



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **80418** (13) **C2**

(51) **МПК (2006)**

A61K 31/00

A61K 31/277 (2007.01)

A61K 31/44

A61K 31/502

A61K 31/519

A61K 38/24

A61P 15/08 (2007.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ІНДУКУВАННЯ ОВУЛЯЦІЇ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ НЕПОЛІПЕПТИДНОГО МОДУЛЯТОРА РІВНЯ cAMP - ІНГІБІТОРА ФОСФОДІЕСТЕРАЗИ-4, ТА СПОСІБ ЗБИРАННЯ ОВОЦИТІВ ДЛЯ ЗАПЛІДНЕННЯ IN VITRO

1

2

(21) 20040705737

(22) 14.12.2001

(24) 25.09.2007

(86) PCT/EP01/14730, 14.12.2001

(46) 25.09.2007, Бюл. № 15, 2007 р.

(72) Палмер Стівен, US, Теппер Марк, US, Мак-кена Шон, US, Макнеймі Майкл К., GB, Ешколь Аліза, CH

(73) ЕПЛАЙД РІСЬОРЧ СИСТЕМЗ ЕРС ХОЛДІНГ Н.В., AN

(56) WO 0147905 A, 05.07.2001

WO 0187287 A, 22.11.2001

WO 9955357 A, 04.11.1999

ZUSSMAN BARRY D ET AL: "An overview of the pharmacokinetics of cilomilast (Arifo(R)), a new, orally active phosphodiesterase 4 inhibitor, in healthy young and elderly volunteers." JOURNAL OF CLINICAL PHARMACOLOGY, vol. 41, no. 9, September 2001 (2001-09), pages 950-958, XP008006551 ISSN: 0091-2700

BRANNSTROM M ET AL: "CYCLIC AMP INDUCED OVULATION IN THE PERFUSED RAT OVARY AND ITS MEDIATION BY PROSTAGLANDINS" BIOLOGY OF REPRODUCTION, vol. 37, no. 5, 1987, pages 1047-1053, XP008006559 ISSN: 0006-3363

PETERSON C MATTHEW ET AL: "Interleukin-1-beta (IL-1-beta) modulates prostaglandin production and the natural IL-1 receptor antagonist inhibits ovulation in the optimally stimulated rat ovarian perfusion model." ENDOCRINOLOGY, vol. 133, no. 5, 1993, pages 2301-2306, XP008006552 ISSN: 0013-7227

TSAFRIRI A ET AL: "Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: Studies using selective phosphodiesterase inhibitors." DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 178, no. 2, 1996, pages 393-402, XP001097137 ISSN: 0012-1606

HOLMES P V ET AL: "THE ROLE OF THE CYCLIC AMP IN THE OVULATORY PROCESS OF THE IN-VITRO PERFUSED RABBIT OVARY" ENDOCRINOLOGY, vol. 118, no. 6, 1986, pages 2195-2202, XP008006555 ISSN: 0013-7227

(57) 1. Спосіб індукування овуляції у самки, який включає введення в організм згаданої самки неполіпептидного модулятора рівня cAMP, який є інгібітором ізоформи фосфодіестерази-4.

2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що неполіпептидний модулятор рівня cAMP вводять в організм самки перед лютеальною фазою овуляторного циклу цієї самки.

3. Спосіб за п. 2, який відрізняється тим, що додатково включає введення в організм самки засобу, який підвищує концентрацію фолікулостимулювального гормону в організмі самки, в період фолікулярної фази овуляторного циклу самки.

4. Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що згаданим засобом є фолікулостимулювальний гормон.

5. Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що згаданим засобом є кломіфен.

6. Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що згаданим засобом є селективний модулятор рецепторів естрогенів.

7. Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що згаданим засобом є інгібітор ароматази.

8. Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що згаданим засобом є інгібітор аналогічних стероїдогенних ферментів, який спричиняє послаблення загального продукування естрогенів.

9. Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що в організм згаданої самки для індукування овуляції перед лютеальною фазою овуляторного циклу самки додатково вводять також лютеїнізуючий гормон.

C2
(13)

80418
(11)

UA
(19)

10. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що в організм згаданої самки додатково вводять лютеїнізуючий гормон у зниженій концентрації порівняно з відомими схемами для індукування овуляції перед лютеальною фазою овуляторного циклу самки.

11. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що в організм згаданої самки для індукування овуляції перед лютеальною фазою овуляторного циклу самки додатково вводять також хоріонічний гонадотропін.

12. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що в організм згаданої самки додатково вводять хоріонічний гонадотропін у зниженій концентрації порівняно з відомими схемами для індукування овуляції перед лютеальною фазою овуляторного циклу самки.

13. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що неполіпептидний модулятор рівня cAMP вводять в організм згаданої самки в момент часу, який відповідає моменту введення в організм згаданої самки hCG або LH за відомою схемою індукування овуляції.

14. Спосіб за п. 13, де неполіпептидний модулятор рівня cAMP вводять спільно з hCG або LH.

15. Спосіб за п. 13, де неполіпептидний модулятор рівня cAMP вводять окремо і не вводять спільно з hCG або LH.

16. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що інгібітор фосфодіестерази вибраний з групи, до якої входять:

роліпрам, арофілін (Almirall), Ariflo® (SmithKline Beecham), рофлуміласт (Byk Gulden), денбуфілін (SmithKline Beecham), RS-17597 (Syntex), SDZ-LSQ-844 (Novartis), 4-[2,3-біс(гідроксиметил)-6,7-діетоксинафтил]-1-(2-гідроксіетил)-гідропіридин-2-он (T-440; Tanabe Seiyaku), метил-3-[6-(2H-3,4,5,6-тетрагідропіран-2-ілокси)-2-(3-тієнілкарбоніл)бензо[b]фуран-3-іл]пропаноат (Bayer), 2-метил-1-[2-(метилетил)(8-гідропіразоло[1,5-a]піридин-3-іл)]пропан-1-он (ібуділаст; Kyorin), N-(3,5-дихлор(4-піридил))(3-циклопентилокси-4-метоксибеніл)карбоксамід (RP 73401; Rhône-Poulenc Rorer), (1E)-1-аза-2-(3-циклопентилокси-4-метоксибеніл)проп-1-еніламіноат (PDA-641; American Home Products), 4-ціан-4-(3-циклопентилокси-4-метоксибеніл)циклогексанкарбонова кислота (SB207499; SmithKline Beecham), ципамфілін (SmithKline Beecham), 5-[3-((2S)біцикло[2.2.1]гепт-2-илокси)-4-метоксибеніл]-1,3-діазапергідроін-2-он (CP-80633; Pfizer), 1-(3-нітрофеніл)-3-(3-піридилметил)-1,3-дигідропіридино[2,3-d]піримідин-2,4-діон (RS-25344; Syntex), 4-((1R)-1-феніл-2-(4-піридил)етил)-2-циклопентилокси-1-метоксibenзол (CDP-840; Celltech), (3-((3-циклопентилокси-4-метоксибеніл)метил)аміно)піразол-4-іл)метан-1-ол, Ro-20-1724 (Roche Holding AG), пікламіласт, доксофілін (Istituto Biologico Chemioterapico ABC SpA), RPR-132294 (Rhône-Poulenc Rorer), RPR-117658A (Rhône-Poulenc Rorer), L-787258 (Merck Frosst Canada), E-4021 (Eisai Co. Ltd.), GF-248 (Glaxo Wellcome), SKF-107806 (SmithKline Beecham), IPL-4088 (Inflazyme Pharmaceuticals Ltd.), {3-[(3-циклопентилокси-4-метоксибеніл)метил]-8-(метилетил)пурин-6-

іл}етиламін (V-11294A; Napp Research Centre Ltd.), атизорам (Pfizer), 5-(3-циклопентилокси-4-метоксибеніл)піридин-2-карбоксамід (CP-353164; Pfizer), метил-3-[2,4-діоксо-3-бензил-1,3-дигідропіридино[2,3-d]піримідиніл]бензоат (CP-77059; Pfizer), CP-146523 (Pfizer), CP-293321 (Pfizer), CI-1044 (Pfizer), PD-189659 (Pfizer), CI-1018 (Pfizer), CP-220629 (Pfizer), 1-(3-нітрофеніл)-3-(4-піридилметил)-1,3-дигідропіридино[2,3-d]піримідин-2,4-діон (RS-25344-000; Roche Bioscience), мезопрам (Schering AG), N-(2,5-дихлор(3-піридил))(8-метокси(5-хіноліл))карбоксамід (D-4418; Chiroscience), T-2585 (Tanabe Seiyaku), 4-[4-метокси-3-(5-фенілпентилокси)феніл]-2-метилбензойна кислота, XT-044 (Hokukoku University), XT-611 (Kanzawa University), WAY-126120 (Wyeth-Ayerst Pharmaceuticals Inc.), 1-аза-10-(3-циклопентилокси-4-метоксибеніл)-7,8-диметил-3-оксаципро[4.5]дец-7-ен-2-он (WAY-122331; Wyeth-Ayerst Pharmaceuticals Inc.), [(3S)-3-(3-циклопентилокси-4-метоксибеніл)-2-метил-5-оксопіразолідиніл]-N-(3-піридилметил)карбоксамід (WAY-127093B; Wyeth-Ayerst Pharmaceuticals Inc.), PDB-093 (Wyeth-Ayerst Pharmaceuticals Inc.), 3-(1,3-діоксобензо[c]азолін-2-іл)-3-(3-циклопентилокси-4-метоксибеніл)-пропанамід (CDC-801; Celgene Corp.), CC-7085 (Celgene Corp.), CDC-998 (Celgene Corp.), NCS-613 (CNRS), CH-3697 (Chiroscience), CH-3442 (Chiroscience), CH-2874 (Chiroscience), CH-4139 (Chiroscience), RPR-114597 (Rhône-Poulenc Rorer), RPR-122818 (Rhône-Poulenc Rorer), (7aS,7R)-7-(3-циклопентилокси-4-метоксибеніл)-7a-метил-2,5,6,7,7a-пентагідро-2-азаніролизин-3-он, GW-3600 (Glaxo-Wellcome), KF-19514 (Kyowa Hakko Kogyo Co Ltd.), CH-422 (CeUtech Group), CH-673 (CeUtech Group), CH-928 (CeUtech Group), D-22888 (Asta Medica), AWD-12-232 (Asta Medica), YM-58997 (Yamanouchi), IC-485 (ICOS Corp.), KW-4490 (Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd.), YM-976 (Yamanouchi), Sch-351591 (CeUtech Group), AWD-12-343 (Asta Medica), N-(3,5-дихлор(4-піридил))-2-{1-[(4-фторфеніл)метил]-5-гідроксііндолін-3-іл}-2-оксоацетамід (AWD-12-281; Asta Medica), ібудиласт (Kyorin Pharmaceutical Co. Ltd.), ціломіласт (SmithKline Beecham), BAY-19-8004 (Bayer), метил-3-{2-[(4-хлорфеніл)карбоніл]-6-гідроксибензо[b]фуран-3-іл}пропаноат, 5-метил-4-[(4-метилтіофеніл)карбоніл]-4-імідазолін-2-он, 5,6-діетоксibenзо[b]тіофен-2-карбонова кислота (Tibenelast) та 4-(3-бромфеніл)-1-етил-7-метилгідропіридино[2,3-b]піридин-2-он (YM-58897; Yamanouchi).

