durante todas las fases de un ciclo menstrual normal. La LH estimula las células de la teca del folículo para producir el sustrato androgénico que se convierte en estrógeno mediante el sistema aromatasa en las células de la granulosa. Durante las fases tardías de la maduración folicular, aproximadamente de 5 a 7 días antes de la ovulación, los folículos ováricos grandes comienzan a expresar receptores de LH en células de la granulosa, lo que hace que esos folículos sean sensibles a LH para la maduración y el desarrollo continuados. Hillier *et al.*, *Mol. Cell Endocrinol.* 100:51 (1994), Campbell *et al.* *J. Reprod. Fertil.* 117:244 (1999). A continuación, un aumento súbito de la LH a la mitad del ciclo desencadena la fase final de maduración folicular y la ovulación en un ciclo menstrual normal. La ovulación sigue al aumento súbito de LH a la mitad del ciclo en un plazo de 24 a 48 horas. Finalmente, en la segunda parte del ciclo menstrual, la fase lútea, la producción estimulada por LH de estrógeno y progesterona en el cuerpo lúteo del ovario prepara el útero para la implantación y el embarazo.

40 En los protocolos de estimulación ovárica, la hCG puede servir como una fuente de actividad de LH ya que la hCG y la LH actúan a través del mismo receptor. Filicori *et al.* *Human Reprod.* 17:2009 (2002a); Martin *et al.*, *Fertil. Steril.* 76: 0-49 (2002). En relación con la LH, la hCG tiene una semivida más larga y, por tanto, es más potente que la LH, aunque la bibliografía tiende a tratar a la hCG y la LH como intercambiables. De hecho, la bibliografía científica generalmente no menciona determinar la fuente de actividad de LH en preparaciones de gonadotropina de origen natural. Pero véase Filicori *et al.*, *Human Reprod.* Actualización 8: 543, 552 (2002b) (se extrapola "el contenido en hCG probable de [una] preparación de hMG [particular]" a "~5 UI por ampolla," de manera que, "de las 75 UI de potencia de LH contenidas en esta preparación de hMG, se proporcionan aproximadamente 30 UI por la hCG").

50 La bibliografía da a conocer el uso de la actividad de LH o dosis bajas de hCG en combinación con FSH durante toda la estimulación ovulatoria, pero falta la orientación en cuanto a las cantidades y los momentos eficaces de complementación de actividad de LH. Por ejemplo, el resumen de Martin *et al.*, *Fertil. Steril.* 76: 0-49 (2002), da a conocer la administración diaria de 2,5 µg de hCG recombinante (manteniendo niveles séricos de hCG de desde 1-3 mUI/ml) durante la estimulación ovulatoria. Gordon *et al.* dan a conocer la administración de 75 UI de FSH con 0, 1, 25 y 75 UI de actividad de LH. *Human Reprod.* 12 (Supl. 1): 52 (1997a); *ibid.*: 53 (1997b).

55 Estudios publicados dan a conocer la administración de actividad de LH, durante toda la estimulación, a razones de FSH con respecto a LH de 150:0, 150:37,5, 150:75 y 150:150. Filicori *et al.* (2002a). Además, la bibliografía documenta complementar la estimulación de FSH con 50 UI de hCG/día (Filicori *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. &*

Metabol. 84: 2659 (1999)), y protocolos en los que se administran 150 UI de FSH durante 7 días, seguido por tratamiento con razones de FSH con respecto a hCG de 150:0, 50:50, 25:100 y 0:200 (*ibid.* 87:1156 (2002c)).

5 La bibliografía documenta otras composiciones que contienen tanto actividad de FSH como de LH, así como el uso de FSH en combinación con actividad de LH. Por ejemplo, la solicitud PCT WO 00/67778, publicada el 16 de noviembre de 2000, se refiere al uso de LH o una cantidad equivalente de hCG en combinación con FSH para inducir foliculogénesis en mujeres anovulatorias. Más particularmente, la solicitud '778 da a conocer la administración de LH o "un análogo biológicamente activo del mismo" en dosis de 100 a 1500 UI al día (página 4, líneas 26-29) y en razones de FSH:LH que oscilan entre 1:1,5 y 1:20 (*id.*, líneas 16-18).

10 La patente estadounidense n.º 5.929.028 se refiere a formulaciones líquidas que contienen una o más gonadotropinas naturales o recombinantes, incluyendo FSH, LH y hCG. La patente '028 trata de composiciones derivadas de manera natural de gonadotropina menopáusica humana (hMG), que tienen actividades de FSH y LH en una razón de aproximadamente 1:1, pero no menciona ninguna razón de actividad de FSH con respecto a de LH distintas de la razón 1:1 de preparaciones comerciales de hMG.

15 Adicionalmente, hay formulaciones comerciales que contienen tanto FSH como LH. Están disponibles preparaciones derivadas de ser humano que contienen 75 UI de FSH con 75 UI de actividad de LH (Pergonal, Humegon, Menogon, Repronex y Menopur) y 75 UI de FSH con 25 ó 35 UI de actividad de LH (Normegon y Pergogreen).

20 Según el conocimiento convencional, sin embargo, niveles de LH "excesivos", aunque mal definidos, dan como resultado atresia folicular, supresión de proliferación celular de la granulosa y luteinización prematura. Véase, generalmente, Filicori, Fertil. Steril. 79: 253 (2003). Aunque el trabajo reciente sugiere otra cosa, persiste una noción en el campo de que los niveles de actividad de LH deben estar dentro de un determinado intervalo, y que niveles por debajo o por encima de un "techo de LH" afectan al desarrollo normal del folículo. Shoham, Fertil. Steril. 70: 1170 (2002).

