

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 862**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08	(2009.01) A61P 15/08	(2006.01)
A61K 31/404	(2006.01)	
A61B 17/435	(2006.01)	
A61K 31/57	(2006.01)	
A61K 38/11	(2006.01)	
A61K 38/12	(2006.01)	
A61K 45/06	(2006.01)	
A61K 9/00	(2006.01)	
A61K 31/4045	(2006.01)	
A61K 31/565	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2014** **E 14199709 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019** **EP 3037101**

54 Título: **Terapia con antagonistas del receptor de oxitocina en la fase lútea para la implantación y embarazo en mujeres que se someten a tecnologías de reproducción asistida**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.06.2019

73 Titular/es:
FERRING B.V. (100.0%)
Polaris Avenue 144
2132 JX Hoofddorp, NL

72 Inventor/es:
ARCE, JOAN-CARLES

74 Agente/Representante:
SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 716 862 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

Terapia con antagonistas del receptor de oxitocina en la fase lútea para la implantación y embarazo en mujeres que se someten a tecnologías de reproducción asistida

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de un antagonista del receptor de oxitocina en hembras que se someten a transferencia de embriones como parte de una tecnología de reproducción asistida. Específicamente, los antagonistas se liberan en la fase lútea cuando el endometrio es receptivo para la implantación de embriones.

10

Antecedentes de la invención

La fertilización in vitro (IVF) es un método para establecer el embarazo en un sujeto hembra. El procedimiento típicamente implica la estimulación ovárica con una o diversas hormonas, principalmente la hormona estimulante del folículo (FSH), y se administra la gonadotropina coriónica humana (hCG) generalmente para desencadenar la maduración folicular final. La recuperación de ovocitos tiene lugar generalmente 2 días (alrededor de 36 h) después de la administración de hCG. Después los ovocitos se fertilizan in vitro, se cultivan durante varios días y se transfieren al útero. La IVF abarca además la transferencia de embriones que se originan de los huevos de la primera hembra (la donante) a una segunda hembra (la portadora gestacional). Los embriones pueden colocarse en almacenamiento congelado y transferirse después de varios meses o incluso años (es decir, transferencia de embriones congelados).

15

20

Mejorar la tasa de implantación de embriones transferidos es uno de los principales desafíos en el tratamiento con tecnologías de reproducción asistida (ART). Aproximadamente solo un tercio de los embriones transferidos se implantan en mujeres que se someten a estimulación ovárica controlada para la fertilización in vitro (IVF) / inyección intracitoplásmica de espermia (ICSI). Las tasas de implantación y embarazo están influenciadas por múltiples factores relacionados con la edad y otras características del paciente, la magnitud de la respuesta a la estimulación ovárica, la calidad de los embriones obtenidos, la receptividad del endometrio así como el procedimiento de transferencia existente.

25

La contractilidad uterina se considera un factor potencialmente importante que afecta las tasas de implantación y embarazo en los ciclos de IVF/ICSI (Fanchin y otros, 1998; Schoolcraft y otros, 2001; Bullett y de Ziegler 2005). Una alta frecuencia de contracciones uterinas al momento de la transferencia parece tener un impacto negativo en el resultado, posiblemente por la expulsión de los embriones en la cavidad uterina o por el desplazamiento de los embriones y reduciendo de este modo las tasas de implantación y embarazo.

30

35

Los datos observacionales indican una disminución en las tasas de embarazo clínico con el aumento de la frecuencia de las contracciones al momento de la transferencia de embriones en etapa de escisión en hCG +4 días (es decir, cuatro días después de la administración de hCG, que corresponde al día 2 después de la recuperación de ovocitos) (Fanchin y otros, 1998). Un estudio prospectivo controlado observó además que los pacientes con una mayor frecuencia de contracciones uterinas el día de la transferencia de embriones en etapa de escisión (día 3 después de la recuperación) tenían tasas de embarazo más bajas que los pacientes con una menor frecuencia de contracciones uterinas al momento de la transferencia (Zhu y otros, 2014).

40

La contractilidad uterina en los ciclos de estimulación ovárica controlada se ha comparado con los ciclos menstruales normales (Ayoubi y otros, 2003). Se encontró que la frecuencia de las contracciones uterinas es similar entre el punto de tiempo de la administración de hCG en un ciclo de estimulación ovárica controlada y el momento de la aparición de LH en un ciclo natural. En la fase lútea, la frecuencia de las contracciones uterinas fue mayor en hCG +4 días (que corresponde al día 2 después de la recuperación) en un ciclo de estimulación ovárica controlada en comparación con LH +4 días en un ciclo natural (Ayoubi y otros, 2003). Sin embargo, la frecuencia de las contracciones uterinas en LH +6 días y hCG +6 días (que corresponden al día 4 después de la recuperación) no fue diferente y en ambas situaciones fue baja, lo que indica un nivel idéntico de quiescencia uterina en ese punto de tiempo en los ciclos de estimulación ovárica controlada y naturales (Ayoubi y otros, 2003). En otro estudio, la contractilidad uterina se evaluó el día de la administración de hCG, hCG +4 días (que corresponde al día 2 después de la recuperación) y hCG +7 días (que corresponde al día 5 después de la recuperación) en mujeres que se sometieron a un ciclo de estimulación ovárica controlada (Fanchin y otros, 2001). La frecuencia de las contracciones uterinas fue mayor el día de la administración de hCG, disminuyó ligeramente durante la fase lútea temprana según se evaluó en hCG +4 días y alcanzó un estado casi quiescente en hCG+7 días (que corresponde al día 5 después de la recuperación). Otro estudio informó una disminución del número de contracciones de la zona de unión en las donantes de ovocitos en la fase lútea temprana desde el día 2 al día 3 y también al día 4 después de la recuperación (Lesny y otros, 1999). De manera similar, la evaluación de la contractilidad uterina en donantes de ovocitos que se habían sometido a estimulación ovárica controlada y recibido la suplementación de progesterona exógena en la fase lútea indicó que existe una disminución significativa de la frecuencia de las contracciones uterinas desde el día 2 después de la recuperación hasta el día 5 después de la recuperación (Blockeel y otros, 2009).

45

50

55

60

El nivel más alto de contractilidad uterina es al final de la estimulación ovárica controlada (el día de la administración de hCG) y se ha atribuido a concentraciones de estradiol sérico altas y de progesterona sérica bajas en ese punto de tiempo. Se considera que la disminución de la contractilidad uterina durante la fase lútea es el resultado de la exposición a

65

5 progesterona endógena provocada por la función del cuerpo lúteo en respuesta a la administración de hCG así como de la suplementación de progesterona exógena en la fase lútea usada en los ciclos de IVF/ICSI. Aunque la suplementación de progesterona se usa para el apoyo de la fase lútea en pacientes de IVF/ICSI y puede reducir la contractilidad uterina, existe una actividad uterina elevada durante la fase lútea temprana (día 2 o 3 después de la recuperación) cuando se realiza la transferencia de embriones en etapa de escisión.

10 Como la contractilidad uterina se eleva durante la fase lútea temprana (día 2 o 3 después de la recuperación) cuando se realiza la transferencia de embriones en etapa de escisión, se han realizado investigaciones en la fase lútea temprana que evalúan el impacto de diferentes intervenciones sobre la contractilidad uterina para mejorar la implantación (transferencia día 2 y 3 después de la recuperación; hCG +4 días). Se realizaron ensayos controlados aleatorizados (Moon y otros, 2004; Bernabeu y otros, 2006; Kim y otros, 2008; Ng y otros, 2014), ensayos controlados cuasialeatorizados (Moraloglu y otros, 2010), estudios retrospectivos en ciclos de reemplazo de embriones frescos y congelados (Chou y otros, 2011; Lan y otros, 2012), o estudios de casos en ciclos de reemplazo de embriones frescos y congelados (Pierzynski y otros, 2007; Liang y otros, 2009) que informan hallazgos con compuestos que reducen la contractilidad uterina, como atosiban (Kim y otros, 2008; Moraloglu y otros, 2010; Ng y otros, 2014), indometacina (Bernabeu y otros, 2006) y piroxicam (Moon y otros, 2004) los días 2 o 3 después de la recuperación, es decir, al momento de la transferencia de embriones en etapa de escisión.

20 Un ensayo controlado aleatorizado reciente (Ng y otros, 2014) comparó el resultado del tratamiento después de la administración de atosiban o placebo en pacientes de IVF/ICSI seguido de la transferencia de embriones en etapa de escisión el día 2 o el día 3 después de la recuperación. Este gran estudio se diseñó para determinar si podría confirmarse la evidencia anecdótica encontrada en los estudios más pequeños anteriores. Este ensayo controlado, aleatorizado, doble ciego, grande (N=800), diseñado adecuadamente no encontró un aumento significativo en las tasas de implantación o de nacidos vivos con atosiban en comparación con placebo, como lo ilustran las tasas de nacidos vivos del 39,8 % frente al 38,0 %, respectivamente (Ng y otros, 2014). Por lo tanto la administración de Atosiban el día 2 o el día 3 después de la recuperación no aumenta significativamente las tasas de implantación o de nacidos vivos. En consecuencia, mejorar la implantación de embriones transferidos permanece como uno de los principales desafíos en el tratamiento con tecnologías de reproducción asistida (ART). Es un objetivo de la presente descripción mejorar las tasas de implantación, aumentando de este modo las tasas de embarazo y las tasas de nacidos vivos.