17. Спосіб за п. 1, де інгібітор фосфодіестерази вибраний з групи, до якої входять:

теофілін, ізобутилметилксантин, AN-21-132, Org-30029 (Organon), Org-20241 (Organon), Org-9731 (Organon), зардаверин, вінпоцетин, EHNA (MEP-1), мілринон, сигуазодан, запраинаст, SK+F 96231, толафентрин (Byk Gulden), філамінаст (Wyeth-Ayerst Pharmaceuticals).

18. Спосіб за п. 1, де інгібітор фосфодіестерази вибраний з групи, до якої входять:

цис-4-ціано-4-(3-циклопентилокси)-4-метоксибеніл)-циклогексан-1-карбонова кислота;

3-(циклопентилокси)-N-(3,5-дихлорпіридин-4-іл)-4-метоксибензамід; гідрохлорид 2-(4-(6,7-діетокси-2,3-біс(гідроксиметил)нафталін-1-іл)піридин-2-іл)-4-(3-піридин)фталазин-1(2H)-ону; 7-бензиламіно-6-хлор-2-піперазино-4-піролідіноптеридин.

19. Спосіб збирання овоцитів для запліднення *in vitro*, який включає збирання овоцитів від самки, у якої овуляція була індукована способом за будь-яким з пп. 1-18.

Цей винахід стосується способів підвищення фертильності у самок шляхом індукування овуляції із застосуванням неополіпептидного модулятора рівнів cAMP.

Овуляція - це процес вивільнення яйцеклітини або яйцеклітин з яєчників. Часовий режим овуляції в межах менструального циклу має першорядне значення для запліднення. Добре відомо, що фолікули набувають здатності до овуляції після росту та визрівання; ці процеси стимулюються гонадотропінами гіпофіза. За ріст фолікула відповідальним є переважно фолікулостимуляційний гормон (FSH), а овуляцію стимулює лютеїнізуючий гормон (LH). Цей координований процес стимульованого гонадотропінами визрівання фолікулів забезпечує нормальний стан яйцеклітин при овуляції. Відповідно підготовлена яйцеклітина придатна до запліднення сперматозоїдом через кілька годин після овуляції.

Овуляція є точно визначеним в часі процесом, який регулюється стимуляцією яєчників гонадотропінами гіпофіза і модулюється ростовими та біохімічними реакціями яєчників на стимуляцію гонадотропінами (наприклад, стероїдогенними реакціями, секрецією інгібіну тощо). На протязі нормального менструального циклу у жінок ці гормони вивільнюються та діють у циклічному режимі. Менструальний цикл можна за функціональними ознаками розділити на три фази: фолікулярну, овуляторну та лютеальну. Фолікулярний період починається наприкінці лютеальної фази попереднього циклу, в якому запліднення не мало місця, перед менструацією або одночасно з її початком. Цикл починається з тимчасового підвищення рівня FSH у крові, яке стимулює розвиток групи фолікулів у яєчниках. Розмір фолікулів, стимульованих до росту, становить приблизно 5мм у діаметрі. При нормальному менструальному циклі на протязі фолікулярної фази розвивається звичайно один великий, або домінуючий, фолікул, котрий і зростає до визрівання. У людей розмір фолікула, який вважається готовим до овуляції, становить приблизно 15мм у діаметрі або більше.

Другою подією великого значення, яка відбувається в яєчниках під час фолікулярної фази, є те, що у зернистих клітинах яєчникових фолікулів утворюються рецептори LH, і ці клітини набувають підвищеної чутливості до LH. Секреція естрадіолу та естрогену з яєчників спочатку зростає повільно, паралельно зі збільшенням діаметра фолікула та підвищенням чутливості фолікула до LH. Відносно підвищені рівні естрогену та інгібіну спричиняють пригнічення секреції гормону вивільнення гонадотропіну (GnRH) із гіпоталамуса та секреції гонадотропіну з гіпофіза. Продуктування естрогену досягає максимуму за день до піка LH, і

нейроендокринною реакцією на підвищений рівень естрогену та поступово зростаючі концентрації прогестерону є преовуляторне виділення гонадотропінів, яке обговорюється нижче.

На протязі овуляторної фази має місце зміна нейроендокринної реакції на естрогени та прогестерон. У цей момент циклу підвищений рівень естрогенів спричиняє різке зростання рівнів FSH та LH у сироватці крові; внаслідок позитивного зворотного зв'язку з гіпоталамусом, естроген тепер стимулює швидке зростання рівня GnRH та подальшого вивільнення FSH та LH з гіпофіза. Цей викид гонадотропінів викликає завершення визрівання фолікулів та спричиняє розрив домінуючого, або граафового, фолікула та вивільнення яйцеклітини через приблизно 16-24год після піка LH. В період після преовуляторного викиду рівень естрадіолу в сироватці крові поступово знижується, а рівень прогестерону в плазмі починає підвищуватися.

Після овуляції постовуляторні яєчникові фолікули під впливом LH зазнають лютеїнізації і утворюють жовте тіло (лютеальна фаза). Діагностичними маркерами лютеальної фази менструального циклу є помітне підвищення секреції прогестерону жовтим тілом, та перетворення матки як реакція на прогестерон. З продуктуванням прогестерону в лютеальній фазі пов'язане менш виразне підвищення рівнів естрогенів у сироватці крові. В той час як рівні прогестерону та естрогенів зростають, рівні LH та FSH знижуються на протязі більшої частини лютеальної фази. Наприкінці лютеальної фази менструального циклу, в якому запліднення не мало місця, відбувається регрес жовтого тіла, і рівень FSH починає зростати для ініціювання росту фолікулів у наступному циклі.

FSH та LH відрізняються один від одного здатністю стимулювати відповідно розвиток фолікулів та овуляцію. Відомо, що обидва гормони стимулюють підвищення концентрації внутрішньоклітинного циклічного аденозинмонофосфату (cAMP). Показано, що агенти, які імітують cAMP, наприклад, форсколін або стабільні аналоги cAMP, в дослідженнях *in vitro* спричиняють ефекти, подібні до ефектів FSH, у зернистих клітинах із незрілих фолікулів та ефекти, подібні до ефектів LH, у клітинах зі зрілих фолікулів. Хоча як для FSH, так і для LH запропоновані альтернативні внутрішньоклітинні механізми дії, вважається, що реакцією на обидва гонадотропіни є стимуляція виділення cAMP. В такому разі підвищення рівня cAMP пов'язане з розвитком та визріванням фолікулів, а індукування овуляції залежить від типу клітин та присутності або відсутності відповідних рецепторів. Дійсно, було показано, що у мишей з дефіцитом конкретної фосфодіестерази овуляція порушується, і чутливість зернистих клітин до гонадотропінів

знижена.

Способи лікування неплідності, які застосовуються на даний час у клініці, включають вплив на деякі з регуляторних подій, описаних вище. Одним із засобів, які стимулюють ріст фолікулів та застосовуються для лікування ановуляції, є кломіфен. Кломіфен є нестероїдним антиестрогеном, який конкурує з естрогенами на їхніх паратопах. Вважається, що кломіфен зв'язується з рецепторами естрогенів у гіпоталамусі та гіпофізі та блокує негативний зворотній зв'язок, на який діють яєчникові естрогени. Результатом є підвищений вихід гонадотропінів (FSH та LH) на ранній стадії фолікулярної фази. Дія кломіфену полягає в підвищенні рівня ендogenous FSH у сироватці крові та покращенні росту та визрівання фолікулів. Подальший вплив або ендogenous LH, або екзогенного LH/CG (хоріонічного гонадотропіну) індукує овуляцію у пацієнток.

Окрім кломіфену, жінок лікують, застосовуючи схеми індукування овуляції, які включають використання комерційно доступних препаратів людських гонадотропінів, в тому числі фолікулостимуляційного гормону (FSH) та лютеїнізуючого гормону (LH) або хоріонічного гонадотропіну (CG). Усі ці засоби вперше були одержані шляхом очищення з сечі вагітних жінок, а більш сучасним способом їх одержання є рекомбінантна технологія. Як правило, таке лікування має високу ефективність відносно стимулювання фолікулогенезу та стероїдогенезу. Ускладнення при такому лікуванні виникають внаслідок того, що згадані препарати та схеми здатні гіперстимулювати розвиток фолікулів та їхнє визрівання. У деяких пацієнток може виникати гіперстимуляція яєчників, наслідком якої може бути множинна овуляція та подальша багатоплідність. Гіперстимуляція яєчників не тільки може загрожувати життю матері, але й, як правило, призводить до народження дітей зі зниженою масою тіла, які потім потребують інтенсивного догляду. Вважається, що основні ускладнення, які приписуються індукованій гонадотропінами гіперстимуляції та багатоплідною вагітністю, виникають внаслідок довготривалого ефекту hCG (хоріонічного гонадотропіну людини). Крім того, застосування гонадотропінів в схемах індукування овуляції може після ін'єкції спричинити побічні реакції, які можуть мати як локальний, так і системний характер. Таким чином, розроблення схем індукування овуляції із застосуванням пероральних активних речовин із пом'якшеною активністю, подібною до дії гонадотропінів, мало б значний позитивний ефект у порівнянні зі способами лікування, при яких застосовуються високоактивні препарати для ін'єкцій. Ще більше значення мало б розроблення схем індукування овуляції, при яких досягалася б менша інтенсивність гіперстимуляції яєчників і, отже, забезпечувалася б більша безпека для матері та кращий стан здоров'я новонароджених.