25 En resumen, hay evidencia publicada de que complementar FSH con actividad de LH durante la inducción de la ovulación reduce la duración del tratamiento y la cantidad de gonadotropina usada para conseguir el desarrollo apropiado del folículo. Filicori *et al.* (1999), (2002b). Por otro lado, persiste la creencia de que "elevados" niveles de actividad de LH tienen efectos negativos en el desarrollo del folículo.

30 Esta creencia ha guiado el paradigma convencional de la estimulación ovárica, que implica la administración de FSH durante toda la estimulación ovárica controlada. La actividad de LH exógena se considera innecesaria e incluso perjudicial durante las fases tempranas a intermedias del desarrollo folicular. Por consiguiente, los medios tradicionales de estimulación ovárica suponen el tratamiento con FSH sola, normalmente a 75 UI/día. En este protocolo tradicional, la actividad de LH se administra para inducir ovulación sólo una vez que el folículo alcanza una determinada fase de desarrollo. Sólo recientemente se ha administrado actividad de LH durante todo el tratamiento, y la cantidad y el momento óptimos de actividad de LH que es eficaz en este contexto siguen siendo controvertidos.

Sumario de la invención

35 Los protocolos convencionales de estimulación de la ovulación no se adaptan a regímenes de tratamiento selectivo que optimizan el desarrollo del folículo ovárico. Además, las preparaciones gonadotrópicas disponibles no se adaptan fácilmente a diferentes objetivos terapéuticos. Por tanto, existe una necesidad de composiciones que combinen FSH y hCG en razones variables, para permitir de ese modo al médico adaptar un régimen de tratamiento con gonadotropina a las necesidades de la paciente individual. También se necesita metodología para usar tales composiciones para estimular la foliculogénesis en mujeres anovulatorias y en el contexto de procedimientos de TRA.

40 Para estos fines, entre otros, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen diversas cantidades de FSH y hCG, así como diversas razones de FSH con respecto a hCG, suministradas en una preparación individual. Estos compuestos permiten al médico optimizar la estimulación ovulatoria de manera flexible, no posible con las preparaciones disponibles.

La presente invención también comprende un enfoque para inducir ovulación, mediante el uso de composiciones con razones variables de FSH:hCG. La metodología inventiva permite ajustes por incremento de la razón de FSH con respecto a hCG, como una función de la fase de foliculogénesis o de variación en la respuesta de la paciente, dando como resultado una estimulación ovulatoria más segura y más satisfactoria.

50 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que consiste en FSH y hCG en al menos un portador farmacéuticamente aceptable, en la que la cantidad de FSH y hCG se selecciona del grupo que consiste en: 50 UI de FSH y 100 UI de hCG; 50 UI de FSH y 200 UI de hCG; 75 UI de FSH y 25 UI de hCG; 75 UI de FSH y 50 UI de hCG; 75 UI de FSH y 75 UI de hCG; 75 UI de FSH y 100 UI de hCG; 150 UI de FSH y 10 UI de hCG; 150 UI de FSH y 25 UI de hCG; 150 UI de FSH y 50 UI de hCG; 150 UI de FSH y 75 UI de hCG; y 150 UI de FSH y 100 UI de hCG. Con respecto a esto, el uso de la expresión "consiste esencialmente en" significa que la composición, aunque teniendo posiblemente otros constituyentes, no incluye ningún componente que inhiba o limite de otra manera las propiedades beneficiosas de la composición con respecto a la foliculogénesis o maduración folicular.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso, en la fabricación de un medicamento para inducir ovulación, de una composición farmacéutica que consiste en FSH y hCG en al menos un portador farmacéuticamente aceptable caracterizado por una cantidad de FSH y hCG que se selecciona del grupo que consiste en 50 UI de FSH y 100 UI de hCG; 50 UI de FSH y 200 UI de hCG; 75 UI de FSH y 25 UI de hCG; 75 UI de FSH y 50 UI de hCG; 75 UI de FSH y 75 UI de hCG; 75 UI de FSH y 100 UI de hCG; 150 UI de FSH y 10 UI de hCG; 150 UI de FSH y 25 UI de hCG; 150 UI de FSH y 50 UI de hCG; 150 UI de FSH y 75 UI de hCG; y 150 UI de FSH y 100 UI de hCG.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra valores de razón útiles de FSH con respecto a hCG, donde la cantidad de FSH se expresa en unidades internacionales (UI) y la cantidad de hCG se expresa en UI (figura 1A) y microgramos (figura 1B).

La figura 2 es un gráfico de barras que representa un protocolo de tratamiento propuesto según la invención, usando composiciones de FSH: hCG tal como se describió anteriormente.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La invención proporciona composiciones y métodos para un paradigma terapéutico novedoso, caracterizado por la administración de hCG en combinación con FSH durante todas las fases de tratamiento y por un ajuste de la razón de FSH con respecto a hCG, para optimizar la estimulación ovulatoria. Este paradigma se aparta sustancialmente del enfoque convencional, donde se administra FSH sola, normalmente a 75-300 UI/día, y se administra un bolo de actividad de LH a la mitad del ciclo para inducir ovulación.