30 Resumen de la invención

35 Un aspecto de la descripción proporciona un antagonista del receptor de oxitocina para el uso en aumentar la tasa de implantación en curso, aumentar la tasa de embarazo en curso, aumentar la tasa de embarazo clínico y/o aumentar la tasa de nacidos vivos en un sujeto hembra que se somete a transferencia de embriones como parte de una tecnología de reproducción asistida, en donde el antagonista se proporciona a la hembra de manera que el efecto del antagonista está presente cuando la hembra está en (o se superpone con) la etapa de endometrio receptivo y cuando el embrión ha alcanzado la etapa de blastocisto. El antagonista se proporciona de manera que se libera en la etapa de endometrio receptivo y cuando el embrión ha alcanzado la etapa de blastocisto. Preferentemente, el antagonista se administra cuando la hembra está en la etapa de endometrio receptivo y/o cuando el embrión ha alcanzado la etapa de blastocisto. En determinadas modalidades, el antagonista se formula para la liberación inmediata. En otras modalidades, el antagonista se formula como una formulación de liberación sostenida o retardada, como un depósito, y se administra antes de la etapa de endometrio receptivo y cuando el embrión todavía está en la etapa de escisión de manera que el antagonista se libera o continúa liberándose una vez que se alcanza la etapa de endometrio receptivo y/o el embrión ha alcanzado la etapa de blastocisto.

En modalidades preferidas, la etapa de endometrio receptivo corresponde a:

- 45 a) entre LH+6 a LH+9, preferentemente entre LH+6 a LH+8, con la máxima preferencia el día LH+7 de un ciclo de ovulación natural;
- 50 b) entre hCG+6 a hCG+9, preferentemente entre hCG+6 a hCG+8; con la máxima preferencia el día hCG+7 de un ciclo de ovulación inducida;
- 55 c) entre el día 4 al día 7, preferentemente entre el día 4 al día 6, con la máxima preferencia el día 5 o 6, con la máxima preferencia el día 5, de apoyo de la fase lútea, en donde el apoyo de la fase lútea comienza el día siguiente a la recuperación de ovocitos en un ciclo de IVF, preferentemente en donde la hembra se ha sometido a estimulación ovárica;
- 60 d) entre el día 4 al día 9, preferentemente entre el día 5 al día 7, con la máxima preferencia el día 5 o el día 6 de apoyo de la fase lútea preferentemente en preparación para la transferencia de embriones congelados o la IVF de terceros, preferentemente en donde el apoyo lúteo comienza después de que el endometrio se prepara inicialmente durante al menos 6 días con estrógeno exógeno.

Preferentemente, el apoyo de la fase lútea comprende la suplementación con progesterona, gonadotropina coriónica humana, estradiol y progesterona, progestinas y/o agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH).

65 En consecuencia, la descripción proporciona antagonistas del receptor de oxitocina que pueden usarse para preparar medicamentos para aumentar la tasa de implantación en curso, aumentar la tasa de embarazo en curso, aumentar la tasa de embarazo clínico y/o aumentar la tasa de nacidos vivos en un sujeto hembra que se somete a transferencia de

embriones como parte de una tecnología de reproducción asistida. La descripción abarca además los usos del antagonista del receptor de oxitocina para la preparación de un medicamento para el uso en una hembra que se somete a transferencia de un embrión en etapa de blastocisto. Los medicamentos se administran de manera que su efecto se superponga con la etapa de endometrio receptivo y cuando el embrión ha alcanzado la etapa de blastocisto. Los antagonistas en los medicamentos se liberan cuando la hembra está en la etapa de endometrio receptivo y cuando el embrión ha alcanzado la etapa de blastocisto. La descripción abarca además los métodos para aumentar la tasa de implantación en curso, aumentar la tasa de embarazo en curso, aumentar la tasa de embarazo clínico y/o aumentar la tasa de nacidos vivos, en un sujeto hembra que se somete a transferencia de embriones como parte de una tecnología de reproducción asistida, que comprende administrar a la hembra un antagonista del receptor de oxitocina de manera que el efecto del antagonista se superponga con la etapa de endometrio receptivo y cuando el embrión ha alcanzado la etapa de blastocisto. En modalidades preferidas, los métodos comprenden además transferir un embrión al útero, la cavidad uterina o las trompas de Falopio de una hembra, preferentemente en donde se transfiere un embrión en etapa de blastocisto.

La descripción proporciona además los métodos para implantar un embrión en un sujeto hembra, que comprende transferir un embrión al útero, la cavidad uterina o las trompas de Falopio de una hembra y administrar a la hembra un antagonista del receptor de oxitocina de manera que el efecto del antagonista se superponga con la etapa de blastocisto y/o la hembra esté en la etapa de endometrio receptivo.

En modalidades preferidas, la hembra se somete a la transferencia de un embrión en etapa de blastocisto y el antagonista se administra a la hembra de manera que el antagonista se libera a la hembra el mismo día que se transfiere el embrión. Preferentemente, el antagonista se administra entre 2 horas antes y 2 horas después de la transferencia de embriones (por ejemplo, en una formulación de liberación inmediata), preferentemente en donde el antagonista se administra dos veces, preferentemente en donde la primera administración se produce alrededor de 45 minutos antes de la transferencia de embriones y la segunda administración se produce alrededor de 60 minutos después de la primera administración. Preferentemente, un embrión en etapa de blastocisto tiene un estado de expansión y eclosión de 3, 4, 5 o 6, con mayor preferencia en donde el embrión en etapa de blastocisto es un embrión del día 5 después de la inseminación.

En modalidades preferidas, la hembra se somete a la transferencia de un embrión en etapa de escisión y el antagonista se administra a la hembra de manera que el antagonista se libera dos o tres días después que se transfiere el embrión. Preferentemente, un embrión en etapa de escisión tiene al menos 6 blastómeros y una fragmentación del 20 % o menos, preferentemente en donde el embrión en etapa de escisión es un embrión del día 2 o el día 3 después de la fertilización.

En modalidades preferidas, el antagonista es un antagonista selectivo del receptor de oxitocina o un antagonista del receptor de vasopresina/oxitocina. Con mayor preferencia, el antagonista es un antagonista selectivo del receptor de oxitocina.

Preferentemente, el antagonista es barusiban. Preferentemente, el barusiban se proporciona por vía subcutánea. Preferentemente, se administran entre 30-80 mg, con mayor preferencia 50 mg de barusiban. En algunas modalidades, la hembra se somete a la transferencia de un embrión en etapa de blastocisto y el barusiban se administra a la hembra como un depósito antes del día de la transferencia del embrión. Preferentemente, la hembra se somete a la transferencia de un embrión en etapa de blastocisto y el barusiban se administra a la hembra el mismo día de la transferencia del embrión. Preferentemente, se administran 40 mg de barusiban por vía subcutánea 45 minutos antes de la transferencia de embriones en etapa de blastocisto y se administran 10 mg de barusiban por vía subcutánea 60 minutos después de la primera administración.

Breve descripción de las figuras

- Figura 1: Ejemplos de antagonistas del receptor de oxitocina (Figura 1A y Figura 1B)
- Figura 2: Razón de posibilidades para la tasa de implantación en curso por día de transferencia para el ensayo clínico (BASIC)
- Figura 3: Tasa de implantación en curso por día de transferencia para el ensayo clínico (BASIC)

Descripción detallada de las modalidades descritas

Como se usa en la presente descripción, "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitante para significar que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero no se excluyen los elementos no mencionados específicamente. Además el verbo "consistir" puede reemplazarse por "consistir esencialmente en" lo que significa que un compuesto o compuesto adjunto como se define en la presente descripción puede comprender componente(s) adicional(es) a los identificados específicamente, dicho(s) componente(s) adicional(es) que no altera(n) la característica única de la invención.

Los artículos "un" y "una" se usan en la presente descripción para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A manera de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

La palabra "aproximadamente" o "alrededor de" cuando se usa en asociación con un valor numérico (aproximadamente 10, alrededor de 10) significa preferentemente que el valor puede ser el valor dado de 10 más o menos el 1 % del valor.

Cuando se hace referencia en la presente descripción a un intervalo como, por ejemplo, un intervalo de días, el intervalo incluye ambos puntos extremos. Por ejemplo, el día LH+6 al día LH+9 abarca el día LH+6, el día LH+7, el día LH+8 y el día LH+9.