За першим аспектом, цей винахід пропонує застосування непептидного модулятора рівня cAMP, за варіантом, якому віддається перевага, інгібітора PDE (фосфодіестерази), за варіантом, якому віддається більша перевага, інгібітора PDE4, для виготовлення лікарського засобу для індукування овуляції у пацієнтки.

За другим аспектом, цей винахід пропонує застосування непептидного модулятора рівня cAMP, за варіантом, якому віддається перевага, інгібітора PDE, за варіантом, якому віддається більша перевага, інгібітора PDE4, для індукування овуляції у пацієнтки.

За третім аспектом, цей винахід пропонує застосування непептидного модулятора рівня cAMP, за варіантом, якому віддається перевага, інгібітора PDE, за варіантом, якому віддається більша перевага, інгібітора PDE4, для виготовлення лікарського засобу для індукування овуляції у пацієнтки в схемі лікування, за якою перед індукуванням овуляції індукується визрівання фолікулів кломіфеном або інгібітором ароматази, за варіантом, якому віддається перевага, інгібітором ароматази, вибраним із групи, до якої входять YM-511, летрозол, фадрозол та анастрозол, за варіантом, якому віддається більша перевага, з групи, до якої входять летрозол та анастрозол.

За четвертим аспектом, цей винахід пропонує застосування непептидного модулятора рівня cAMP, за варіантом, якому віддається перевага, інгібітора PDE, за варіантом, якому віддається більша перевага, інгібітора PDE4, для індукування овуляції у пацієнтки в схемі лікування, за якою перед індукуванням овуляції індукується визрівання фолікулів кломіфеном або інгібітором ароматази, за варіантом, якому віддається перевага, інгібітором ароматази, вибраним із групи, до якої входять YM-511, летрозол, фадрозол та анастрозол, за варіантом, якому віддається більша перевага, з групи, до якої входять летрозол та анастрозол.

За п'ятим аспектом, винахід пропонує комплект для застосування при індуванні овуляції, який включає в себе дозу непептидного модулятора рівня cAMP, за варіантом, якому віддається перевага, інгібітора PDE, за варіантом, якому віддається більша перевага, інгібітора PDE4, та інструкції з його застосування для індукування овуляції.

За шостим аспектом, винахід пропонує комплект для застосування при індуванні овуляції та/або в технології сприяння репродукції (ART), який включає в себе достатні добові дози FSH та/або сполуки, що має ефект, подібний до ефекту FSH, за варіантом, якому віддається перевага, кломіфену або інгібітора ароматази, за варіантом, якому віддається більша перевага, інгібітора ароматази, вибраного з групи, до якої входять YM-511, летрозол, фадрозол та анастрозол, для спричинення визрівання фолікулів, та достатню для індукування овуляції дозу непептидного модулятора рівня cAMP, за варіантом, якому віддається перевага, інгібітора PDE, за варіантом, якому віддається більша перевага, інгібітора PDE4, та інструкції із застосування комплексу при індуванні овуляції або в ART.

За сьомим аспектом, цей винахід пропонує застосування непептидного модулятора рівня cAMP, за варіантом, якому віддається перевага, інгібітора PDE, за варіантом, якому віддається більша перевага, інгібітора PDE4, для індукування овуляції у пацієнтки в схемі лікування, за якою для індукування овуляції застосовуються також hCG або LH,

та hCG або LH застосовуються у зменшеній дозі порівняно з кількістю hCG або LH, нормально необхідною для індукування овуляції у тієї самої пацієнтки.

Цей винахід стосується способу підвищення фертильності у самок, який включає введення в організм самки неополіпептидного модулятора рівня циклічного аденозинмонофосфату (сAMP). В іншому аспекті, винахід передбачає конкретне введення в організм неополіпептидного модулятора рівня сAMP для індукування овуляції домінантного зрілого фолікула перед лютеальною фазою овуляторного циклу. До неополіпептидних модуляторів рівня сAMP, яким віддається перевага, належать інгібітори фосфодіестерази, зокрема, інгібітори ізоформ фосфодіестерази-4.

Хоча вплив інгібіторів PDE на стимульоване LH вивільнення стероїдів із зернистих клітин *in vitro* є відомим, цей винахід розкриває два нових виявлених факти. По-перше, інгібітори PDE не покращують стимульований FSH ріст *in vivo*, незважаючи на загальновизнану роль сAMP в механізмах дії як FSH, так і LH у клітинах. Крім того, наведено свідчення, що інгібітори PDE покращують стимульоване гонадотропінами вивільнення стероїдів *in vitro*, що додатково ілюструє новий вплив інгібіторів PDE на овуляцію, яка залежить від LH. По-друге, інгібітори PDE збільшують коефіцієнт овуляції *in vivo* у відсутності доданих LH або hCG. З урахуванням активності інгібіторів PDE при пероральному застосуванні, цей другий виявлений факт забезпечує основу для першої потенційно безін'єкційної схеми індукування овуляції, оскільки інгібітори PDE можуть застосовуватися в поєднанні з відомими схемами, як описано нижче.

Цей винахід також передбачає стимуляцію розвитку фолікулів перед застосуванням неополіпептидного модулятора рівня сAMP, яка включає введення в організм пацієнтки засобу, який підвищує концентрацію FSH на протязі фолікулярної фази овуляторного циклу пацієнтки. Підвищення рівня FSH за цим винаходом стосується тільки розвитку та визрівання фолікулів, але не індукування овуляції. До засобів, яким віддається перевага, належать сам FSH, кломіфен, селективні модулятори рецепторів естрогенів, інгібітори ароматази та селективні модулятори нейроендокринного регулювання продуктування FSH.

За ще одним аспектом, винахід передбачає спільне введення в організм неополіпептидного модулятора рівня сAMP та LH або хоріонічного гонадотропіну (CG) перед лютеальною фазою овуляторного циклу самки. Таке спільне введення можна здійснювати послідовно або одночасно, а також однаковими або різними способами (наприклад, парентерально та/або перорально). Крім того, винахід передбачає застосування нижчих концентрацій LH або CG у порівнянні з концентраціями, які застосовуються за існуючими схемами індукування овуляції, і зниження, таким чином, імовірності гіперстимуляції яєчників.

Крім того, цей винахід передбачає застосування неополіпептидного модулятора рівня сAMP як лікарського засобу для заміни LH або hCG при збиранні овоцитів для запліднення *in vitro* або для підвищення ефективності дії LH або hCG.

Таким чином, цей винахід передбачає застосування неополіпептидного модулятора рівня сAMP як низькомолекулярного лікарського засобу (наприклад, інгібітора фосфодіестерази), який вводиться в організм перорально, а не шляхом ін'єкції, яка є необхідним способом введення протеїнів в існуючих схемах індукування овуляції. Пероральне введення виключає гострі та системні побічні ефекти, пов'язані з такими ін'єкціями. В першу чергу, згаданий низькомолекулярний лікарський засіб є ефективним при індуванні овуляції і може застосовуватися окремо або в комбінації чи без комбінації з LH або CG, і, альтернативно, з нижчими концентраціями LH або CG порівняно з використовуваними на цей час, і, отже, зменшує імовірність гіперстимуляції яєчників та пов'язаних із нею ризиків. Таким чином, можна запобігти багатоплідності та ускладнень, загрозливих для матері та новонароджених. Крім того, цей винахід передбачає можливість більш раннього діагностичного тестування на вагітність у порівнянні з існуючими схемами індукування овуляції, які включають застосування CG.

Способи лікування за цим винаходом корисні для лікування неплідності у людей, але також у інших ссавців (наприклад, у коней та сільськогосподарських тварин, наприклад, у великої рогатої худоби, овець, корів тощо), та в інших видів, наприклад, риб та птахів (наприклад, курей тощо).

Короткий опис фігур

На Фіг.1 схематично зображена узагальнена схема індукування овуляції у людей.

На Фіг.2 показано у вигляді стовпчастої діаграми вплив інгібіторів фосфодіестерази (тобто сполуки 1 та сполуки 2) на підвищення внутрішньоклітинного рівня сAMP у зернистих клітинах *in vitro*.

На Фіг.3 показано у вигляді стовпчастої діаграми вплив інгібітора фосфодіестерази (тобто сполуки 1) на визрівання фолікулів у пацюків *in vivo*.

На Фіг.4 у вигляді стовпчастої діаграми показано вплив інгібітора фосфодіестерази (тобто сполуки 1) на овуляцію у пацюків *in vivo* у присутності CG.

На Фіг.5 у вигляді стовпчастої діаграми показано вплив інгібітора фосфодіестерази (тобто сполуки 1) на овуляцію у пацюків *in vivo* у присутності та у відсутності CG.

На Фіг.6 у вигляді стовпчастої діаграми показано вплив інгібітора фосфодіестерази (тобто сполуки 2) на овуляцію у пацюків *in vivo* у присутності та у відсутності CG.

На Фіг.7 у вигляді стовпчастої діаграми показано вплив інгібітора фосфодіестерази (тобто сполуки 2) на овуляцію після перорального та підшкірного введення.

На Фіг.8 у вигляді стовпчастої діаграми показано вплив інгібітора PDE сполуки 3 на овуляцію *in vivo* після перорального та підшкірного введення.

На Фіг.9 у вигляді стовпчастої діаграми показано вплив інгібітора PDE сполуки 4 на овуляцію *in vivo* у присутності та у відсутності субефективної дози hCG.

На Фіг.10 у вигляді стовпчастої діаграми показано вплив інгібітора PDE сполуки 2 на овуляцію

та фертильність.

І. Визначення

Як правило, подані нижче слова або вирази вживаються в описі, прикладах та формулі винаходу у значеннях, що відповідають поданим визначенням.

"Введення в організм" означає доставку лікарського засобу в організм самки. В контексті цього винаходу цей термін охоплює доставку неополіпептидного модулятора рівня cAMP та/або засобу, який підвищує концентрацію FSH. Більш детально значення цього терміну описані в розділі "Фармацевтичні композиції" цього опису.

Термін "овуляція" стосовно до цього винаходу означає процес вивільнення яйцеклітини або яйцеклітин з яєчників. При наближенні середини циклу відбувається різкий зріст рівня естрогенів, після якого відбувається викид LH та, меншою мірою, FSH. Ці зміни індукують овуляцію домінантного фолікула. Овуляція полягає в швидкому збільшенні розміру фолікула з подальшим висунанням фолікула над поверхню кори яєчника. Нарешті, розрив фолікула спричиняє викид овоцитного комплексу. Потім залишок домінантного фолікула перетворюється в жовте тіло.