La invención proporciona composiciones farmacéuticas con un intervalo de razones de FSH con respecto a hCG. Las composiciones y usos de la invención permiten al médico adaptar fácilmente el tratamiento a una situación de paciente dada, permitiendo afinar la razón de FSH con respecto a hCG basándose en diferentes fases de foliculogénesis y la respuesta variable de la paciente a gonadotropinas. Además, tener una variedad de composiciones terapéuticas disponible, incluyendo aquellas con elevados niveles de hCG, permite al médico adaptar fácilmente las necesidades terapéuticas de diversos procedimientos de TRA. Esta flexibilidad no es posible con las preparaciones gonadotrópicas actuales.

Debido a que las composiciones de la invención tienen un amplio intervalo de razones de FSH con respecto a hCG, la invención puede usarse fácilmente para estimular foliculogénesis y ovulación en cualquier procedimiento de inducción de ovulación y TRA incluyendo entre otros, tratamiento de infertilidad anovulatoria, fecundación in vitro (FIV), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IICE), transferencia intrafalopiana de gametos (TIFG), transferencia intrafalopiana de cigotos (TIFC), transferencia de embrión crioconservado, inseminación intrauterina (IUI), transferencia de ovocitos de donante, transferencia de embrión crioconservado de ovocitos de donante y ciclos de TRA para transferencia a útero huésped. Las composiciones y usos de la invención también pueden usarse para tratar pacientes anovulatorias y pacientes con hipogonadismo hipogonadotrófico y el síndrome de ovario poliquístico.

Las composiciones de la invención emplean hCG como fuente de actividad de LH. La hCG se une a receptores de LH y ejerce a través de ellos sus acciones biológicas; no existen receptores de hCG separados. El uso de hCG según la invención tiene ventajas significativas con respecto al uso de LH. Por ejemplo, hCG derivada de ser humano es menos cara que cualquiera de FSH recombinante o derivada de ser humano. Desde una perspectiva de coste, por tanto, es favorable minimizar la cantidad de FSH usada durante el protocolo de estimulación. Además, el uso de hCG en una composición farmacéutica de la invención apoya de manera más fisiológica y eficaz las fases finales de maduración de folículos ováricos maduros y grandes durante la EOC, aumenta los niveles de estrógenos sanguíneos y ováricos, mejora la calidad del ovocito y el embrión, disminuye la cantidad y duración de la administración de FSH y reduce el riesgo de complicaciones asociadas con FSH tales como concepciones múltiples y SHEO.

En resumen, las composiciones y usos de la invención habilitan regímenes de tratamiento que consiguen tasas de éxito superiores, que disminuyen el riesgo de complicaciones, que son fáciles de implementar y que son menos costosas que las de la práctica convencional.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos científicos y técnicos se usan de una manera que se adapta al uso técnico común. Generalmente, la nomenclatura de esta descripción y los procedimientos de laboratorio descritos se conocen bien y se emplean comúnmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para métodos de ácido nucleico recombinante, cultivo microbiano, cultivo celular, cultivo tisular, transformación, química analítica, química de síntesis orgánica, síntesis química, análisis químico y formulación y administración farmacéuticas. Generalmente, las reacciones enzimáticas y etapas de purificación y/o aislamiento se realizan según las especificaciones del fabricante. En ausencia de indicación en sentido contrario, las técnicas y procedimientos en cuestión se realizan según la metodología convencional dada a conocer, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), y CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1989).

Combinaciones unitarias de FSH y hCG

La invención proporciona composiciones farmacéuticas novedosas útiles para inducir estimulación ovárica en un mamífero. "Mamífero" se refiere a un ser humano, primate no humano, oveja, cerdo, vaca, caballo, burro, ratón, rata, conejo, cobaya, perro, gato o animal salvaje en cautividad. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

5 Las composiciones farmacéuticas consisten en FSH y hCG en al menos un portador farmacéuticamente aceptable, en las que la cantidad de FSH y hCG se selecciona del grupo que consiste en: 50 UI de FSH y 100 UI de hCG; 50 UI de FSH y 200 UI de hCG; 75 UI de FSH y 25 UI de hCG; 75 UI de FSH y 50 UI de hCG; 75 UI de FSH y 75 UI de hCG; 75 UI de FSH y 100 UI de hCG; 150 UI de FSH y 10 UI de hCG; 150 UI de FSH y 25 UI de hCG; 150 UI de FSH y 50 UI de hCG; 150 UI de FSH y 75 UI de hCG; y 150 UI de FSH y 100 UI de hCG.

10 En una realización más preferida, la composición contiene 50 UI de FSH y 100 UI de hCG, o 50 UI de FSH y 200 UI de hCG. Estas razones son útiles en protocolos de tratamiento que requieren administraciones múltiples ya que puede administrarse fácilmente más de una ampolla.

Puede obtenerse FSH purificada mediante cualquier método conocido en la técnica. FSH, tal como se usa en el presente documento, incluye FSH recombinante y derivada de ser humano, análogos de FSH, así como formas desglucosiladas, no glicosiladas y glicosiladas modificadas.

15 FSH derivada de ser humano puede purificarse mediante cualquier medio conocido en la técnica a partir de fuentes naturales tales como orina, pituitaria y placenta. Los procedimientos para el aislamiento de FSH derivada de ser humano se describen en, por ejemplo, Fevold *et al.* *Endocrinology* 26:999 (1940), Fraenkel-Conrat *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 46:627 (1940), McShan y Meyer, *J. Biol. Chem.* 135:473 (1940), Greep *et al.*, *ibid.* 133:289 (1940), Li *et al.*, *Science* 109:445 (1949) y Roos y Gemzell, CIBRA FOUNDATION STUDY GROUP, n.º 22 (Little, Brown y Co., Boston, MA, 1965).