5

Como se usa en la presente descripción, el término "embrión" se refiere a un cigoto de hasta ocho semanas después de la fertilización. La "transferencia de embriones" es el procedimiento en el cual se colocan uno o más embriones en el útero, la cavidad uterina o las trompas de Falopio de una hembra.

10

Como se usa en la presente descripción, un sujeto hembra es un mamífero que incluye animales de compañía, por ejemplo, perros y gatos; animales domésticos de ganado, tales como cerdos, caballos, burros, cabras, ovejas, llamas; así como especies raras y amenazadas. Preferentemente, el sujeto es un ser humano.

15

La tecnología de reproducción asistida (ART) se refiere a los métodos para lograr el embarazo mediante el uso de medios artificiales. Preferentemente, la ART se refiere a métodos en los cuales se transfiere un embrión fertilizado in vitro a un sujeto hembra, por ejemplo, mediante el uso de IVF/ICSI.

La "transferencia de embriones frescos" se refiere a la transferencia de embriones sin congelar primero los embriones.

20

El ciclo de ovulación natural varía de 21 a 35 días, con la duración promedio que es de 28 días. La primera parte del ciclo se denomina la fase folicular en la cual maduran los folículos ováricos. Continúa la ovulación mediante la cual un huevo maduro se libera en el oviducto. La fase lútea se refiere a la fase del ciclo de ovulación que comienza con la formación del cuerpo lúteo en LH+1 y que termina el día anterior al primer día de la menstruación.

25

La "tasa de implantación en curso" como se usa en la presente descripción se refiere al número de fetos viables intrauterinos 10-11 semanas después de la transferencia dividido por el número de embriones/blastocistos transferidos. Preferentemente, la administración de un antagonista del receptor de oxitocina como se describe en la presente descripción aumenta la tasa de implantación en curso en al menos un 5 %, con mayor preferencia en al menos un 10 % y con la máxima preferencia en al menos un 20 %.

30

La "tasa de embarazo en curso" como se usa en la presente descripción, se refiere a un embarazo con al menos un feto intrauterino viable 10-11 semanas después de la transferencia. Preferentemente, la administración de un antagonista del receptor de oxitocina como se describe en la presente descripción aumenta la tasa de embarazo en curso en al menos un 5 %, con mayor preferencia en al menos un 10 % y con la máxima preferencia en al menos un 20 %.

35

La "tasa de implantación" como se usa en la presente descripción se refiere al número de sacos gestacionales intrauterinos con latido cardíaco fetal 5-6 semanas después de la transferencia dividido por el número de embriones/blastocistos transferidos. Preferentemente, la administración de un antagonista del receptor de oxitocina como se describe en la presente descripción aumenta la tasa de implantación en curso en al menos un 5 %, con mayor preferencia en al menos un 10 % y con la máxima preferencia en al menos un 20 %.

40

La "tasa de embarazo clínico" como se usa en la presente descripción se refiere a un embarazo con al menos un saco gestacional intrauterino con latido cardíaco fetal 5-6 semanas después de la transferencia. Preferentemente, la administración de un antagonista del receptor de oxitocina como se describe en la presente descripción aumenta la tasa de embarazo clínico en al menos un 5 %, con mayor preferencia en al menos un 10 % y con la máxima preferencia en al menos un 20 %.

45

La "tasa de nacidos vivos" se refiere al número de nacidos vivos por mujeres tratadas. Preferentemente, la administración de un antagonista del receptor de oxitocina como se describe en la presente descripción aumenta la tasa de nacidos vivos en al menos un 5 %, con mayor preferencia en al menos un 10 % y con la máxima preferencia en al menos un 20 %.

50

Un aspecto de la descripción proporciona antagonistas del receptor de oxitocina para el uso en aumentar la tasa de implantación en curso, aumentar la tasa de embarazo en curso, aumentar la tasa de embarazo clínico y/o aumentar la tasa de nacidos vivos en un sujeto hembra que se somete a transferencia de embriones. Preferentemente, se aumenta la tasa de implantación en curso.

55

Grandes estudios anteriores en la técnica informan la administración de antagonistas del receptor de oxitocina en la fase lútea temprana (que corresponde al día 2 o 3 después de la recuperación) cuando la frecuencia de contracción uterina es alta. Sin embargo, los antagonistas del receptor de oxitocina no demostraron efectos mejorados sobre la implantación cuando se proporcionaron en la fase lútea temprana (Ng y otros, 2014). Por lo tanto, en determinadas modalidades, la presente invención excluye las formulaciones de liberación inmediata o de liberación sustancialmente inmediata de los antagonistas del receptor de oxitocina administrados en la fase lútea temprana (es decir, anterior a la etapa de endometrio receptivo).

60

65

La presente descripción demuestra la eficacia de los antagonistas del receptor de oxitocina en la implantación de embriones cuando se proporcionan después de la fase lútea temprana, o más bien, en la etapa de endometrio receptivo

y cuando el embrión ha alcanzado la etapa de blastocisto (Ejemplo 1). Dado que la frecuencia de las contracciones uterinas ha regresado o casi ha regresado a la línea base en esta etapa, es sorprendente que un antagonista del receptor de oxitocina tenga un efecto sobre la tasa de implantación.

5 La implantación es un proceso crítico en el cual un embrión se aposiciona, adhiere e invade el endometrio. El útero aceptará el embrión de implantación solo durante un período de tiempo limitado descrito como la "ventana de implantación" o "ventana receptiva" (Makrigiannakis y Minas 2006; Strowitzki y otros, 2006). La ventana de implantación es un período de unos pocos días en cual el endometrio adquiere la etapa receptiva que permite la adhesión e invasión del embrión (Koot y Macklon, 2013). Esta etapa se denomina en la presente descripción como la "etapa de endometrio receptivo".

10 La implantación exitosa depende no solo de un endometrio receptivo, sino también de un embrión funcional y de la comunicación sincronizada entre el embrión y los tejidos maternos. Por lo tanto, durante la ventana receptiva de implantación, el embrión también necesita estar en la etapa apropiada. La implantación se produce después de que un blastocisto eclosiona de la zona pelúcida. Por lo tanto, como se conoce bien en el campo de TAR, si se transfiere un embrión en etapa de blastocisto, la mujer debería estar idealmente en la etapa de endometrio receptivo, de manera que tanto el endometrio como el embrión se sincronizan para la implantación. Si se transfiere un embrión en etapa de escisión, entonces la mujer debe estar en la etapa pre-receptiva. El endometrio y el embrión se desarrollarán aún más de manera que cuando el embrión alcance la etapa de blastocisto, el endometrio habrá alcanzado la etapa receptiva.

15 En consecuencia, los antagonistas se administran de manera que el efecto del antagonista se superponga con la etapa de endometrio receptivo y el embrión que alcanza la etapa de blastocisto. Los antagonistas se proporcionan de manera que el antagonista se libera o continúa liberándose en la etapa de endometrio receptivo y el embrión que alcanza la etapa de blastocisto. Como se analiza más adelante en la presente descripción, los antagonistas se formulan generalmente como composiciones de liberación inmediata de manera que se administran durante la etapa de endometrio receptivo. Sin embargo, la descripción abarca además los antagonistas formulados como formulaciones de control o de liberación retardada, por ejemplo, como un depósito, de manera que se administran durante la etapa pre-receptiva, pero se liberan durante la etapa receptiva.

20 Un número de cambios celulares y morfológicos se asocian con la transformación de un endometrio pre-receptivo a un endometrio receptivo. Se han identificado además biomarcadores que pueden usarse para evaluar si el endometrio está en una etapa receptiva. Por ejemplo, la Matriz de Receptividad Endometrial de Ignomix™ analiza la expresión de 238 genes para determinar si el endometrio está en la etapa receptiva (ver, los documentos WO2010010201 y WO2010010213). Preferentemente, la etapa de endometrio receptivo se define como que tiene un perfil receptivo normal en función del perfil de expresión de los 238 genes de la Matriz de Receptividad Endometrial (ERA).

25 La etapa de endometrio receptivo puede caracterizarse además en función de la etapa de un ciclo de ovulación normal. La ovulación se produce después de la aparición de la hormona luteinizante (LH), que normalmente tiene lugar alrededor del día 14 de un ciclo de ovulación normal. La etapa precisa del ciclo de ovulación puede caracterizarse en función del momento de la aparición de LH. La aparición de LH puede medirse tomando muestras de sangre en varios días del ciclo de una mujer. El día de la aparición de LH se considera como el día LH 0. Entonces LH+1 generalmente corresponde al día 15 del ciclo y LH+7 generalmente al día 21. El endometrio se vuelve receptivo a la implantación alrededor del día LH +7 en ciclos naturales y permanece receptivo generalmente durante alrededor de 4 días (Bergh y Navot 1992), aunque este momento varía para cada mujer. En modalidades preferidas, la etapa de endometrio receptivo corresponde entre el día LH+6 al día LH+9 de un ciclo de ovulación natural, con mayor preferencia entre LH+6 a LH+8. La ventana receptiva dura normalmente solo 2-3 días por ciclo de ovulación. Sin embargo, como se conoce bien en la técnica, existe una variabilidad entre las mujeres tanto en la duración de la ventana como cuando se produce.