Термін "ановуляція" означає відсутність овуляції.

Термін "неполіпептидний модулятор рівня cAMP" стосується сполук, які в повному обсязі не складаються з амінокислот, незалежно від глікозидування, і прямим або непрямим шляхом спричиняють зростання внутрішньоклітинного рівня cAMP. Такі сполуки можуть спричинити підвищення рівня cAMP шляхом стимуляції синтезу cAMP або пригнічення його розкладу, або ж обома цими шляхами. Прикладами модуляторів, які інтенсифікують синтез cAMP, є активатори аденілатциклази, наприклад, форсколін. Прикладами модуляторів, які послаблюють розклад cAMP, є інгібітори фосфодіестерази, наприклад, теофілін.

Термін "самка" означає особу або особину жіночої статі певного виду, в організм якої вводяться лікарські засоби за цим винаходом. Це визначення охоплює людей, інших ссавців та інші види, наприклад, риб та свійських птахів.

Термін "інгібітор фосфодіестерази" стосується хімічних сполук, які блокують або пригнічують фосфодіестерази (PDE), які інактивують відповідні циклічні нуклеотиди-мішені (тобто cAMP та cGMP) шляхом гідролітичного розщеплення зв'язку 3'-фосфодієфіру, результатом чого є пасивне нагромадження специфічних циклічних нуклеотидів. Інгібітори можуть бути неселективними і діяти на всі ізоформи фосфодіестерази або селективними відносно конкретних ізоформ. Ці сполуки описані нижче.

Термін "ізоформи фосфодіестерази" стосується сімейства ізоферментів або ізоформ, відповідальних за метаболізм або розклад внутрішньоклітинних вторинних месенджерів, cAMP та cGMP. Специфічні ізоформи можуть мати високоселективну клітинну та субклітинну локалізацію. Прикладами ізоформ фосфодіестерази є PDE3 та PDE4.

Термін "фолікулярна фаза" означає першу частину менструального циклу, яка характеризується поступовим підвищенням рівнів циркулюючих ес-

трогенів та інгібіну В під впливом граафова фолікула, що розвивається.

Термін "перед лютеальною фазою" означає період менструального циклу перед переходом від фолікулярної фази, котра регулюється естрогенами, до лютеальної фази, що регулюється прогестероном. Рівні естрогенів перед лютеальною фазою, як правило, перевищують або дорівнюють 150 пг/мл на фолікул для фолікула діаметром 16 мм, при цьому діаметр фолікула, як правило, не менше ніж 14 мм. Ці критерії не є абсолютними і варіюються від пацієнтки до пацієнтки. В контексті цього винаходу та з точки зору моменту введення неополіпептидного модулятора рівня cAMP, неополіпептидний модулятор рівня cAMP можна вводити в організм самки в момент часу, який відповідає відомій схемі індукування овуляції, за якою в організм згаданої самки звичайно вводяться hCG або LH.

Термін "овуляторний цикл" або "менструальний цикл" означає циклічну послідовність подій, які відбуваються протягом характерного для даного виду періоду часу, яка включає ріст та розвиток фолікулів, їх активізацію, селекцію, домінування, овуляцію та утворення й вмирання жовтого тіла. Функційно згаданий цикл можна підрозділити на три фази: фолікулярну, овуляторну та лютеальну. Цей цикл може зватися також менструальним циклом.

Термін "індукування овуляції" означає процес, в якому поліпептид(и) та/або синтетична хімічна речовина застосовуються з метою викликати овуляцію у самок, які в іншому разі є ановуляторними; результатом цього процесу є індукування розриву фолікула та овуляція здатних до запліднення овоцитів. Індукування овуляції не охоплює попередніх подій на протязі овуляторного циклу, які включають визрівання та розвиток фолікулів.

Термін "гіперстимуляція яєчників" стосується фармакологічного втручання в овуляторний або ановуляторний менструальний цикл. Це втручання викликає визрівання множинних фолікулів, наслідком якого є кодомінування кількох фолікулів та наявність кількох здатних до запліднення овоцитів.

Термін "фолікул" означає заповнений рідиною пухирець, що оточує яйцеклітину; цей пухирець містить також зернисті клітини.

Термін "розвиток фолікула" означає поступовий ріст та розвиток яєчникових фолікулів, зокрема, під час фолікулярної фази овуляторного циклу, результатом якого є активізація та домінування фолікула, призначеного для овуляції.

Термін "фолікулостимуляційний гормон (FSH) та його ізоформи" стосується гормону, який виділяється гіпофізом та стимулює ріст яєчникових фолікулів, та ізоформ FSH, описаних, наприклад, в патенті США №5,087,615, включеного до цього опису шляхом посилання.

Термін "селективні модулятори рецепторів естрогенів" стосується хімічних сполук або поліпептидів, які діють як антагоністи рецепторів естрогенів на рівні гіпоталамуса та гіпофіза та як агоністи - на рівні матки. Прикладами таких модуляторів можуть бути тамоксифен, ралоксифен, тореміфен, кломіфен та дролоксифен. Джерело - Endocrinology, 1999, 138(12):5476-5484 - включено до цього

опису шляхом посилання.

Термін "інгібітори ароматази" стосується хімічних сполук або поліпептидів, які блокують або пригнічують активність ароматази, котра є ферментом, що перетворює андрогени в естрогени. Прикладами інгібіторів ароматази є летрозол, анастрозол та ворозол. Джерела: 1) J. of Endocrinology, 2000 Feb., 164(2):225-238; i 2) J. of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1997 April, 61(3-6): 157-166, включено до цього опису шляхом посилання.

Термін "аналогічні стероїдогенні ферменти" охоплює будь-який фермент, який бере участь у каталізі біохімічних реакцій, результатом яких є синтез естрогенів та прогестерону, в тому числі 3- β -гідроксистероїд-дегідрогенази; до інгібіторів цього ферменту належать даїдзеїн, геністеїн, біочанін А та формонетин. Джерело, J. of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1996 April, 58(1):95-101, включено до цього опису шляхом посилання.

Термін "кломіфен" означає 2-[4-(2-хлор-1,2-діфенілетеніл)фенокси]-N,N-діетилетанамін та його солі.

Термін "лютеїнізуючий гормон" означає гормон, який виділяється гіпофізом і виконує подвійну функцію: викликає вивільнення яйцеклітини з домінуючого фолікула та стимулює секрецію прогестерону з жовтого тіла.

Термін "знижені концентрації" означає концентрації введеного засобу, знижені у порівнянні зі стандартними концентраціями введених засобів. В контексті цього винаходу в організм пацієнтки вводять нижчі концентрації LH або CG, ніж за відомими схемами індукування овуляції.

Термін "відомі схеми індукування овуляції" означає сучасні способи індукування овуляції, які включають застосування кломіфену, гонадотропнів (тобто FSH, LH або CG) або комбінації цих засобів для сприяння фолікулогенезу та індукованій овуляції у ановуляторних самок. Ці схеми варіюють стосовно до часового режиму, частоти введення та концентрації введених засобів. Це визначення охоплює модифікації відомих схем, якщо вони вимагають введення hCG або LH у певний момент часу в період застосування схеми індукування овуляції. До цього опису включено шляхом посилання способи лікування жіночої неплідності, стимуляції фолікулогенезу та індукування овуляції, описані в таких монографіях: "Репродуктивна ендокринологія, хірургія та технологія" [Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology, Vol.1 and 2, Editors: E.Y. Adashi, J.A. Rock and Z. Rosenwaks, Lippincott-Raven Publ., Philadelphia, 1996] та "Сучасна практика терапії жіночої неплідності" [Female Infertility Therapy Current Practice, Editors: Z. Shogam, CM. Howies and H.S. Jacobs, Martin Dunitz Ltd., London, 1999].

Термін "хоріонічний гонадотропін" означає глікопротеїновий гормон, біологічно та імунологічно подібний до гіпофізного LH. При нормальній вагітності CG продукується плацентою і може бути використаний як діагностичний маркер вагітності за ознакою його підвищеної концентрації у сироватці крові. Аббревіатура hCG означає хоріонічний гонадотропін людини.

Термін "засіб, що підвищує концентрацію FSH" означає будь-яку композицію речовин, протеїн або синтетичну хімічну сполуку, яка, будучи введена в організм самки, підвищує рівень концентрації FSH у сироватці крові прямим або непрямым шляхом, тобто шляхом введення FSH як такого або засобу, який стимулює ендогенне продукування FSH або пригнічує його ендогенний розклад. Визначення цього виразу та такого засобу охоплює сполуки, які можуть не підвищувати концентрацію FSH, але мають біологічну функцію та активність фолікулостимуляційного гормону.

II. Принципи індукування овуляції

Проблеми неадекватності або невідповідності рівнів гонадотропнів як причини овуляторної дисфункції відомі з 1960-х років. Клінічна ефективність застосування різноманітних препаратів гонадотропнів була пропорційна до кількості введеного FSH. Перші одержані результати свідчили, що екзогенний LH не є необхідним для адекватного фолікулогенезу при індуванні овуляції. Проте виявилося, що жінки, які одержували тільки екзогенний FSH, не здатні продукувати фолікулярний естрадіол в адекватній кількості для індукування овуляції. Виявилося, що присутність щонайменше деякої кількості екзогенного або ендогенного LH має важливе значення для індукування овуляції у людей. На Фіг.1 схематично зображено узагальнену схему індукування овуляції. Пацієнтці вводять препарат FSH в кількості 75МО на добу протягом перших 7 днів. В кінці 7-го дня виконують ультразвукове сканування для оцінки діаметра фолікулів та вимірюють рівень естрадіолу в сироватці крові. Якщо діаметр фолікулів менше ніж 12мм, то подвоюють дозу FSH і повторно виконують ультразвукове сканування через інші 5-7 днів. Пацієнтки з фолікулами діаметром ≥ 15 мм одержують овуляторну дозу hCG у вигляді болюса.

III. Узагальнена схема індукування овуляції

Індукування овуляції являє собою рівною мірою мистецтво та науку. Незважаючи на значну кількість систематизованих методик лікування, жодний з підходів або конкретних способів не є однозначно правильним. Проте застосовуються деякі принципи, які забезпечують основу безпечного та ефективного лікування. Слід зазначити, однак, що описані нижче критерії індукування овуляції подано тільки як приклади і можуть варіювати в широких межах залежно від клініки, стану пацієнтки та мети лікування.