20 FSH derivada de ser humano purificada está disponible comercialmente y se vende con los nombres Fostimon[®] (AMSA/IBSA), Metrodin HP[®] (Serono) y Bravelle (Ferring). Puede obtenerse FSH recombinante mediante cualquiera de varios medios conocidos. Por ejemplo, Keene *et al.*, *J. Biol. Chem.* 26:4769 (1989) y el documento WO 86/04589 describen la expresión y purificación de FSH humana biológicamente activa en células de roedor.

25 La FSH recombinante también está disponible comercialmente con los nombres Follistim[®] (Organon), Puregon[®] (Organon) y Gonalf[®] (Serono).

30 Puede ser ventajoso emplear isoformas de FSH que difieren en el grado en que se modifican postraducionalmente. Debido a diferentes modificaciones, las isoformas muestran diferencias en la carga global, el grado de ácido siálico (un azúcar terminal) o la incorporación de sulfato, la afinidad de unión al receptor y la semivida en plasma. Chappel *et al.*, *Endocrine Reviews* 4:179 (1983); Snyder *et al.* *Mol. Cell. Endocrin.* 54:115 (1987). Estas formas pueden separarse entre sí basándose en su carga global y todas las isoformas muestran actividad biológica. Las isoformas que muestran una carga negativa neta mayor están sialiladas en mayor medida, muestran una tasa de aclaramiento metabólico más larga y una mayor actividad biológica debido a su tiempo de permanencia en plasma ampliado.

35 Puede obtenerse hCG mediante cualquier medio conocido en la técnica. La hCG, tal como se usa en el presente documento, incluye hCG derivada de ser humano y recombinante. La hCG derivada de ser humano puede purificarse de cualquier fuente apropiada (por ejemplo orina y placenta) mediante cualquier método conocido en la técnica tal como se da a conocer en Zondek y Aschheim, *Klin. Wochenschr.* 7: 931 (1928), Katzman *et al.*, *ibid.* 148:501 (1943) y Claesson *et al.*, *Acta Endocrinol.* 1: 1 (1948), entre otros. La hCG humana purificada está disponible comercialmente y se vende con los nombres Profasi HP[®] (Serono), Gonasi[®] (AMSA/IBSA) y Choragon, Novarelin (Ferring). Se conocen en la técnica métodos de expresión y purificación de hCG recombinante y se dan a conocer, por ejemplo, en Gupta y Dighe, *J. Mol. Endocrinology* 22: 273 (1999).

40 La hCG recombinante posee aproximadamente una actividad 25 veces mayor en peso en comparación con la hCG derivada de ser humano. Por ejemplo, véase Chang *et al.*, *Fertil. Steril.* 76: 67 (2001); The European Recombinant Human Chorionic Gonadotrophin Study Group, *Fertil. Steril.* 75: 1111 (2001). Por tanto, la cantidad de hCG puede ajustarse en consecuencia para proporcionar las unidades internacionales deseadas de actividad de hCG cuando se usa hCG recombinante en las composiciones. Un ajuste en esta línea, basado en los valores de la figura 1A, se representa en la figura 1B.

45 La cantidad de actividad de FSH y hCG puede determinarse usando métodos de ensayo conocidos en la técnica. 1 UI de hCG es equivalente a 5-7 UI de LH en el bioensayo de Van Hell de farmacopea. Van Hell *et al.*, *Acta Endocrin.* 47: 409 (1964). La actividad de hCG en una composición puede determinarse usando cualquier método de ensayo conocido, incluyendo el bioensayo de Van Hell, ensayos de radioreceptor tal como se describe, por ejemplo, en Dighe & Moudgal, *Arch. Biochem. Biophys.* 225: 490 (1983), bioensayos de animal completo, ensayo de agotamiento de ácido ascórbico ovárico y el bioensayo de células de Leydig MA10 dados a conocer en Ascoli, *Endocrinology* 108: 88 (1981). De manera similar, la actividad de FSH puede determinarse usando ensayos de unión a receptor y bioensayos de animal completo.

55 La cantidad de proteína hCG y FSH en una composición dada puede determinarse por el peso del compuesto sólido, ensayos de proteínas, tales como los ensayos de Bradford y Lowry, y técnicas de inmunoensayo tales como ELISA

e inmunotransferencia de tipo Western.

5 Pueden formularse composiciones de FSH:hCG mezclando, en una disolución acuosa, productos de hCG y FSH purificados, con ajustes en serie para conseguir la razón de FSH:hCG deseada, seguido por filtración estéril, carga estéril y, si se desea, liofilización. La composición de FSH:hCG también puede formularse usando un método, en el que se establecen condiciones de purificación que producen la razón de FSH:hCG deseada en el primer caso (es decir, sin combinación como tal).