30 En mujeres que se someten a recuperación de ovocitos para la transferencia de embriones frescos, la ventana receptiva puede caracterizarse en función del día después de la recuperación de ovocitos, el número de días en el apoyo de la fase lútea después de la recuperación de ovocitos y/o el número de días después de la administración de hCG.

35 En un procedimiento típico de IVF, se usa la estimulación ovárica para estimular a los ovarios a producir múltiples huevos. Los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y los antagonistas de GnRH pueden administrarse para evitar la ovulación prematura mientras que la gonadotropina menopáusica humana (hMG), la hormona de estimulación del folículo (FSH), la hormona luteinizante (LH) y el citrato de clomifeno pueden administrarse para estimular la producción de múltiples huevos. Típicamente, se requieren de ocho a catorce días de estimulación antes de que los folículos ováricos estén lo suficientemente desarrollados. La gonadotropina coriónica humana (hCG) generalmente se administra para asegurar la etapa final de la maduración y los huevos se recuperan antes de la ovulación, generalmente alrededor de 36 horas después de la administración de hCG. El día de la administración de hCG se define como hCG+0 y la recuperación de ovocitos se realiza en hCG+2.

40 En modalidades preferidas, la etapa de endometrio receptivo corresponde a entre el día hCG+6 al día hCG+9 (o más bien, 4 a 7 días después de la recuperación de ovocitos), preferentemente entre el día hCG+6 y el día hCG+8.

65

5 La recuperación de huevos es un procedimiento quirúrgico menor que puede realizarse, por ejemplo, mediante el uso de la aspiración con ultrasonido transvaginal. Los huevos pueden revisarse microscópicamente y diagnosticarse para observar sus características morfológicas. Después se realiza la inseminación in vitro, por ejemplo, mediante la incubación de ovocitos junto con esperma o mediante la inyección intracitoplásmica de esperma (ICSI) lo que implica inyectar el

10 Después de la fertilización, los embriones se cultivan in vitro. Los métodos para cultivar embriones y diferenciarlos en etapas se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en los documentos US 20140134632, US 20140017717, US 20120252119y US 20120252119. Los medios de cultivo conocidos en la técnica que son adecuados para el uso en el apoyo in vitro del desarrollo y crecimiento celular incluyen fluido de trompas humanas (HTF) (Irvine Scientific), medios N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etano (HEPES) (Irvine Scientific), IVF-50 (Scandinavian IVF Science), S2 (Scandinavian IVF Science), G1 y G2 (Scandinavian IVF Science), UniIVF, ISM-1, BlastAssist, medios UTM (vendidos como MEDICULT® media por Origio A/S), medio de Whittens modificado, medio T6 de Wittinghams, medio F-10 de Ham, solución de Earle.

15 Los medios G1 y G2 se formularon específicamente para satisfacer las necesidades fisiológicas del embrión en etapa de escisión y del embrión en la etapa de desarrollo de ocho células hasta blastocisto. La patente de los Estados Unidos núm. 6,605,468 describe un medio para la propagación de embriones en etapa temprana a la etapa de blastocisto.

20 Los embriones pueden someterse además a análisis morfológico, cinético y/o genético. Preferentemente, la observación visual del embrión mediante microscopía se usa para determinar si están presentes las características físicas o morfológicas aberrantes (ver, por ejemplo, el documento WO2013078312). El diagnóstico genético previo a la implantación se realiza comúnmente para tamizar enfermedades hereditarias. Para este método, se eliminan una o dos células de un embrión para detectar enfermedades genéticas.

25 Los métodos de transferencia de embriones se conocen bien en la técnica. Uno o más embriones pueden aspirarse en un catéter e insertarse en el útero, la cavidad uterina o las trompas de Falopio.

30 En algunas modalidades se transfiere un embrión en etapa de escisión. Los embriones en "etapa de escisión" varían de 2 células a 16 células y pueden caracterizarse en función de, por ejemplo, la fragmentación, la simetría de división y la ausencia de multinucleación (ver Prados y otros, Reproducción humana 2012 27: 50-71 para revisión). La fragmentación se caracteriza generalmente por el porcentaje del volumen de embriones que se reemplaza por fragmentos. Preferentemente, un embrión en etapa de escisión se caracteriza por tener 4 blastómeros el día 2 después de la inseminación y 6-8 blastómeros el día 3 después de la inseminación. Preferentemente, el embrión en etapa de escisión tiene al menos 6 blastómeros y una fragmentación del 20 % o menos.

35 Preferentemente, se transfiere un embrión en etapa de escisión del día 2 o día 3. En las transferencias de embriones frescos donde la hembra se ha sometido a la recuperación de ovocitos, el embrión en etapa de escisión del día 2 o día 3 generalmente se transfiere 2 o 3 días después de la recuperación del ovocito, respectivamente. La etapa de blastocisto del embrión y la etapa de endometrio receptivo se alcanzan, simultáneamente de manera ideal, varios días después de la transferencia.

40 Preferentemente, se transfiere un embrión en etapa de blastocisto. Un embrión en "etapa de blastocisto" tiene una masa celular interna, una capa celular externa llamada el trofocotodermo y una cavidad de blastocelo llena de líquido que contiene la masa celular interna de la cual se deriva la totalidad del embrión. Un embrión normalmente alcanza esta etapa el día 5 o 6 después de la recuperación. Un embrión en etapa de blastocisto puede caracterizarse en función de su estado de expansión y eclosión. La expansión se relaciona con el aumento del volumen de la cavidad (es decir, blastocelo), mientras que la eclosión se refiere a la herniación o escape del blastocisto de su membrana (es decir, zona pelúcida). El estado de expansión y eclosión se caracteriza de la siguiente manera:

- 45 1. Un blastocisto temprano, un blastocelo que es menos de la mitad del volumen del embrión
- 50 2. Un blastocisto con un blastocelo cuyo volumen es la mitad, o mayor que la mitad, del embrión
3. Un blastocisto con un blastocelo que llena completamente el embrión
4. Un blastocisto expandido con un volumen de blastocelo más grande que el del embrión temprano, con una zona de adelgazamiento
5. Un blastocisto de eclosión con el trofocotodermo que comienza a herniarse a través de la zona
- 55 6. Un blastocisto eclosionado, en el cual el blastocisto se ha escapado por completo de la zona.

En modalidades preferidas, el embrión en etapa de blastocisto para transferencia tiene un estado de expansión y eclosión de 3, 4, 5 o 6.

60 En las transferencias de embriones frescos donde la hembra se ha sometido a la recuperación de ovocitos, el embrión en etapa de blastocisto generalmente se transfiere a la hembra 5 o 6 días después de la recuperación de ovocitos, preferentemente 5 días después de la recuperación.

65 Para las mujeres que se someten a la transferencia de embriones frescos después de la recuperación de ovocitos, el endometrio el día 2 y día 3 después de la recuperación de ovocitos está en una etapa pre-receptiva y no es propicio para la implantación. En modalidades preferidas, la etapa de endometrio receptivo corresponde a entre el día 4 al día 7 después

de la recuperación de ovocitos, preferentemente entre el día 5 al día 6. Si se usa hCG para inducir la ovulación o desencadenar la maduración final, los días 4 a 7 después de la recuperación de ovocitos normalmente corresponderán a hCG+6 a hCG+9.

5 La estimulación ovárica con fármacos para la fertilidad generalmente conduce a una deficiencia de la fase lútea. Por lo tanto, generalmente es una práctica estándar que el apoyo de la fase lútea se use en mujeres después de la recuperación de ovocitos. El apoyo de la fase lútea se refiere a las intervenciones terapéuticas durante la fase lútea que tienen como objetivo complementar la función del cuerpo lúteo para mejorar la implantación de embriones y el desarrollo temprano del embarazo. El apoyo de la fase lútea generalmente comprende la suplementación con progesterona, estradiol y progesterona, progestinas, hCG y/o un agonista de GnRH, o más bien la administración de progesterona exógena, estradiol y progesterona, progestinas, hCG y/o un agonista de GnRH. La progesterona normalmente se administra por vía intramuscular o vaginal, mientras que la hCG se administra por vía intramuscular o por vía subcutánea. Preferentemente, el apoyo de la fase lútea comienza el primer día después de la recuperación de los ovocitos, es decir, el día 1 después de la recuperación de ovocitos.

15 Preferentemente, la etapa de endometrio receptivo corresponde a entre el día 4 al día 7, preferentemente entre el día 4 al día 6, del apoyo de la fase lútea en mujeres que se han sometido a la recuperación de ovocitos. En modalidades preferidas, la hembra se ha sometido a estimulación ovárica en preparación para la recuperación de ovocitos.