Перший цикл включає, як правило, щоденне введення FSH, починаючи з 4-7-го дня після припинення кровотечі. Виконується моніторинг росту та реакції фолікулів шляхом ультразвукового дослідження та визначення рівня естрогенів. Адекватна стимуляція фолікулів досягається звичайно за 7-14 днів безперервного застосування FSH. Лікування FSH протягом менше ніж 8 днів пов'язане з підвищенням коефіцієнта спонтанного викидня у вагітних пацієнток.

Після досягнення достатнього ступеня розвитку фолікулів (два фолікули діаметром 16-18мм у сукупності з поступовим зростанням рівня естрогенів у сироватці крові до 500-1000пг/мл) вводять hCG (5000 або 10000МО). Момент введення hCG має важливе значення, оскільки основні усклад-

нення, що пов'язані з індукованою гонадотропінами гіперстимуляцією та багатоплідною вагітністю, ймовірно, виникають внаслідок надмірної тривалості дії hCG. Хоча період напіввиведення hCG становить приблизно 8 год, його можна виявити в крові пацієнтки протягом 7-10 діб після ін'єкції і на цій основі поставити неправильний діагноз вагітності як успішного результату лікування. Після введення hCG партнерам повідомляють, що вони повинні мати статеві стосунки найближчої ночі та ще один або два рази протягом наступних 48 год.

Фундаментальне правило відносно введення гонадотропіну полягає в тому, що кожний цикл лікування має бути індивідуалізованим, контролюватися та коригуватися відповідним чином. Моніторинг необхідний не тільки для підвищення коефіцієнтів овуляції та вагітності, але й для зменшення ризику сильної гіперстимуляції яєчників та її потенціальних наслідків та багатоплідних вагітностей.

Ця мета досягається шляхом частого визначення рівня естрадіолу в плазмі та сироватці крові та ультразвуковим дослідженням яєчників. Рівні естрадіолу, як правило, корелюють із кількістю фолікулів, що ростуть, але не обов'язково з кількістю зрілих фолікулів. Застосування рівнів естрадіолу як маркера зрілості фолікулів може в разі присутності великої кількості дрібних фолікулів призвести до невірної висновку про зрілість фолікулів, наслідком чого може стати передчасне введення hCG. Оскільки ріст фолікула безпосередньо корелює з визріванням яйцеклітини, то оцінка середнього діаметра фолікулів ультразвуковим методом може бути кращим індикатором зрілості фолікулів при визначенні моменту введення hCG. Тому рівні естрогенів мають застосовуватися для оцінки ранніх стадій розвитку фолікулів як індикатор реакції на гонадотропін, а для оцінки кількості та розміру фолікулів, що визрівають, слід застосовувати ультразвук.

Метою лікування в більшості випадків є забезпечення максимальної можливості одноплідної вагітності при одночасному зниженні ризику виникнення синдрому гіперстимуляції. Виявлено, що оптимальними є рівні естрадіолу в межах від 1000 пг/мл до 1500 пг/мл, проте реальні рівні можуть варіювати залежно від використовуваного лабораторного методу та досвіду лікаря. Ризик гіперстимуляції збільшується при підвищених рівнях естрадіолу. Як правило, якщо рівень естрадіолу в сироватці крові перевищує 2000 пг/мл, hCG слід вводити дуже обережно або відкласти і дати фолікулам регресувати. При гіпогонадотропному гіпогеніталізмі ризик тяжкої гіперстимуляції при рівні естрадіолу понад 2400 пг/мл становить 5% у циклах із завагітнінням та 1% у циклах без завагітніння. Крім того, оскільки гіперстимуляція має тенденцію корелювати з присутньою кількістю фолікулів, рішення про відкладення застосування hCG може базуватися на виявленні 10 або більше фолікулів, що розвиваються, при ультразвуковому дослідженні.

До цього опису включено шляхом посилання способи лікування жіночої неплідності, стимуляції фолікулогенезу та індукування овуляції, описані в таких монографіях: "Репродуктивна ендокринологія, хірургія та технологія" [Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology, Vol.1 and 2, Editors: E.Y. Adashi, J.A. Rock and Z. Rosenwaks, Lippincott-Raven Publ., Philadelphia, 1996] та "Сучасна практика терапії жіночої неплідності" [Female Infertility Therapy Current Practice, Editors: Z. Shogam, CM. Howies and H.S. Jacobs, Martin Dunitz Ltd., London, 1999].

IV. Способи за цим винаходом

Цей винахід стосується способу індукування овуляції, який включає введення в організм самки неополіпептидного модулятора рівня cAMP у схемі індукування овуляції, де згаданий модулятор застосовують для підвищення ефективності або для заміни введення hCG (або LH), які звичайно вводять перед лютеальною фазою індукованого або природного овуляторного циклу.

Модулятор можна вводити окремо або спільно з hCG (або LH), одночасно або послідовно з цими засобами, а також однаковими або різними шляхами (наприклад, парентерально або перорально).

За іншим аспектом, винахід передбачає спільне одночасне або послідовне введення неополіпептидного модулятора рівня cAMP та LH або CG перед лютеальною фазою овуляторного циклу самки. Крім того, оскільки вважається, що основні ускладнення, що пов'язані з індукованою гонадотропінами гіперстимуляцією та багатоплідною вагітністю, ймовірно, виникають внаслідок надмірної тривалості дії hCG, винахід передбачає введення в організм пацієнтки знижених концентрацій LH або CG у порівнянні з концентраціями, які застосовуються у відомих схемах індукування овуляції, і, таким чином, зниження ймовірності гіперстимуляції яєчників і, отже, запобігання негативним ефектам, пов'язаним із таким станом: багатоплідності, малій масі тіла новонароджених та ускладненням зі здоров'ям матері.

Слід відзначити, що введення в організм неополіпептидного модулятора рівня cAMP не спричиняє терапевтичного впливу на визрівання та розвиток фолікулів на протязі овуляторного циклу.

Таким чином, цей винахід стосується способу індукування овуляції, який включає введення в організм самки неополіпептидного модулятора рівня циклічного аденозинмонофосфату (cAMP). Неополіпептидні модулятори рівня cAMP прямим або непрямим шляхом спричиняють зростання внутрішньоклітинного рівня cAMP. Такі сполуки можуть спричинити підвищення рівня cAMP шляхом стимуляції синтезу cAMP або пригнічення його розкладу, або ж обома цими шляхами. Прикладами модуляторів, які інтенсифікують синтез cAMP, є активатори аденілатциклази, наприклад, форсколін. Прикладами модуляторів, які послаблюють розклад cAMP, є інгібітори фосфодіестерази, наприклад, теофілін. До неополіпептидних модуляторів рівня cAMP, яким віддається перевага, належать інгібітори фосфодіестерази, зокрема, інгібітори ізоформ фосфодіестерази-4.

За ще одним аспектом, винахід передбачає конкретне введення в організм неополіпептидного модулятора рівня cAMP перед лютеальною фазою овуляторного циклу як засобу для підвищення ефективності hCG або для заміни hCG за схемою індукування овуляції, в якій hCG вводять, як пра-

вило, наприкінці фолікулярної фази, але перед лютеальною фазою овуляторного циклу.

Моментом введення неополіпептидного модулятора рівня cAMP, якому віддається перевага, є час перед лютеальною фазою овуляторного циклу.

Винахід передбачає також стимуляцію розвитку фолікулів перед застосуванням неополіпептидного модулятора рівня cAMP перед індукуванням овуляції, яка включає введення в організм пацієнтки засобу, який підвищує концентрацію фолікулостимуляційного гормону (FSH) на протязі фолікулярної фази овуляторного циклу пацієнтки. До засобів, яким віддається перевага, належать сам FSH, кломіфен, селективні модулятори рецепторів естрогенів, інгібітори ароматази та засоби, які не є FSH, але мають біологічну функцію та активність FSH. Таким чином, введення описаних у цьому документі засобів у певний момент часу відносно росту та визрівання фолікула заявлено як спосіб удосконалення процесу овуляції та подальшого запліднення, яке має відбутися для забезпечення вагітності.

Слід відзначити, що в разі, коли неополіпептидний модулятор рівня cAMP застосовується окремо, а не спільно з hCG, цей винахід передбачає можливість більш раннього діагностичного тестування на вагітність у порівнянні з існуючими схемами індукування овуляції, які включають застосування CG.

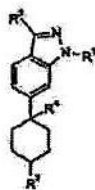
V. Інгібітори фосфодіестерази

Як інгібітори фосфодіестерази, придатні для застосування як неополіпептидні модулятори рівня cAMP, в способах за цим винаходом можуть бути застосовані практично будь-які нетоксичні інгібітори PDE, в тому числі селективні та неселективні інгібітори PDE4. До придатних неселективних інгібіторів PDE4 та комбінованих інгібіторів PDE3/PDE4 належать теофілін, ізобутилметилксантин, AH-21-132, Org-30029 (Organon), Org-20241 (Organon), Org-9731 (Organon), зардаверин, вінпоцетин, EHNA (MEP-1), мілринон, сизагодан, запринаст, SK+F 96231, толафентрин (Byk Gulden), філамінаст (Wyeth-Ayerst Pharmaceuticals).

Особлива перевага віддається селективним інгібіторам, специфічним щодо PDE4. Численні відомі селективні інгібітори PDE4 належать до одного із шести класів хімічних структур: аналогів роліпраму, ксантинів, нітраквасонів, бензофуранів, нафталінів та хінолінів. Прикладами аналогів роліпраму є імідазолідинони та піролізидинони - міметики роліпраму та Ro 20-1724, а також бензамідні похідні роліпраму, наприклад, RP 73401 (Rhône Poulenc Rorer). До аналогів ксантину належать денбуфілін (SmithKline Beecham) та арофілін (Almirall). Аналогами нітраквасону є, наприклад, CP-77,059 (Pfizer) та ряд пірид[2,3(i)]піридазин-5-онів (Syntex). До аналогів бензофурану належить EP-685479 (Bayer). До аналогів нафталіну належить T-440 (Tanabe Seiyaku); до аналогів хіноліну належить SDZ-ISQ-844 (Novartis).