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse dando lugar a composiciones bien conocidas para cualquier vía de administración de fármacos, por ejemplo, oral, rectal, parenteral (intravenosa, intramuscular o subcutánea), intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, local (polvos, pomadas o gotas), o como un pulverizador bucal o nasal. Una composición típica para tal fin comprende un portador farmacéuticamente aceptable, tal como disoluciones acuosas, excipientes no tóxicos, incluyendo sales, conservantes, tampones y similares, tal como se describe en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 15ª Ed. (Mack Publishing Co., 1975), en las páginas 1405-12 y 1461-87, y THE NATIONAL FORMULARY XIV, 14 Ed. (American Pharmaceutical Association, 1975), entre otros.

15 Ejemplos de portadores diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo.

20 Las composiciones de la presente invención también pueden contener aditivos tales como pero sin limitarse a conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Pueden incluirse agentes antibacterianos y antifúngicos para prevenir el crecimiento de microbios e incluyen, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico y similares. Además, puede ser deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro de sodio y similares.

25 En algunos casos, para efectuar una acción prolongada es deseable ralentizar la absorción de FSH y hCG a partir de inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede realizarse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con baja solubilidad en agua. La tasa de absorción de FSH y hCG depende entonces de su tasa de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retrasada de una forma de combinación de FSH y hCG administrada por vía parenteral se realiza disolviendo o suspendiendo la combinación de FSH y hCG en un vehículo de aceite.

30 Las formas de absorción lenta inyectables pueden obtenerse formando matrices microencapsuladas de la combinación de FSH y hCG en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la razón de combinación de FSH y hCG con respecto a polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la tasa de liberación de la combinación de FSH y hCG. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). También se preparan formulaciones de absorción lenta inyectables mediante atrapamiento de la combinación de FSH y hCG en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

35 Pueden esterilizarse formulaciones inyectables, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o mediante incorporación de agentes de esterilización en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes de su uso. Pueden suministrarse formulaciones inyectables en cualquier recipiente adecuado, por ejemplo vial, cartuchos de inyección, jeringuilla precargados y similares.

40 Pueden suministrarse las formulaciones inyectables como un producto que tiene composiciones farmacéuticas que contienen o bien FSH o bien hCG adecuadas para su administración por separado o juntas. Si se administran por separado, la administración puede ser secuencial. Puede suministrarse el producto en cualquier envase apropiado. Por ejemplo, un producto puede contener varias jeringuillas precargadas que contienen o bien FSH, hCG, o bien una combinación tanto de FSH como de hCG, las jeringuillas envasadas en un paquete de blíster u otros medios para mantener la esterilidad. Un producto puede contener opcionalmente instrucciones para el uso de las formulaciones de FSH y hCG.

45 El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan según la práctica de rutina en este campo. Véase GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS, 7ª ed.

50 En una realización preferida, las composiciones de la invención se suministran como composiciones para administración parenteral. Se conocen en la técnica métodos generales para la preparación de las formulaciones parenterales y se describen en REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, citado anteriormente, en las páginas 780-820. Las composiciones parenterales pueden suministrarse en formulación líquida o como un sólido que se mezclará con un medio inyectable estéril justo antes de su administración. En una realización especialmente preferida, se suministran las composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para la facilidad de administración y uniformidad de dosificación.

“Forma unitaria de dosificación” en esta descripción se refiere a unidades físicamente diferenciadas que son aptas como dosificaciones unitarias para tratar a un sujeto mamífero, donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculado para producir los efectos terapéuticos deseados en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para la forma unitaria de dosificación novedosa de la invención viene dictada por y es directamente dependiente de las características únicas del material activo y el efecto terapéutico particular que va a lograrse y las limitaciones inherentes en la técnica de composición de materiales activos para su uso en sujetos mamíferos.

Una forma farmacéutica unitaria puede contener una composición farmacéutica individual que consiste en FSH y hCG en al menos un portador farmacéuticamente aceptable, en la que la cantidad de FSH y hCG se selecciona del grupo que consiste en: 50 UI de FSH y 100 UI de hCG; 50 UI de FSH y 200 UI de hCG; 75 UI de FSH y 25 UI de hCG; 75 UI de FSH y 50 UI de hCG; 75 UI de FSH y 75 UI de hCG; 75 UI de FSH y 100 UI de hCG; 150 UI de FSH y 10 UI de hCG; 150 UI de FSH y 25 UI de hCG; 150 UI de FSH y 50 UI de hCG; 150 UI de FSH y 75 UI de hCG; y 150 UI de FSH y 100 UI de hCG. Expresadas en proporciones, FSH y hCG están presentes cada una generalmente en desde aproximadamente 0,1 µg hasta aproximadamente 2000 mg/ml.

Las suspensiones pueden contener agentes de modificación de reología tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

Un experto habitual en la técnica apreciará que pueden determinarse empíricamente las cantidades eficaces de FSH y hCG y las razones de FSH con respecto a hCG apropiadas. Las composiciones pueden administrarse a un sujeto, que necesita estimulación ovárica, como composiciones farmacéuticas en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Se entenderá que, cuando se administran a una paciente humana, el uso diario total de los agentes o composición de la presente invención se decidirá por el médico encargado dentro del alcance del criterio médico sólido. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específica para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores: el tipo y grado de respuesta que va a conseguirse; la actividad del agente o composición específico/a empleado/a; los agentes o composición específicos/a empleados/a; la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo y dieta de la paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del agente; la duración del tratamiento y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Uso de combinaciones de “vial individual” de FSH y hCG en la estimulación ovulatoria

Basándose en los objetivos del tratamiento, puede seleccionarse una composición con la razón de FSH con respecto a hCG apropiada y puede administrarse la composición o una serie de composiciones durante todo el periodo de estimulación ovárica. El médico puede iniciar la estimulación con una razón y luego ajustar las razones de FSH con respecto a hCG durante todo el ciclo. Los ajustes realizados durante el tratamiento pueden basarse en el momento de administración durante el ciclo o en respuesta a indicadores foliculogénicos o esteroideogénicos, tales como el número y tamaño de folículos y los niveles de hormona de la paciente.