20 Si bien los embriones pueden transferirse a una hembra dentro de unos pocos días después de la fertilización (transferencia de embriones frescos), también es común colocar los embriones en almacenamiento congelado para su uso posterior. La transferencia de embriones congelados (FET) es un procedimiento que utiliza embriones crioconservados de un ciclo anterior de fertilización in vitro o ICSI. Los embriones crioconservados se descongelan y se transfieren a la cavidad uterina a través de un catéter. La descripción abarca además el uso de ovocitos crioconservados antes de la fertilización. En estas modalidades, los ovocitos pueden descongelarse, fertilizarse y cultivarse y transferirse posteriormente como se describe en la presente descripción.

30 Puede usarse la congelación rápida para estos fines, por ejemplo, junto con un crioprotector. Los crioprotectores convencionales incluyen glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol y glicerol; 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD); dimetilsulfóxido (DMSO) y sacarosa. Alternativamente, puede usarse además la vitrificación para congelar ovocitos o embriones.

35 La FET, así como la "IVF de terceros" (sustitución gestacional, donación de óvulos, donación de embriones), pueden realizarse durante un ciclo de ovulación natural. La ventana receptiva para estas mujeres puede determinarse en función de un ciclo de ovulación natural como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, la ovulación se induce con la administración de, por ejemplo, hCG. Preferentemente, en estas mujeres la ventana receptiva corresponde a entre hCG+6 a hCG+9, preferentemente entre hCG+6 a hCG+8.

40 En algunas modalidades, las mujeres que se someten a FET o IVF de terceros también reciben apoyo lúteo como se describió anteriormente. Preferentemente en estas mujeres la ventana receptiva corresponde a entre el día 4 al día 9, preferentemente entre el día 5 al día 7, de apoyo de la fase lútea. El apoyo de la fase lútea se usa frecuentemente cuando se realiza FET o IVF de terceros durante un "ciclo artificial". En estos casos, el endometrio se prepara mediante la administración de estrógeno y/o progesterona. Preferentemente, el apoyo de la fase lútea comienza después de que el endometrio se prepara inicialmente durante al menos 6 días con estrógeno exógeno para inducir un ciclo artificial.

45 En una modalidad ilustrativa de FET o IVF de terceros, el estrógeno se proporciona por vía oral o vaginal en dosis de 4-8 mg al día durante 10 días, momento en el cual se inicia el apoyo de la fase lútea con la administración de progesterona vaginal y la transferencia de blastocistos se produce 6 días después del inicio con progesterona.

50 El efecto del antagonista del receptor de oxitocina se superpone con la etapa de blastocisto del embrión. El antagonista se libera cuando el embrión ha alcanzado la etapa de blastocisto. Preferentemente, un embrión en etapa de blastocisto se transfiere a dicha hembra y el antagonista se administra el mismo día que se transfiere el embrión.

55 La descripción contempla además la transferencia de un embrión en etapa de escisión. En estas modalidades, el antagonista puede proporcionarse como una formulación de liberación sostenida o controlada para la liberación varios días después de la transferencia. Alternativamente, el antagonista puede administrarse como una formulación de liberación inmediata varios días después de la transferencia. Como se muestra en los ejemplos, la administración de barusiban (un antagonista del receptor de oxitocina) cuando un embrión está en la etapa de blastocisto da como resultado un aumento en la tasa de implantación en curso del 27 % al 45 %, un aumento significativo.

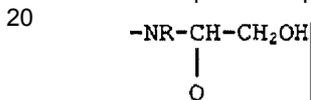
60 Preferentemente, los antagonistas del receptor de oxitocina se seleccionan de antagonistas selectivos de oxitocina y antagonistas mixtos del receptor de vasopresina/oxitocina. Un antagonista selectivo de oxitocina tiene una K_i para el receptor de oxitocina que es al menos un orden de magnitud mayor que la K_i para el receptor de vasopresina.

Los antagonistas de receptores incluyen compuestos que reducen la expresión y/o la actividad del receptor. Un antagonista preferido del receptor de vasopresina/oxitocina es atosiban (1-(ácido 3-mercaptopropanoico)-2-(O-etil-D-tirosina)-4-L-treonina-8-L-ornitina-oxitocina).

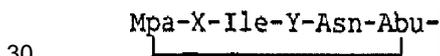
5 La reducción de la expresión del receptor de oxitocina puede lograrse, por ejemplo, mediante el uso de moléculas de ARN de interferencia o de ARN antisentido dirigidas contra dicho receptor.

10 Preferentemente, el antagonista se une al receptor y evita la actividad del receptor. Dichos antagonistas incluyen, por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra el receptor (por ejemplo, "anticuerpos neutralizantes") así como moléculas pequeñas. Preferentemente, el antagonista actúa como un antagonista competitivo y compite con la oxitocina por la unión al receptor de oxitocina. Preferentemente, los antagonistas son moléculas pequeñas que se unen al receptor y antagonizan la actividad del receptor. Un antagonista selectivo de oxitocina preferido es barusiban.

15 Los antagonistas del receptor de oxitocina adecuados son bien conocidos por el experto y pueden identificarse fácilmente en función de los métodos de tamizaje conocidos que usan, por ejemplo, la activación de receptores y/o la unión de receptores como una lectura. Los antagonistas adecuados incluyen los descritos en el documento US6143722, a saber, los análogos de heptapéptidos, o unas sales farmacéuticamente aceptables de estos, que tienen actividad antagonista de la oxitocina y que consisten en una porción S de hexapéptido y un residuo beta-aminoalcohol Z en el extremo C-terminal unido a la porción S por un enlace amida, en donde el beta-aminoalcohol Z es:



25 en donde Q es (CH₂)_n-NH-A, n es 1-6 y A es H o -C(=NH)NH₂,
y en donde R es CH₃ o C₂H₅;
y la porción S es:



en donde Mpa, lie, Asn y Abu tienen el siguiente significado:

35 Mpa residuo de ácido 3-mercaptopropiónico
Ile residuo de isoleucina
Asn residuo de asparagina
Abu residuo de ácido alfa-aminobutírico;

y en donde X es un D-alfa-aminoácido aromático; y Y es un alfa-aminoácido alifático. Los antagonistas de oxitocina preferidos se enumeran en la Figura 1.

40 Otros antagonistas incluyen OBE001/ AS-602305 (en particular formulaciones orales de estos), TT-235 (Northwestern University), el antagonista selectivo del receptor de oxitocina Epelsiban ((3R,6R)-3-(2,3-dihidro-1H-inden-2-il)-1-[(1R)-1-(2,6-dimetilpiridin-3-il)-2-(morfolin-4-il)-2-oxoetil]-6-[(1S)-1-metilpropil]piperazina-2,5-diona); Retosiban ((3R,6R)-6-[(2S)-butan-2-il]-3-(2,3-dihidro-1H-inden-2-il)-1-[(1R)-1-(2-metil-1,3-oxazol-4-il)-2-(morfolin-4-il)-2-oxoetil]piperazina-2,5-diona);
45 PF-3274167 (5-(3-(3-(2-cloro-4-fluorofenoxi)azetidín-1-il)-5-(metoximetil)-4H-1,2,4-triazol-4-il)-2-metoxipiridina); e clorhidrato de L-368,899 (CAS 148927-60-0); L-371,257 (1-[1-[4-(1-acetilpiperidin-4-il)oxi-2-metoxibenzoil]piperidin-4-il]-4H-3,1-benzoxazin-2-ona). Además se describen antagonistas de oxitocina adicionales, por ejemplo, en los documentos WO2004020414 y WO2005/028452. Preferentemente, el antagonista se selecciona de barusiban, atosiban, OBE001/ AS-602305, PF-3274167 Epelsiban y retosiban.

50 Preferentemente, el antagonista del receptor de oxitocina se formula en una composición farmacéutica. La composición puede incluir además aditivos farmacéuticamente aceptables tales como conservantes, diluyentes, agentes dispersantes, agentes para promover la absorción de la mucosa (ejemplos de los cuales se describen por Merkus, F. W. H. M. y otros, J. Controlled Release 24, 201-208, 1993, y los cuales incluyen surfactantes, ácidos biliares, fusidatos, fosfolípidos y ciclodextrinas), agentes tamponantes y saborizantes. Tales composiciones pueden formularse como sólidos (por ejemplo, como tabletas, cápsulas o polvos) o líquidos (por ejemplo, como soluciones o suspensiones), las cuales se consideran aquí para incluir cremas y ungüentos, para la administración oral o parenteral. La administración oral (incluida la sublingual y bucal), intranasal, pulmonar, transdérmica, rectal, vaginal, subcutánea, intramuscular e intravenosa pueden ser rutas adecuadas para la dosificación.