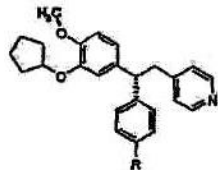
Більша перевага віддається переліченим нижче сполукам:

Сполуки, розкриті в WO 97/42174 (Pfizer, Inc.):



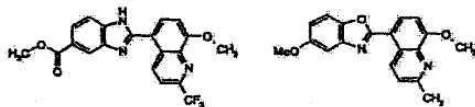
де R^1 є циклопентил або циклогексил, R^2 є етил, R^3 є група карбонової кислоти, складного ефіру або первинного аміду, гідроксиметил або карбоніл, і R^4 є ціаногрупа;

Сполуки, розкриті в патентах США №5,710,160 та №5,710,170 [Merck Frost Canada, Inc.]:

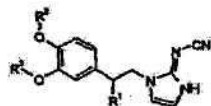


де R вибраний з групи, до якої входять H, CO-(4-метіперазиніл), CO-(4-піролідиніл), CHNOH, 5-тетразоліл, (CH)OHCH₃, COCH₃, CONHSO₂CH₃, CONHSO₂Ph, CONHSO₂CF₃, CONHSO₂C₆H₄CH₃(o), CH₂CONHSO₂Ph, CH₂CONHSO₂CF₃, COH(CF₃)₂ та SO₂NHCOC₆H₄CH₃(o).

Сполуки, розкриті в WO 98/2007 (Darwin Discovery), прикладами яких є:

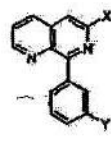


Сполуки, розкриті в WO 98/14432 (Janssen Pharm NV):

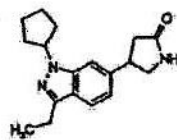


де R^1 є H або CH₃, R^2 є CH₃ або CHF₂, R^3 є циклопентил, інданіл, циклопропілметил, Ph(CH₂)₅, ТГФ.

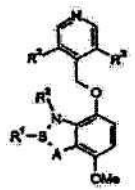
Сполуки, розкриті в WO 98/18796 (Novartis):



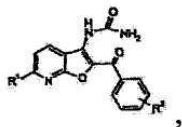
де X є NH₂, OH, NHPh, NPh₂, Ph, C₆H₄CO₂H та Y є Cl, CN, NO₂. Сполуки, розкриті в WO 97/49702 (Pfizer, Inc.), прикладом яких є:



Сполуки, розкриті в WO 97/48697 (Rhône Poulenc Rorer):

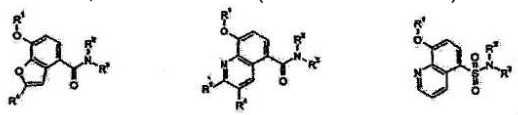


де R^1 є циклопентан, циклопропіл, $\text{Ph}(\text{CH}_2)_3$, бензил або Н, R^2 є CH_3 , бензил, тозил або Н, R^3 є CH_3 або Cl , А є CH , С-алкіл, О або N , і В є С або N .
Сполуки, розкриті в WO 98/02440 (Bayer AG):



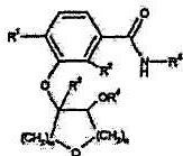
де R^1 є CH_3 , OH , О-аліл, OCH_3 , C_2H_5 , пропіл або ацетил, R^2 є 3- Cl , 2,4- Cl_2 , 3- NO_2 , 3- Br , 4- F , 4- Cl , 2,4- $(\text{CH}_3)_2$ або 2,4- $(\text{CH}_3\text{O})_2$.

Сполуки, розкриті в WO 97/44337, WO 97/44036, WO 97/44322 (Chiroscience Ltd.):



де R^1 є CH_3 , етил або пропіл, R^2 та R^3 незалежно один від одного вибрані з групи, до якої входять Н, факультативно заміщений арил або гетероарил, і R^4 та R^5 незалежно один від одного вибрані з групи, до якої входять ацил, алкіл (факультативно заміщений OH або галогеном), арил, гетероарил та ацил, заміщений арилом або гетероарилом.

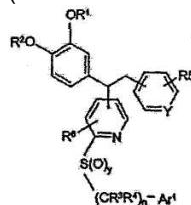
Сполуки, розкриті в патенті США №6,303,789 (Byk Gulden Lomberg Chemical Fabrik GmbH):



де R^1 є $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкокси-, $\text{C}_3\text{-C}_7$ -циклоалкокси-, $\text{C}_3\text{-C}_7$ -алкоалкілметокси-, бензилоксигрупа або $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкоксигрупа, повністю або переважно заміщена фтором; R^2 є водень; R^3 є водень; або R^2 та R^3 спільно утворюють метиленову групу; R^4 є водень, $\text{C}_1\text{-C}_8$ -алкіл, $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкокси- $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкіл, $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкілтіо- $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкіл, $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкілсульфініл- $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкіл, $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкілсульфоніл- $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкіл, $\text{C}_1\text{-C}_8$ -алкілкарбоніл, $\text{C}_3\text{-C}_7$ -циклоалкіл, $\text{C}_3\text{-C}_7$ -циклоалкілметил, феніл- $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкіл або $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкіл, повністю або переважно заміщений фтором; R^5 є феніл, піридил, феніл, заміщений R^{51} , R^{52} та R^{53} , або піридил, заміщений R^{54} , R^{55} , R^{56} та R^{57} , де R^{51} є гідроксил, галоген, ціаногрупа, карбоксил, трифторметил, $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкіл, $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкоксигрупа, $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкоксикарбоніл, $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкілкарбоніл, $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкілкарбонілокси-, аміно-, моно- або ди- $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкіламіно- або $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкілкарбоніламіногрупа; R^{52} є водень, гідроксил, галоген, аміногрупа, трифторметил, $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкіл або $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкоксигрупа; R^{53} є водень, галоген, $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкіл або $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкоксигрупа; R^{54} є гідроксил, галоген, ціаногрупа, карбоксил, $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкіл, $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкоксигрупа, $\text{C}_1\text{-C}_4$ -

алкоксикарбоніл або аміногрупа; R^{55} є водень, галоген, аміногрупа або $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкіл; R^{56} є водень або галоген; R^{57} є водень або галоген; n є 1 або 2; m є 1 або 2, причому сума n та m може мати тільки значення 2 або 3; солі цих сполук та N -оксиди піридинів або їхні солі.

Сполуки, розкриті в патенті США №6,316,472 (Merck Frost Canada):



або їхні фармацевтично прийнятні солі або гідрати, де:

Y означає N або N-оксид;

у є 0, 1 або 2;

R^1 та R^2 незалежно один від одного вибрані з групи, до якої входять Н, $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкіл та галоген- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкіл;

R^3 та R^4 незалежно один від одного вибрані з групи, до якої входять Н та $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкіл, або R^3 та R^4 , приєднані до одного й того самого атому вуглецю, спільно являють собою карбонільний атом кисню, або R^3 та R^4 , приєднані до різних атомів вуглецю, в комбінації з атомами вуглецю, до яких вони приєднані, разом із будь-якими атомами, розташованими між ними, утворюють насичену 5-, 6- або 7-членну карбоциклічну групу;

R^5 та R^6 незалежно один від одного вибрані з групи, до якої входять Н, $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкіл, галоген- $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкіл та CN ;

n є ціле число від 0 до 6;

Ar^1 є ароматична група.

Особлива перевага віддається переліченим нижче сполукам:

роліпрам, апофілін (Amirall), Ariflo® (SmithKline Beecham), рофлуміласт (Byk Gulden), денбуфілін (SmithKline Beecham), RS-17597 (Syntex), SDZ-ISQ-844 (Novartis), 4-[2,3-біс(гідроксиметил)-6,7-діетоксинафтил]-1-(2-гідроксидетил)-гідропіридин-2-он (T-440; Tanabe Seiyaku), метил-3-[6-(2H-3,4,5,6-тетрагідропіран-2-ілокси)-2-(3-тієнілкарбоніл)бензо[b]фуран-3-іл]пропаноат (Bayer), 2-метил-1-[2-(метилетил)(8-гідропіразоло[1,5-a]піридин-3-іл)]пропан-1-он (ібуділаст; Kyorin), N-(3,5-дихлор(4-піридил))(3-циклопентилокси-4-метоксифеніл)карбоксамід (RP 73401; Rhône-Poulenc Rorer), (1E)-1-аза-2-(3-циклопентилокси-4-метоксифеніл)проп-1-еніламіноат (PDA-641; American Home Products), 4-ціан-4-(3-циклопентилокси-4-метоксифеніл)циклогексан-карбонова кислота (SB207499; SmithKline Beecham), ципамфілін (SmithKline Beecham), 5-[3-((2S)біцикло[2.2.1]гепт-2-ілокси)-4-метоксифеніл]-1,3-діазапергідрон-2-он (CP-80633; Pfizer), 1-(3-нітрофеніл)-3-(3-піридилметил)-1,3-дигідропіридино[2,3-d]пиримідин-2,4-діон (RS-25344; Syntex), 4-((1R)-1-феніл-2-(4-піридил)етил)-2-циклопентилокси-1-метоксифеніл (CDP-840; Celltech), (3-[[3-циклопентилокси-4-метоксифеніл]метил]аміно)піразол-4-іл)метан-1-