Por ejemplo, en el tratamiento de mujeres anovulatorias caracterizadas por amenorrea hipogonadotrópica, las composiciones de la invención pueden seleccionarse y administrarse para imitar los niveles de actividad de FSH y LH que se producen durante un ciclo menstrual normal. Una composición con una razón de FSH con respecto a hCG de 100:5 (no de la invención) inicialmente se administraría diariamente. A partir del día seis, por ejemplo, se monotorizarían los niveles séricos de estradiol y el número y tamaño de los folículos. Una vez que se detecten al menos dos folículos mayores de 12 mm y niveles de estradiol superiores a 200 pg/ml, el tratamiento continuará usando una composición de la invención con una razón de FSH con respecto a hCG de 50:200 que se administrará hasta que se logren parámetros de maduración finales de al menos un folículo mayor de 17 mm y niveles de estradiol superiores a 400 pg/ml. Una vez alcanzados los parámetros de maduración finales, se desencadenará la ovulación con 10.000 UI de hCG.

Estudios clínicos preliminares demuestran los efectos positivos de administrar hCG antes de inducir la ovulación. En la tabla 1 se proporcionan los resultados de un estudio. Cuatro grupos de mujeres recibieron 250 UI de FSH al día durante los primeros ocho días de un ciclo de EOC. A partir de aproximadamente el día nueve y continuando hasta aproximadamente el día doce, el grupo I continuó recibiendo 250 UI de FSH al día, el grupo II recibió 50 UI de FSH y 100 UI de hCG al día (composición de la invención), el grupo III recibió 50 UI de FSH y 200 UI de hCG al día (composición de la invención) y el grupo IV recibió 50 UI de FSH y 400 UI de hCG al día (ejemplo comparativo). La ecografía preovulatoria reveló un incremento en el número de folículos grandes (> 14 mm) para los grupos que recibieron hCG. Además, se recuperaron cerca del doble de ovocitos tras la ovulación en los grupos II y III, que recibieron 100 UI de hCG y 200 UI de hCG al día en composiciones de la invención, respectivamente. La tasa de fecundación y el número de embriones de buena calidad fueron similares entre todos los grupos, pero el número de embarazos fue aproximadamente tres veces superior para el grupo que recibió 100 UI de hCG al día que el grupo recibiendo FSH sola. Este estudio demuestra que el uso de FSH y hCG juntos, en las fases tardías de inducción de la ovulación, aumenta el número de folículos grandes en desarrollo, aumenta el número de ovocitos recuperados y puede mejorar las tasas de embarazo.

Las composiciones farmacéuticas pueden coadministrarse con uno o más de otros compuestos o moléculas.

“Coadministrado” se refiere a administración simultánea en la misma formulación o en dos formulaciones diferentes.

5 Las composiciones de la invención pueden administrarse con o tras agonistas y antagonistas de GnRH. Se usan agonistas y antagonistas de GnRH para procedimientos de inducción de la ovulación para prevenir la ovulación espontánea durante la administración de gonadotropina. El antagonista de GnRH suprime la actividad de LH endógena, dando como resultado menos ovocitos viables. Por consiguiente, las composiciones de la invención pueden administrarse al comienzo del tratamiento con antagonistas de GnRH para proporcionar niveles de actividad de LH que son suficientes para estimular el desarrollo del folículo y la maduración del ovocito.

10 Para proporcionar flexibilidad adicional, las composiciones de la invención pueden coadministrarse con las preparaciones de gonadotropina disponibles actualmente, tales como preparaciones de FSH pura, hCG pura, LH pura y hMG.

15 Las composiciones de FSH:hCG se administran secuencialmente durante toda la estimulación ovárica. Administración “secuencial” se refiere a una diferencia de tiempo de segundos, minutos, horas o días entre la administración de las composiciones. Cada administración secuencial subsiguiente puede estar compuesta por una composición con la misma razón de FSH con respecto a hCG que la administración previa o una razón de FSH con respecto a hCG diferente. En una realización preferida, la administración secuencial se realiza con composiciones de FSH:hCG que difieren en la razón de FSH con respecto a hCG. En una realización más preferida, cada composición subsiguiente contiene una mayor cantidad de hCG con respecto a la composición precedente en la serie. En una realización especialmente preferida, la razón de FSH con respecto a hCG se cambia de manera incremental tal como se muestra en la figura 2.

20 En la realización más preferida, la razón de FSH con respecto a hCG se ajusta durante todo la serie en respuesta a la reacción de la paciente a la composición de FSH:hCG tal como se indica mediante marcadores esteroidogénicos y foliculogénicos. Cuando se forman 2-4 folículos intermedios (12-14 mm) y se logran niveles de estradiol de 200-600 pg/ml, esto es una indicación de que se ha logrado la foliculogénesis adecuada mediante una preparación rica en FSH y es apropiado cambiar a una preparación rica en hCG.