60 En algunas modalidades, la composición farmacéutica puede suministrarse en un sistema de liberación sostenida o retardada. Por ejemplo, el antagonista puede administrarse mediante el uso de un parche transdérmico o formularse en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). Tal como se usa en la presente descripción, un sistema de liberación sostenida o retardada garantiza que el antagonista también esté presente en el sujeto en un punto de tiempo
65 después de la administración, por ejemplo, varias horas o incluso varios días después de la administración. Tales sistemas de liberación sostenida o retardada permiten la administración de los antagonistas del receptor antes de que la hembra

esté en una etapa de endometrio receptivo. Sin embargo, la liberación sostenida o retardada asegura que una cantidad suficiente (o más bien una cantidad con eficacia terapéutica) del antagonista todavía esté presente cuando la hembra entre en la etapa de endometrio receptivo y cuando el embrión haya alcanzado la etapa de blastocisto. En modalidades donde la hembra se somete a transferencia de un embrión en etapa de escisión, el antagonista debería liberarse cuando el embrión en etapa de escisión se ha desarrollado a un embrión en etapa de blastocisto y cuando la hembra ha alcanzado la etapa de endometrio receptivo. Si se usa una formulación de liberación inmediata, entonces el antagonista debería administrarse varios días después de la transferencia de embriones, preferentemente dos o tres días después de la transferencia de embriones ya que esto corresponderá al momento en que el embrión en etapa de escisión se ha desarrollado a un embrión en etapa de blastocisto y cuando la hembra ha alcanzado la etapa de endometrio receptivo. Si se usan formulaciones de liberación sostenida o retardada, estas pueden administrarse antes, por ejemplo, el día de la transferencia del embrión, siempre que el antagonista se libere cuando el embrión en etapa de escisión se haya desarrollado a un embrión en etapa de blastocisto y cuando la hembra haya alcanzado la etapa de endometrio receptivo.

En modalidades donde la hembra se somete a transferencia de un embrión en etapa de blastocisto, el antagonista debería liberarse el mismo día que la transferencia del embrión (dentro del mismo período de 24 horas), ya que esto corresponderá al momento en que el embrión ha alcanzado la etapa de blastocisto y la hembra ha alcanzado la etapa de endometrio receptivo. Preferentemente, el antagonista se administra entre 2 horas antes y 2 horas después de la transferencia del embrión. Con mayor preferencia, el antagonista se administra dos veces. En una modalidad ilustrativa que usa barusiban, la primera administración puede tener lugar alrededor de 45 minutos antes de la transferencia del embrión y la segunda administración alrededor de 60 minutos después de la primera administración.

Como bien conoce un experto, el momento de administración es dependiente del antagonista particular usado, en particular de la vida media del antagonista. Puede ser necesario que los antagonistas con vidas medias relativamente cortas se administren múltiples veces para garantizar que sus efectos se superpongan con la etapa de blastocisto y la etapa de endometrio receptivo.

Referencias

- Ayoubi J-M, Epiney M, Brioschi PA, Fanchin R, Chardonnens D, de Ziegler D. Comparison of changes in uterine contraction frequency after ovulation in the menstrual cycle and in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2003; 79: 1101-1105.
- Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril* 1992; 58: 537-542.
- Bernabeu R, Roca M, Torres A, Ten J. Indomethacin effect on implantation rates in oocyte recipients. *Hum Reprod* 2006; 21: 364-369.
- Blockeel C, Pierson R, Popovic-Todorovic B, Visnova H, Garcia-Velasco JA, Mrazek M, Chou P-Y, Wu M-H, Pan H-A, Hung K-H, Chang F-M. Use of an oxytocin antagonist in in vitro fertilization-embryo transfer for women with repeated implantation failure: a retrospective study. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2011; 40: 136-140.
- Fanchin R, Righini C, Olivennes F, Taylor S, de Ziegler D, Frydman R. Uterine contractions at the time of embryo transfer alter pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13: 1968-1974.
- Fanchin R, Righini C, de Ziegler D, Olivennes F, Ledée N, Frydman R. Effects of vaginal progesterone administration on uterine contractility at the time of embryo transfer. *Fertil Steril* 2001; 75: 1136-1140.
- Fuchs A-R, Behrens O, Maschek H, Kupsch E, Einspanier A. Oxytocin and vasopressin receptors in human and uterine myomas during menstrual cycle and early pregnancy. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 594-604.
- Killick SR. Ultrasound and the receptivity of the myometrium. *RBM Online* 2007; 15: 63-67.
- Kim CH, Lee JW, Jeon IK, Park E, Lee YJ, Kim SH, Chae H, Kang BM, Lee HA. Administration of oxytocin antagonist improves the implantation rates in patients with repeated failure of IVF/ICSI treatment. *Hum Reprod* 2008; 23 (Suplemento. 1): i124.
- Koot YEM, Macklon NS. Embryo implantation: biology, evaluation, and enhancement. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2013; 25: 274-279.
- Lan VT, Khang VN, Nhu GH, Thuong HM. Atosiban improves implantation and pregnancy rates in patients with repeated implantation failure. *RBM Online* 2012; 25: 254-260.
- Lesny P, Killick SR, Tetlow RL, Robinson J, Maguiness SD. Embryo transfer - can we learn anything new from the observation of junctional zone contractions? *Hum Reprod* 1998; 13: 1540-1546.
- Liang YL, Kuo TC, Hung KH, Chen TH, Wu MH. Oxytocin antagonist for repeated implantation failure and delay of delivery. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2009; 48: 314-316.
- Makrigiannakis A, Minas V. Mechanisms of implantation. *RBM Online* 2006; 14: 102-109.
- Moon HS, Park SH, Lee JO, Kim KS, Joo BS. Treatment with piroxicam before embryo transfer increases the pregnancy rate after in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 2004; 82: 816-820.
- Moraloglu O, Tonguc E, Turgut V, Zeyrek T, Batioglu S. Treatment with oxytocin antagonists before embryo transfer may increase implantation rates after IVF. *RBM Online* 2010; 21: 338-343.
- Ng EH, Li RH, Chen L, Lan VT, Tuong HM, Quan S. A randomized double blind comparison of atosiban in patients undergoing IVF treatment. *Hum Reprod* 2014; 29: 2687-2694.
- Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H, Venetis CA, Fatemi H, Tarlatzis B y Devroey P. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008; 23: 91-99.

- Pierzynski P, Reinheimer TM, Kuczynski W. Oxytocin antagonists may improve infertility treatment. *Fertil Steril* 2007; 88: e19-e22.
- Richter ON, Bartz C, Dowaji J, Kupka M, Reinsberg J, Ulrich U, Rath W. Contractile reactivity of human myometrium in isolated non-pregnant uteri. *Hum Reprod* 2006; 21: 36-45.
- 5 Schoolcraft WB, Surrey ES, Gardner DK. Embryo transfer: techniques and variables affecting success. *Fertil Steril* 2001; 76: 863-870.
- Simon C, Martin JC, Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. *Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14: 815-826.
- Shukovski L, Healy DL, Findlay JK. Circulating immunoreactive oxytocin during the human menstrual cycle comes from the pituitary and is estradiol dependent. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 455-460.
- 10 Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, Wolff M. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 617-630.
- Zhu L, Che HS, Xiao L, Li YP. Uterine peristalsis before embryo transfer affects the chance of clinical pregnancy in fresh and frozen-thawed embryo transfer cycles. *Hum Reprod* 2014; 29: 1238-1243.
- 15 Todas las referencias de patentes y bibliografía citadas en la presente descripción se incorporan de este modo como referencia en su totalidad.

La invención se explica adicionalmente en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, sino que simplemente sirven para aclarar la invención.

20 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Un ensayo multicéntrico, multinacional, en grupos paralelos, doble ciego, controlado con placebo, aleatorizado que evalúa el efecto de barusiban administrado por vía subcutánea el día de la transferencia sobre las tasas de implantación y embarazo en pacientes de IVF/ICSI

25 *Metodología*

BASIC fue un ensayo multicéntrico, multinacional, en grupos paralelos, controlado con placebo, doble ciego, aleatorizado. Se diseñó para evaluar los efectos de barusiban, administrado el día de la transferencia del embrión en etapa de escisión o el día de la transferencia del blastocisto, sobre la tasa de implantación en curso en pacientes de IVF/ICSI. Los pacientes se sometieron a estimulación ovárica controlada en el protocolo largo de agonista de GnRH o antagonista de GnRH, recibieron hCG para desencadenar la maduración folicular final, se sometieron a recuperación de ovocitos y a diario recibieron apoyo de la fase lútea mediante la suplementación con progesterona vaginal comenzando el día 1 después de la recuperación, y a transferencia el día 3 o 5 después de la recuperación. Los pacientes se aleatorizaron en una relación de 1:1 al grupo de barusiban o al grupo de placebo, con estratificación de acuerdo con el día de la transferencia (día 3 después de la recuperación o día 5 después de la recuperación) y el número de embriones/blastocistos a transferir (1 o 2). En total, se aleatorizaron 255 pacientes de IVF/ICSI en el ensayo y contribuyeron con 440 embriones/blastocistos.