ол, Ro-20-1724 (Roche Holding AG), пікламіласт, доксофілін (Istituto Biologico Chemioterapico ABC SpA), RPR-132294 (Rhône-Poulenc Rorer), RPR-117658A (Rhône-Poulenc Rorer), L-787258 (Merck Frosst Canada), E-4021 (Eisai Co. Ltd.), GF-248 (Glaxo Wellcome), SKF-107806 (SmithKline Beecham), IPL-4088 (Inflazyme Pharmaceuticals Ltd.), 3-[(3-циклопентилокси-4-метоксибеніл)метил]-8-(метилетил)пурин-6-іл)етиламін (V-11294A; Napp Research Centre Ltd.), атізорам (Pfizer), 5-(3-циклопентилокси-4-метоксибеніл)піридин-2-карбоксамід (CP-353164; Pfizer), метил-3-[2,4-діоксо-3-бензил-1,3-дигідропіридино[2,3-d]піримідиніл]бензоат (CP-77059; Pfizer), CP-146523 (Pfizer), CP-293321 (Pfizer), CI-1044 (Pfizer), PD-189659 (Pfizer), CI-1018 (Pfizer), CP-220629 (Pfizer), 1-(3-нітрофеніл)-3-(4-піридилметил)-1,3-дигідропіридино[2,3-d]піримідин-2,4-діон (RS-25344-000; Roche Bioscience), мезопрам (Schering AG), N-(2,5-дихлор(3-піридил))(8-метокси(5-хіноліл))карбоксамід (D-4418; Chiroscience), T-2585 (Tanabe Seiyaku), 4-[4-метокси-3-(5-фенілпентилокси)феніл]-2-метилбензойна кислота, XT-044 (Hokuriku University), XT-611 (Kanzawa University), WAY-126120 (Wyeth-Ayerst Pharmaceuticals Inc.), 1-аза-10-(3-циклопентилокси-4-метоксибеніл)-7,8-диметил-3-оксапіро[4.5]дец-7-ен-2-он (WAY-12233 I; Wyeth-Ayerst Pharmaceuticals Inc.), [(3S)-3-(3-циклопентилокси-4-метоксибеніл)-2-метил-5-оксопіразолідиніл]-N-(3-піридилметил)карбоксамід (WAY-127093B; Wyeth-Ayerst Pharmaceuticals Inc.), PDB-093 (Wyeth-Ayerst Pharmaceuticals Inc.), 3-(1,3-діоксобензо[с]азолін-2-іл)-3-(3-циклопентилокси-4-метоксибеніл)-пропанамід (CDC-801; Celgene Corp.), CC-7085 (Celgene Corp.), CDC-998 (Celgene Corp.), NCS-613 (CNRS), CH-3697 (Chiroscience), CH-3442 (Chiroscience), CH-2874 (Chiroscience), CH-4139 (Chiroscience), RPR-114597 (Rhône-Poulenc Rorer), RPR-122818 (Rhône-Poulenc Rorer), (7aS,7R)-7-(3-циклопентилокси-4-метоксибеніл)-7а-метил-2,5,6,7,7а-пентагідро-2-азапіролізин-3-он, GW-3600 (Glaxo-Wellcome), KF-19514 (Kyowa Hakko Kogyo Co Ltd.), CH-422 (Celltech Group), CH-673 (CeUtech Group), CH-928 (Celltech Group), D-22888 (Asta Medica), AWD-12-232 (Asta Medica), YM-58997 (Yamanouchi), IC-485 (ICOS Corp.), KW-4490 (Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd.), YM-976 (Yamanouchi), Sch-351591 (Celltech Group), AWD-12-343 (Asta Medica), N-(3,5-дихлор(4-піридил))-2-{1-[(4-фторфеніл)метил]-5-гідроксііндолін-3-іл оксоацетамід (AWD-12-281; Asta Medica), ібуділаст (Kyorin Pharmaceutical Co. Ltd.), ціломіласт (SmithKline Beecham), BAY-19-8004 (Bayer), метил-3-[2-[(4-хлорфеніл)карбоніл]-6-гідроксибензо[б]фуран-3-іл]пропаноат, 5-метил-4-[4-метилтіофеніл]карбоніл-4-імідазолін-2-он, 5,6-діетоксибензо[б]тіофен-2-карбонова кислота (Tibenelast), та 4-(3-бромфеніл)-1-етил-7-метилгідропіридино[2,3-b]піридин-2-он (YM-58897; Yamanouchi).

За одним варіантом здійснення, винахід передбачає застосування інгібітора PDE, за варіантом, якому віддається перевага, інгібітора PDE4,

для ініціювання овуляції після росту та визрівання фолікулів, індукованого FSH. В межах обсягу винаходу знаходиться також застосування інгібітора PDE, за варіантом, якому віддається перевага, інгібітора PDE4, для ініціювання овуляції після росту та визрівання фолікулів, індукованого сполукою або препаратом, що діє як FSH. Замісником або підсилювачем ефективності лікування FSH, яким віддається особлива перевага, є інгібітор ароматази, наприклад, YM-511 (Yamanouchi), летрозол (Novartis), анастрозол (AstraZeneca) або фадрозол (Novartis). У схемі технології сприяння продуктивності (ART), якій віддається перевага, де бажано одержати множинні овоцити для запліднення *in vitro*, пацієнткам вводять інгібітор ароматази (наприклад, 2,5-5мг/добу або приблизно таку кількість летрозолу або анастрозолу) в період від 3-го до 7-го дня (або приблизно в такий період) або в період від 3-го до 8-го дня (або приблизно в такий період) менструального циклу в комбінації спільно з приблизно 50-225МО/добу, за варіантом, якому віддається перевага, 50-150МО/добу, FSH, починаючи в період від приблизно 3-го до приблизно 7-го дня менструального циклу, і продовжують застосування FSH до наявності щонайменше двох домінуючих фолікулів середнього діаметра приблизно 16мм або більше. В цей момент вводять інгібітор PDE, за варіантом, якому віддається перевага, інгібітор PDE4, в дозі, достатній для ініціювання овуляції.

За альтернативним варіантом, інгібітор ароматази можна застосовувати як єдиний засіб стимуляції росту фолікула (тобто у відсутності FSH) із використанням підвищеної дози інгібітора ароматази (наприклад, 2-10мг/добу летрозолу або анастрозолу) та/або подовження періоду застосування (наприклад, у дні 3-8, 3-9 або 3-10). При виявленні достатньої зрілості фолікула за даними ультразвукового дослідження вводять інгібітор PDE, за варіантом, якому віддається перевага, інгібітор PDE4, в дозі, достатній для ініціювання овуляції. Ця схема дозволяє відбирати множинні овоцити при уникненні ін'єкцій, оскільки всі застосовані засоби можна вживати перорально.

При індукуванні овуляції бажано забезпечити вивільнення лише однієї яйцеклітини. Ця мета, згідно з винаходом, досягається застосуванням FSH для стимуляції росту та визрівання фолікулів із подальшим введенням інгібітора PDE, за варіантом, якому віддається перевага, інгібітора PDE4, для ініціювання овуляції. В межах обсягу винаходу знаходяться також схеми індукування овуляції, де рост та визрівання фолікулів індукуються замісником FSH, наприклад, інгібітором ароматази.

За схемою індукування овуляції, якій віддається перевага, пацієнтці вводять дозу інгібітора ароматази (наприклад, 2,5-5мг/добу летрозолу або анастрозолу) в період приблизно від 3-го до приблизно 7-го дня або з приблизно 5-го до приблизно 9-го дня менструального циклу (у відсутності FSH). Альтернативним варіантом є введення однієї дози інгібітора ароматази (наприклад, 5-30мг летрозолу або анастрозолу, за варіантом, якому віддається перевага, 10мг або 20мг) на 3-й або 4-й день менструального циклу. Овуляцію ініціюють відповідною дозою інгібітора PDE, за варіантом,

якому віддається перевага, інгібітора PDE4. Така схема забезпечує методику індукування овуляції, що не вимагає ін'єкцій.

VI. Фармацевтичні композиції

Неполіпептидні модулятори рівні cAMP та за-
соби, що підвищують концентрацію FSH в організ-
мі самки (які зветься також "активними сполука-
ми"), за цим винаходом, а також їхні похідні,
фрагменти, аналоги та гомологи можна включати
в фармацевтичні композиції, придатні для засто-
сування. Такі композиції містять, як правило, акти-
вні сполуки та фармацевтично прийнятний носій. У
значенні, вживаному в цьому описі, термін "фар-
мацевтично прийнятний носій" охоплює будь-які
розчинники, дисперсійні середовища, покриття,
бактерицидні та фунгіцидні засоби, ізотонізуючі
засоби та засоби для затримання поглинання то-
що, сумісні з фармацевтичним застосуванням.
Придатні розчинники описані в останньому виданні
монографії "Фармацевтичні науки" (Remington's
Pharmaceutical Sciences), що є стандартним довід-
ником у галузі, який включено до цього опису шля-
хом посилання. Прикладами таких носіїв або роз-
ріджувачів, яким віддається перевага, є вода,
сольовий розчин, розчин Рінгера, розчин декстро-
зи та 5-процентний розчин сироваткового альбумі-
ну людини, але не тільки ці речовини. Можна ви-
користовувати ліпосоми, а також неводні носії,
наприклад, нелеткі олії. Застосування таких сере-
довищ та засобів для фармацевтично активних
речовин добре відомі в галузі. Мається на увазі їх
застосування в композиціях, за винятком випадків,
коли будь-яке звичайне середовище або засіб є
несумісними з активною сполукою. Композиції мо-
жуть містити також додаткові активні сполуки.

Фармацевтичні композиції за цим винаходом
виготовляють у формах, сумісних з обраним шля-
хом введення в організм. Прикладами шляхів вве-
дення є парентеральний (наприклад, внутрішньо-
венний, внутрішньошкірний, підшкірний),
пероральний, інгаляційний, черезшкірний (місце-
вий), черезоболонковий та ректальний. Розчини
або суспензії, застосовувані для парентерального,
внутрішньошкірного або підшкірного застосування,
можуть містити такі компоненти: стерильний роз-
ріджувач, наприклад, воду для ін'єкцій, сольовий
розчин, нелеткі олії, поліетиленгліколи, гліцерин,
пропіленгліколь або інші синтетичні розчинники;
протимікробні засоби, наприклад, бензиловий
спирт або метилпарабен; антиоксиданти, напри-
клад, аскорбінову кислоту або бісульфіт натрію;
комплексоутворювачі, наприклад, етилендіамінте-
траоцтову кислоту; буфери, наприклад, ацетати,
цитрати або фосфати, та засоби для встановлен-
ня тонічності, наприклад, хлорид натрію або дек-
строзу. Значення pH можна встановлювати за до-
помогою кислот або основ, наприклад,
хлористоводневої кислоти або гідроксиду натрію.
Парентеральні препарати можуть бути вміщені в
ампули, одноразові шприци або багатодозові фла-
кони, виготовлені зі скла або пластмаси.