25 Deben monitorizarse la foliculogénesis y la esteroidogénesis durante toda la estimulación ovárica mediante cualquier medio conocido en la técnica. La monitorización de los niveles de hormona y el tamaño de los folículos proporcionan información en cuanto a la respuesta ovárica durante el régimen de tratamiento y permite al médico ajustar la razón de FSH con respecto a hCG durante el tratamiento. El tamaño de los folículos puede determinarse, por ejemplo, usando ecografía pélvica transvaginal. Se clasifican los folículos como grandes (>14 mm), intermedios (10-14 mm) o pequeños (<10 mm). Pueden realizarse una ecografía pélvica transvaginal frecuentemente, por ejemplo en los días de tratamiento 0, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20, hasta la administración preovulatoria de hCG.

30 Los niveles de estradiol pueden medirse usando cualquier medio conocido en la técnica a partir de cualquier fluido corporal apropiado (por ejemplo sangre, orina y saliva), usando un inmunoensayo o un ensayo quimioluminiscente.

Estimulación ovulatoria controlada para fecundación *in vitro*

35 El tratamiento se inicia a la mitad de la fase lútea de un ciclo menstrual espontáneo cuando se administra un agonista de GnRH. Se comienza la inducción de ovulación 1-2 semanas más tarde, tras una menstruación espontánea. Alternativamente, se administra un antagonista de GnRH a partir del 6º día de estimulación ovárica. Las pacientes reciben inyecciones diarias de 200 UI de FSH:10 UI de hCG desde el día 1 y continuando hasta la aparición de al menos 4 folículos >11 mm y niveles séricos de estradiol > 600 pg/ml. A partir de este día y hasta el final del tratamiento, las pacientes reciben una administración diaria de 50 UI de FSH:200 UI de hCG.

40 La monitorización del tratamiento se lleva a cabo durante todo el periodo de administración de FSH:hCG. Cada día se extrae una muestra de sangre entre las 08:00 y las 09:00 y se preparan las muestras séricas de una forma convencional. Se determinan los niveles de estradiol. Se realizan una ecografía transvaginal frecuentemente durante el tratamiento con FSH:hCG y hasta justo antes de la administración de hCG preovulatoria. Se monitorizan los niveles de estradiol usando ensayos de quimioluminiscencia (Chiron Corp. Diagnostics ACS 180, Milán, Italia).

45 Una vez alcanzados los parámetros de maduración finales (cuatro folículos de >14 mm y niveles de 17β-estradiol de 800-1500 pg/ml) se administra un bolo de hCG, por ejemplo 10.000 UI de hCG para desencadenar ovulación y se recuperan los ovocitos.

50 Tabla 1. Efectos de razones de FSH:hCG variables en el desenlace de las fases tardías de estimulación ovárica para reproducción asistida

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Dosis diaria objetivo de rFSH hasta cambio	250	250	250	250

ES 2 451 028 T3

Dosis diaria objetivo de rFSH tras cambio	NA	50	50	50
Dosis diaria objetivo de hCG tras cambio	NA	100	200	400
Ciclos comenzados	20	20	20	20
Ciclos de estimulación completados	15	18	17	17
Tasa (% de participantes que completaron el ciclo de estimulación)	75%	90%	85%	85%
Pacientes que responden al tratamiento (las que completaron los ciclos de estimulación)				
Duración de tratamiento global (días)	11,3±0,4	12,0±0,2	12,2±0,3	12,1±0,2
Administración de FSH (días)	11,3±0,4	8,1±0,2	8,4±0,2	7,8±0,3
Administración de hCG (días)	NA	3,9±0,2	3,9±0,2	4,3±0,2
Cantidad real de rFSH administrada (UI totales durante toda la duración del ciclo)	2833±103	2211±52	2297±49	2156±58
Cantidad real de hCG administrada (UI totales durante toda la duración del ciclo)	NA	394±21	776±34	1718±75
<u>Ecografía preovulatoria</u>				
Folículos pequeños (<10 mm)	5,9±0,5	2,8±0,3	2,4±0,2	1,9±0,1
Folículos intermedios (10-14 mm)	6,4±0,7	3,4±0,6	3,2±0,8	3,1±0,4
Folículos grandes (>14 mm)	7,4±1,1	14,2±1,1	16,7±1,5	15,3±1,6
Folículos totales (por pacientes que responden al tratamiento)	19,7±2,0	20,4±1,7	22,3±2,0	20,3±1,8
<u>Resultados de TRA</u>				
Ovocitos recuperados (por ciclo de estimulación)	7,5±1,4	13,2±1,2	13,5±1,7	9,8±1,3
Tasa de fecundación (ovocitos fecundados/ovocitos)	64±7%	64±3%	65±4%	61±7

ES 2 451 028 T3

recuperados)				
Embriones de buena calidad (ovocitos de buena calidad/número total de embriones obtenidos)	83±7%	83±5%	80±5%	73±8%
Embriones transferidos (por ciclo de estimulación)	2,0±0,2	2,3±0,1	2,4±0,1	2,4±0,2
Pruebas de embarazo positivas	2	8	4	4
Tasa de pruebas de embarazo positivas (por ciclos de estimulación totales)	13%	44%	24%	24%
Embarazos detectados por ecografía	2	7	4	3
Tasa de embarazos detectados por ecografía (por ciclos de estimulación totales)	13%	39%	24%	18%
Gestaciones de gemelos	0	0	1	0
Abortos (espontáneos)	0	1	0	2
Tasa de aborto (por número total de embarazos obtenidos)	0%	14%	0%	67%