40 El producto medicinal en investigación, es decir, barusiban o placebo de acuerdo con la aleatorización, se administró como inyecciones subcutáneas en dos puntos de tiempo: La 1ra administración de 40 mg de barusiban o placebo fue 45 minutos antes de la transferencia y la 2da administración de 10 mg de barusiban o placebo fue 60 minutos después de la 1ra administración.

45 La transferencia se realizó el día 3 (embriones en etapa de escisión) o el día 5 (blastocitos) después de la recuperación de ovocitos. El día 3, solo podrían transferirse embriones de buena calidad definidos como ≥ 6 blastómeros y $\leq 20\%$ de fragmentación. El día 5, podrían transferirse blastocistos con estado de expansión y eclosión 3, 4, 5 o 6. El número real de embriones/blastocistos transferidos para cada paciente individual dependió de la disponibilidad de embriones/blastocistos de la calidad morfológica requerida, las regulaciones locales y la práctica clínica para la edad del paciente, pero el número máximo fue de 2.

Se habían estandarizado los aspectos clave relacionados con el procedimiento de transferencia. Se insertó un espéculo en la vagina y la limpieza de la vagina y el cuello uterino se realizó de acuerdo con las prácticas locales pero con una manipulación y alteración mínimas. Se usaron catéteres blandos o ultra suaves. La cubierta externa del catéter se insertó simplemente sobresaliendo del orificio interno (es decir, manteniendo la cubierta externa en el canal cervical). El(Los) embrión(embriones)/blastocisto(s) se cargó(cargaron) en la cubierta interna que después se insertó a través de la cubierta externa. Mediante el uso de la guía de ultrasonido abdominal, el(los) embrión(embriones)/blastocisto(s) se colocó(colocaron) a 1,5-2,0 cm del fondo uterino. El tiempo desde la carga del catéter interno hasta la colocación del(de los) embrión(embriones)/blastocisto(s) no debería exceder de 1 minuto. Después de la colocación, se retiraron los catéteres internos y externos y se verificaron el(los) embrión(embriones)/blastocisto(s) retenido(s), el moco y la sangre. Después de la confirmación de que no quedó(quedaron) embrión(embriones)/blastocisto(s) en los catéteres, el espéculo se retiró posteriormente; esto se produjo aproximadamente 2 minutos después de la colocación del(de los) embrión(embriones)/blastocisto(s). Se registraron las dificultades/eventualidades que se producían durante el procedimiento de transferencia.

65

Los pacientes recibieron tabletas vaginales de progesterona 100 mg dos veces al día a partir del día después de la recuperación de ovocitos y hasta el día de la visita clínica de embarazo. El día de la transferencia, los pacientes deberían insertar las tabletas de progesterona al menos 3 horas antes de la transferencia y al menos 3 horas después de la transferencia. La tasa de implantación en curso (criterio de valoración principal) se definió como el número de fetos viables intrauterinos 10-11 semanas después de la transferencia dividido por el número de embriones/blastocistos transferidos.

Con respecto a la metodología estadística, la hipótesis principal se analizó mediante el uso de un modelo de regresión logística con la implantación en curso (sí/no) como el resultado y el tratamiento y los estratos de aleatorización como factores. El efecto del tratamiento se presenta sobre la escala de razón de posibilidades, ya que representa el resultado del análisis de regresión logística; un análisis que permite la inclusión de factores y covariables. El ajuste para la distribución desequilibrada potencial entre los grupos de tratamiento de, por ejemplo, la calidad de los embriones/blastocistos transferidos se describió en los análisis estadísticos planeados para el ensayo BASIC. Debe enfatizarse que la razón de posibilidades en función del modelo de regresión logística proporciona la forma más apropiada de representar los datos y la base para la evaluación del efecto del tratamiento.

Resultados

El impacto en el resultado del tratamiento de las diferentes etapas de receptividad y el potencial de implantación de los embriones en etapa de escisión y los blastocistos fue evidente, como lo ilustran las tasas generales de implantación en curso del 19 % para las transferencias posteriores a la recuperación del día 3 y del 38 % para las transferencias posteriores a la recuperación del día 5. Se observó el mismo patrón en los grupos de barusiban y placebo.

La tasa general de implantación en curso observada (día 3 + día 5) en el ensayo fue del 27,1 % para barusiban y 28,2 %¹, que corresponde a una razón de posibilidades² de 1,1 (intervalo de confianza de 95 % 0,7- 1,8; p=0,6960), es decir, a favor de barusiban, pero no significativa. Por lo tanto, no se cumplió el criterio de valoración principal para la población general del ensayo, pero como se describe a continuación esto se debió a que el día de la transferencia tuvo una interacción. La transferencia de embriones en etapa de escisión el día 3 después de la recuperación produjo una razón de posibilidades de 0,3 (0,3-1,2; p=0,1509) (Figura 2). El análisis de los estratos el día 5 después de la recuperación dio como resultado una razón de posibilidades de 2,3 (1,1-4,7; p=0,0270) y por lo tanto demostró un efecto de tratamiento significativo de barusiban sobre la tasa de implantación en curso para transferencias de blastocistos (Figura 2). Una razón de posibilidades de 2,3 corresponde a las medias ajustadas de las tasas de implantación en curso para las transferencias de blastocistos del 45 % para barusiban frente al 27 % para placebo (Δ relativo del 67 %) (Figura 3). Los resultados del ensayo BASIC indican que la interpretación de los efectos de un antagonista de oxitocina sobre la tasa de implantación se vio afectada por el día de la transferencia; la transferencia de embriones en etapa de escisión (día 3 después de la recuperación) o la transferencia de blastocistos (día 5 después de la recuperación). No se estableció ningún efecto sobre la tasa de implantación en curso para barusiban cuando la transferencia de embriones en etapa de escisión se realizó el día 3 (etapa pre-receptiva). Sin embargo, se observó un efecto significativo (p=0,0270) de barusiban sobre la mejora de la tasa de implantación en curso cuando se realizó la transferencia de blastocistos el día 5 (etapa receptiva).

¹ Los datos presentados en este documento son para la población por protocolo (PP). Se observaron resultados similares para la población de intención de tratar (ITT). Por ejemplo, la tasa de implantación en curso para la población de ITT fue del 26,2 % para barusiban y del 27,9 % para placebo.

² Las razones de posibilidades se basan en el modelo de regresión logística, para el cual los análisis se ajustan para sitio, razón principal de infertilidad y calidad del embrión/blastocisto.

El ensayo BASIC identifica la ventana de tiempo para un impacto clínicamente relevante de barusiban, o en general de los antagonistas de oxitocina y antagonistas mixtos de oxitocina/vasopresina, en la implantación, que no se predijo antes del ensayo. Se observa un efecto sobre la tasa de implantación cuando el antagonista de oxitocina se administra al momento de la implantación, el día 5 después de la recuperación (o posterior), pero no en la fase lútea temprana el día 2-3 después de la recuperación.

La falta de un efecto consistente entre las transferencias de embriones en etapa de escisión del día 3 después de la recuperación y las transferencias de blastocistos del día 5 después de la recuperación es importante para las hipótesis sobre los mecanismos relacionados con la contractilidad uterina y las consecuencias para el ciclo final. En ambos días, la dosis y el método de administración de la intervención farmacológica, así como el procedimiento de transferencia fueron los mismos.

Por lo tanto, los mecanismos propuestos como la expulsión o la dispersión de embriones/blastocistos debido a la contractilidad uterina en la fase lútea temprana o debido al procedimiento de transferencia de embriones/blastocistos ya no deberían considerarse explicaciones potenciales para la mejora de las tasas de implantación con agentes relajantes del útero, incluidos los antagonistas de oxitocina o los antagonistas mixtos de oxitocina/vasopresina. En caso de que estos mecanismos fueran los más relevantes, los hallazgos deberían ser los mismos para las observaciones del día 3 y el día 5 después de la recuperación.