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que consiste en FSH y hCG en al menos un portador farmacéuticamente aceptable, en la que la cantidad de FSH y hCG se selecciona del grupo que consiste en: 50 UI de FSH y 100 UI de hCG; 50 UI de FSH y 200 UI de hCG; 75 UI de FSH y 25 UI de hCG; 75 UI de FSH y 50 UI de hCG; 75 UI de FSH y 75 UI de hCG; 75 UI de FSH y 100 UI de hCG; 150 UI de FSH y 10 UI de hCG; 150 UI de FSH y 25 UI de hCG; 150 UI de FSH y 50 UI de hCG; 150 UI de FSH y 75 UI de hCG; y 150 UI de FSH y 100 UI de hCG.
2. Composición según la reivindicación 1, libre de cualquier otra proteína originaria de mamífero.
- 10 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, en la que la cantidad de FSH y hCG se selecciona del grupo que consiste en 50 UI de FSH y 100 UI de hCG; y 50 UI de FSH y 200 UI de hCG.
4. Composición farmacéutica según cualquier reivindicación anterior, en la que dicha FSH es FSH derivada de ser humano.
5. Composición farmacéutica según cualquier reivindicación anterior, en forma liofilizada.
6. Composición farmacéutica según cualquier reivindicación anterior, en forma farmacéutica unitaria.
- 15 7. Composición farmacéutica según cualquier reivindicación anterior, en forma farmacéutica sólida.
8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, en la que la forma farmacéutica sólida se selecciona del grupo que consiste en cápsulas, comprimidos, supositorios, píldoras, polvos y gránulos.
9. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en forma líquida.
10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que la forma líquida se suministra en un vial.
- 20 11. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que la forma líquida se suministra en un cartucho o jeringuilla precargado/a.
12. Conjunto que comprende un primer vial y un segundo vial, conteniendo cada uno de dichos viales una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que la cantidad de FSH y hCG difiere entre el primer vial y el segundo vial.
- 25 13. Uso, en la fabricación de un medicamento para inducir ovulación, de una composición farmacéutica que consiste en FSH y hCG en al menos un portador farmacéuticamente aceptable caracterizado por una cantidad de FSH y hCG que se selecciona del grupo que consiste en 50 UI de FSH y 100 UI de hCG; 50 UI de FSH y 200 UI de hCG; 75 UI de FSH y 25 UI de hCG; 75 UI de FSH y 50 UI de hCG; 75 UI de FSH y 75 UI de hCG; 75 UI de FSH y 100 UI de hCG; 150 UI de FSH y 10 UI de hCG; 150 UI de FSH y 25 UI de hCG; 150 UI de FSH y 50 UI de hCG; 150 UI de FSH y 75 UI de hCG; y 150 UI de FSH y 100 UI de hCG.
- 30 14. Uso según la reivindicación 13, en el que la cantidad de FSH y hCG se selecciona del grupo que consiste en 50 UI de FSH y 100 UI de hCG y 50 UI de FSH y 200 UI de hCG.
15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que al menos dos composiciones farmacéuticas, caracterizadas por una cantidad de FSH y hCG seleccionada de dicho grupo, que es o bien la misma o bien difiere con respecto a dicha cantidad, son para su administración en serie.
- 35 16. Uso según la reivindicación 15, en el que cada composición subsiguiente en dicha serie contiene una cantidad de hCG que está aumentada con respecto a la composición precedente en dicha serie.
17. Uso según la reivindicación 15 ó 16, en el que el periodo de tiempo entre composiciones de la serie se selecciona del grupo que consiste en 1 hora, 5 horas, 10 horas, 12 horas, 24 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días y 15 días.
- 40 18. Uso según la reivindicación 13, en el que la composición comprende además FSH pura.
19. Uso según la reivindicación 13, en el que la composición comprende además hCG pura.
- 45 20. Producto que comprende una o más dosis unitarias de una formulación inyectable que comprende una composición farmacéutica individual que consiste en FSH y hCG en al menos un portador farmacéuticamente aceptable, en el que la cantidad de FSH y hCG se selecciona del grupo que consiste en: 50 UI de FSH y 100 UI de hCG; 50 UI de FSH y 200 UI de hCG; 75 UI de FSH y 25 UI de hCG; 75 UI de FSH y 50 UI de hCG; 75 UI de FSH y 75 UI de hCG; 75 UI de FSH y 100 UI de hCG; 150 UI de FSH y 10 UI de hCG; 150 UI de FSH y 25 UI de hCG; 150 UI de FSH y 50 UI de hCG; 150 UI de FSH y 75 UI de hCG; y 150 UI de FSH y 100 UI de hCG.

21. Producto según la reivindicación 20, suministrado en un cartucho o jeringuilla precargado/a.

FIGURA 1A

	FSH (UI)				
	50	75	100	150	200
hCG (UI)	1	1	1	1	1
	5	5	5	5	5
	10	10	10	10	10
	25	25	25	25	25
	50	50	50	50	50
	75	75	75	75	75
	100	100	100	100	100
	200	200	200	200	200
	300	300	300	300	300
	400	400	400	400	400

FIGURA 1B

	FSH (UI)				
	50	75	100	150	200
hCG recombinante (µg)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
	1	1	1	1	1
	2	2	2	2	2
	3	3	3	3	3
	4	4	4	4	4
	8	8	8	8	8
	12	12	12	12	12
	16	16	16	16	16

FIGURA 2