Reivindicaciones

- 5 1. Un antagonista del receptor de oxitocina para el uso en aumentar la tasa de implantación en curso, aumentar la tasa de embarazo en curso, aumentar la tasa de embarazo clínico y/o aumentar la tasa de nacidos vivos en un sujeto hembra que se somete a transferencia de embriones como parte de una tecnología de reproducción asistida, en donde el antagonista se proporciona a la hembra de manera que el efecto del antagonista se superponga con la etapa de endometrio receptivo en dicha hembra y el efecto del antagonista esté presente cuando el embrión haya alcanzado la etapa de blastocisto.
- 10 2. El antagonista del receptor de oxitocina para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa de endometrio receptivo corresponde a:
 - a) entre LH+6 a LH+9, preferentemente entre LH+6 a LH+8, de un ciclo de ovulación natural;
 - b) entre hCG+6 a hCG+9, preferentemente entre hCG+6 a hCG+8, de un ciclo de ovulación inducida;
 - 15 c) entre el día 4 al día 7, preferentemente entre el día 4 al día 6, de apoyo de la fase lútea después de la recuperación de ovocitos, preferentemente en donde la hembra se ha sometido a estimulación ovárica;
 - d) entre el día 4 al día 9, preferentemente entre el día 5 al día 7, de apoyo de la fase lútea, preferentemente en donde el apoyo lúteo comienza después de que el endometrio se prepara inicialmente durante al menos 6 días con estrógeno exógeno.
- 20 3. El antagonista del receptor de oxitocina para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el apoyo de la fase lútea comprende la suplementación con progesterona, estradiol y progesterona, gonadotropina coriónica humana, progestinas y/o agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH).
- 25 4. El antagonista del receptor de oxitocina para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la hembra se somete a la transferencia de un embrión en etapa de blastocisto y el antagonista se proporciona a la hembra de manera que el antagonista se libera el día de la transferencia del embrión.
- 30 5. El antagonista del receptor de oxitocina para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el antagonista se administra a la hembra el día de la transferencia del embrión.
- 35 6. El antagonista del receptor de oxitocina para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el antagonista se administra entre 2 horas antes y 2 horas después de la transferencia del embrión, preferentemente en donde el antagonista se administra dos veces, preferentemente en donde la primera administración se produce alrededor de 45 minutos antes de la transferencia del embrión y la segunda administración se produce alrededor de 60 minutos después de la primera administración.
- 40 7. El antagonista del receptor de oxitocina para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en donde el embrión en etapa de blastocisto tiene un estado de expansión y eclosión de 3, 4, 5 o 6, preferentemente en donde el embrión en etapa de blastocisto es un embrión del día 5 después de la fertilización.
- 45 8. El antagonista del receptor de oxitocina para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la hembra se somete a la transferencia de un embrión en etapa de escisión y el antagonista se proporciona a la hembra de manera que el antagonista se libera dos o tres días después de la transferencia del embrión, preferentemente en donde el antagonista se administra a la hembra dos o tres días después de la transferencia del embrión.
- 50 9. El antagonista del receptor de oxitocina para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el embrión en etapa de escisión tiene al menos 6 blastómeros y una fragmentación del 20 % o menos, preferentemente en donde el embrión en etapa de escisión es un embrión del día 2 o día 3 después de la fertilización.
- 55 10. El antagonista del receptor de oxitocina para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el antagonista es un antagonista selectivo del receptor de oxitocina o un antagonista del receptor de vasopresina/oxitocina.
- 60 11. El antagonista del receptor de oxitocina para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el antagonista es barusiban.
- 65 12. El antagonista del receptor de oxitocina para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde barusiban se proporciona por vía subcutánea.
13. El antagonista del receptor de oxitocina para el uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde se administran entre 30-80 mg, preferentemente 50 mg, de barusiban.
14. El antagonista del receptor de oxitocina para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde la hembra se somete a la transferencia de un embrión en etapa de blastocisto y se administra barusiban a la hembra el mismo día de la transferencia del embrión.

15. El antagonista del receptor de oxitocina para el uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde se administran 40 mg de barusiban por vía subcutánea 45 minutos antes de la transferencia del embrión y se administran 10 mg de barusiban por vía subcutánea 60 minutos después de la primera administración.

5

Figura 1A

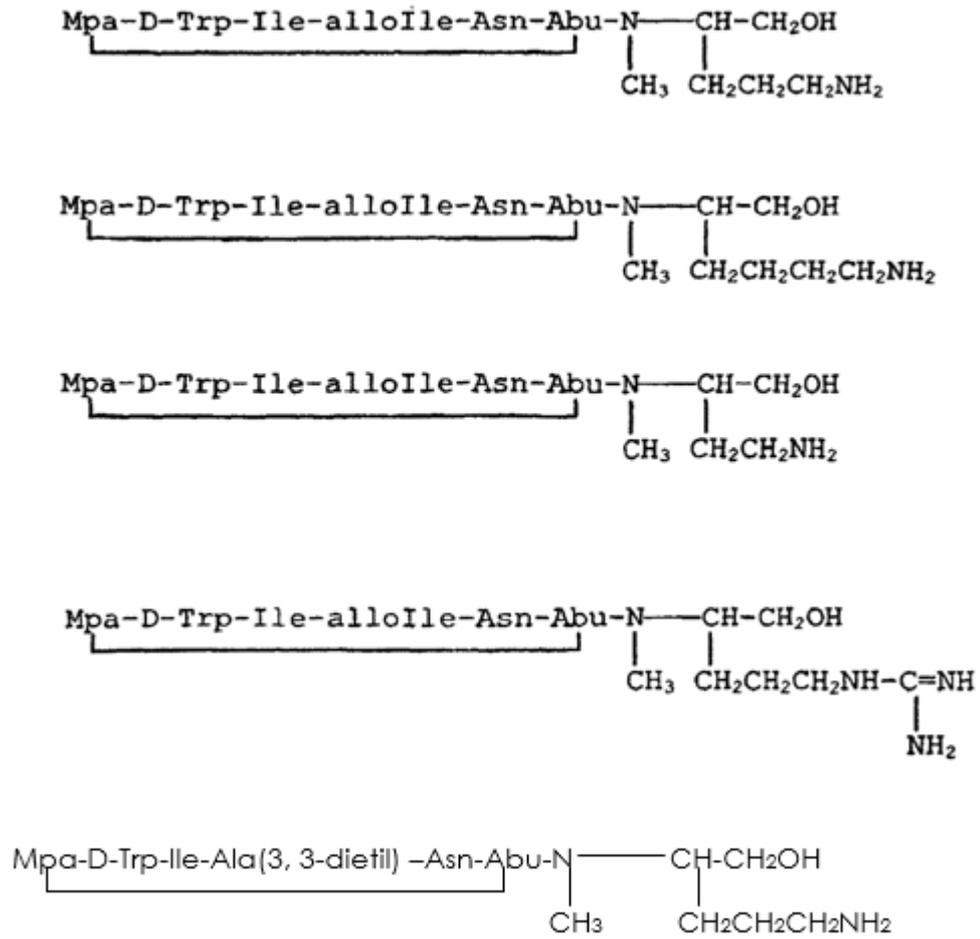


Figura 1B

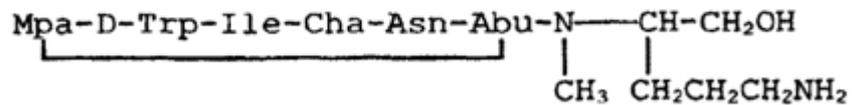
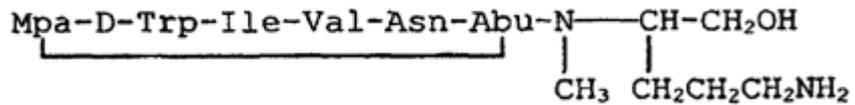
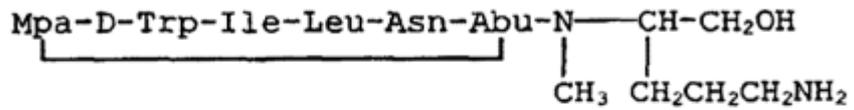
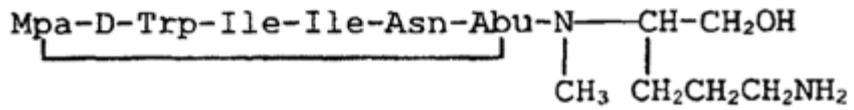
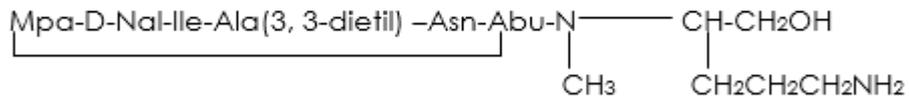
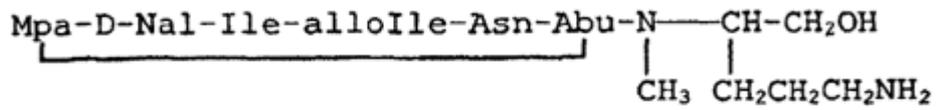


Figura 2

	Barusiban	Placebo	Razón de posibilidades [CI del 95 %]	Valor p
Tasa de implantación en curso Día 3 + Día 5	27,1 %	28,2 %	1,1 [0,7; 1,8]	0,6960

	Razón de posibilidades [CI del 95 %]	Valor p
Tasa de implantación en curso Barusiban frente a placebo		
Día 3	0,6 [0,3; 1,2]	0,1509
Día 5	2,3 [1,1; 4,7]	0,0270

Análisis ajustado para sitio, razón principal de la infertilidad y la calidad de embriones/blastocistos

Figura 3