До фармацевтичних композицій, придатних
для введення шляхом ін'єкцій, належать стерильні
водні розчини (якщо активні речовини є водороз-
чинними) або дисперсії та стерильні порошки для
негайного виготовлення стерильних розчинів або

дисперсій для ін'єкцій. До носіїв, придатних для
внутрішньовенного введення, належать фізіологі-
чний сольовий розчин, бактеріостатична вода,
Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) та сольо-
вий розчин із фосфатним буфером (PBS). У всіх
випадках композиція має бути стерильною та до-
сить текучою для легкого введення за допомогою
шприца. Вона має бути стабільною в умовах виго-
товлення та зберігання та захищеною від забруд-
нення мікроорганізмами, наприклад, бактеріями та
грибками. Носієм може бути розчинник або диспе-
рсійне середовище, що містить, наприклад, воду,
етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленглі-
коль та рідкі поліетиленгліколи тощо) та відповідні
суміші цих речовин. Відповідну текучість можна
забезпечити, наприклад, шляхом застосування
покриттів, наприклад, лецитину, забезпечення
необхідного розміру частинок у випадку дисперсії
та застосування поверхнево-активних речовин.
Запобігання впливу мікроорганізмів досягається
застосуванням різноманітних антибактеріальних
та протигрибкових засобів, наприклад, парабенів,
хлорбутанолу, фенолу, аскорбінової кислоти, ти-
меросалу тощо. В багатьох випадках доцільно
вводити в композиції ізотонізуючі засоби, напри-
клад, цукри, поліспирти, наприклад, маніт, сорбіт,
хлорид натрію. Пролонговане поглинання компо-
зицій для ін'єкцій можна забезпечити введенням в
композицію засобу, що сповільнює всмоктування,
наприклад, моностеарату алюмінію та желатину.

Стерильні розчини для ін'єкцій можна виготов-
ляти шляхом введення активної речовини в необ-
хідній кількості у відповідний розчинник, в разі не-
обхідності спільно з одним або кількома
інгредієнтами, переліченими вище, з подальшою
стерилізацією фільтруванням. Дисперсії, як пра-
вило, виготовляють шляхом введення активної
речовини у стерильний носій, який містить основне
дисперсійне середовище та інші необхідні інгреді-
єнти з числа речовин, перелічених вище. У випад-
ку стерильних порошоків для приготування стер-
ильних розчинів для ін'єкцій способами
виготовлення є вакуумне сушіння та сублімаційне
сушіння, при цьому порошок активного інгредієнта
з домішкою будь-якого бажаного додаткового ін-
гредієнта одержують із попередньо стерилізовано-
го фільтруванням розчину відповідних речовин.

Композиції для перорального застосування, як
правило, містять інертний розріджувач або їстів-
ний носій. Вони можуть бути вміщені в желатинові
капсули або спресовані в таблетки. Для перораль-
ного терапевтичного застосування активну сполу-
ку можна поєднати з наповнювачами та вживати у
формі таблеток, пастилок або капсул. Пероральні
композиції можна також виготовляти з використан-
ням рідкого носія для застосування у формі рідин
для полоскання рота, при цьому сполуку в рідкому
носії вводять у порожнину рота, ополіскують рот і
випльовують або ковтають композицію. Компози-
ція може містити фармацевтично сумісні в'язучі
засоби та/або допоміжні речовини. Таблетки, пі-
люлі, капсули, пастилки тощо можуть містити
будь-які нижчеказані інгредієнти або сполуки
аналогічного характеру: в'язучу речовину, напри-
клад, мікрокристалічну целюлозу, трагантову ка-
медь або желатин; наповнювач, наприклад, крох-

маль або лактозу, дезінтегратор, наприклад, альгінову кислоту, Примогель або кукурудзяний крохмаль; змашувальний засіб, наприклад, стеарат магнію або Стеротекс; ковзний засіб, наприклад, колоїдний діоксид кремнію: підсолоджувач, наприклад, сахарозу або сахарин; або смакоароматичну домішку, наприклад, м'ятну, апельсинову або метилсаліцилат.

Для введення способом інгаляції сполуки постанчаються у формі аерозольних спреїв із контейнерів або розподільювачів, що знаходяться під тиском, які містять відповідний пропелент, наприклад, газ, як-от, діоксид водню, або розпилювачів.

Системне застосування можна здійснювати також черезоболонковим або черезшкірним способами. Для черезоболонкового або черезшкірного введення в композиції використовують пенетранти, придатні для подолання відповідного бар'єру. Такі пенетранти, як правило, відомі в галузі. До них належать, наприклад, для черезоболонкового застосування - детергенти, солі жовчних кислот та похідні фузидової кислоти. Черезоболонкове введення можна здійснювати шляхом застосування назальних спреїв або супозиторіїв. Для черезшкірного введення активні компоненти вводять до складу мазей, бальзамів, гелів або кремів, загальновідомих у галузі.

Для неопіпептидних модуляторів рівня cAMP, в тому числі інгібіторів фосфодіестерази, а також клоніфену, селективних модуляторів рецепторів естрогенів, інгібіторів ароматази та інгібіторів стероїдогенних ферментів, шляхом застосування, якому віддається перевага, є пероральний. Ці активні сполуки можна вводити в організм також підшкірно шляхом ін'єкції, внутрішньовенно або вагінально (для локального застосування). Для FSH, LH або hCG способом введення, якому віддається перевага, є підшкірна ін'єкція, але можна застосовувати також внутрішньовенне введення.

Сполуки можна виготовляти у формі супозиторіїв (наприклад, зі звичайними основами супозиторіїв, наприклад, какаоовою олією та іншими гліцеридами) або затримуючих клізм для ректального або вагінального введення.

За одним варіантом здійснення винаходу, активні сполуки поєднують із носіями, які запобігають швидкому виведенню сполук з організму, наприклад, у формі композицій пролонгованої дії, в тому числі імплантатів та мікрокапсульованих терапевтичних систем. При цьому можна застосовувати біосумісні полімери, що піддаються біорозкладу, наприклад, етилен-вінілацетат, поліангідриди, полігліколеву кислоту, колаген, складні поліортоестери та полімолочну кислоту. Способи виготовлення таких композицій є очевидними для фахівців. Такі матеріали можна також одержати на комерційних засадах від фірм Alza Corporation та Nova Pharmaceuticals, Inc.

Сполуки за цим винаходом можна застосовувати окремо або в комбінації з одним або кількома іншими терапевтичними засобами, як вказано вище, у формі фармацевтичної композиції в суміші зі звичайним наповнювачем, тобто фармацевтично прийнятними органічними або неорганічними носіями, придатними для перорального, парентерального, ентерального або місцевого застосування,

які не впливають негативно на активні сполуки внаслідок реакцій з ними та не є шкідливими для пацієнта, що їх вживає. До придатних фармацевтично прийнятних носіїв належать вода, сольові розчини, спирт, рослинні олії, поліетиленгліколи, желатин, лактоза, амілоза, стеарат магнію, тальк, кремнієва кислота, в'язкий парафін, парфумерні олії, моно- та дигліцериди жирних кислот, складні ефіри мінеральних жирних кислот, гідроксиметилцелюлоза, полівінілпіролідон тощо, але не тільки ці речовини. Фармацевтичні композиції можна стерилізувати та, за бажанням, змішувати з допоміжними речовинами, наприклад, змашувальними засобами, консервантами, стабілізаторами, змочувачами, емульгаторами, солями для впливу на осмотичний тиск, буферами, барвниками, смакоароматичними речовинами та/або ароматизаторами тощо, які не впливають негативно на активні сполуки внаслідок реакцій з ними.

Особливо доцільним є виготовлення пероральних або парентеральних композицій у формі дозованих одиниць для спрощення застосування та додержання рівномірності дозування. Термін "дозована одиниця" у значенні, вживаному в цьому описі, означає фізично дискретну одиницю, придану як одинична доза для пацієнта, котрий підлягає лікуванню. Кожна одиниця містить заздалегідь визначену кількість активної сполуки, розраховану на досягнення бажаного терапевтичного ефекту, в поєднанні з необхідним фармацевтичним носієм. Технічні вимоги до форм дозованих одиниць за цим винаходом визначаються конкретними характеристиками активної сполуки та необхідного конкретного терапевтичного ефекту і прямо залежать від цих характеристик, а також від обмежень, притаманних галузі виготовлення композицій даної активної сполуки для лікування певних пацієнтів.

Мається на увазі, що конкретні кількості активних сполук, застосовуваних у даній терапії, яким віддається перевага, варіюють залежно від конкретної застосовуваної сполуки, конкретних композицій, способу введення в організм, конкретного місця введення тощо. Оптимальні характеристики застосування для даної методики легко визначити фахівцю шляхом проведення звичайних тестів для визначення дозування, які виконуються з урахуванням вищезазначених рекомендацій. Дивись також Remington's Pharmaceutical Sciences. Як правило, придатна ефективна доза однієї або кількох сполук за цим винаходом, особливо при використанні сполуки (сполук) підвищеної ефективності, лежить у межах від 0,01мг до 100мг на кілограм маси тіла пацієнта на добу, за варіантом, якому віддається перевага, від 0,01мг до 20мг на кілограм маси тіла пацієнта на добу, за варіантом, якому віддається більша перевага, від 0,05мг до 4мг на кілограм маси тіла пацієнта на добу. Бажану дозу вводять один раз на добу або у вигляді кількох часткових доз, наприклад, 2-4 часткових доз, які вводять через відповідні інтервали часу протягом доби або за іншою відповідною схемою. Такі часткові дози можна застосовувати у формі дозованих одиниць, кожна з яких містить, наприклад, від 0,05мг до 10мг сполуки (сполук) за цим винаходом.

Фармацевтичні композиції можна вмішувати в

контейнер, упаковку або розподільвач разом з інструкцією із застосування.

Винахід ілюстровано поданими нижче необхідними прикладами.

VII. Приклади

Розроблено модель овуляції *in vivo*, в якій FSH вводять незрілим пацюкам двічі на день протягом 2-3 днів для індукування визрівання фолікулів, після чого вводять одноразову овуляторну дозу hCG. Одноразова ін'єкція неополіпептидного модулятора рівня cAMP (наприклад, Сполуки 1, Сполуки 2 тощо), застосована в комбінації із субовуляторною дозою hCG або окремо, викликала індукування овуляції. Ці результати узгоджуються з моделлю, в якій підвищені рівні cAMP підвищують ефективність hCG або замінюють hCG, але не FSH. Роль FSH в будь-якій схемі індукування овуляції полягає в сприянні розвитку та визріванню фолікулів, але не в індукуванні овуляції.

Сполуки за Прикладами 1-9 ідентифіковано, як вказано нижче:

Сполука 1 - цис-4-ціано-4-(3-циклопентилокси)-4-метоксифеніл)-циклогексан-1-карбонова кислота;

Сполука 2 - 3-(циклопентилокси)-N-(3,5-дихлорпіридин-4-іл)-4-метоксибензамід;

Сполука 3 - 2-(4-(6,7-діетокси-2,3-біс(гідроксиметил)нафталін-1-іл)пірвдин-2-іл)4-(3-піридин)фталазин-1(2H)-он, гідрохлорид; і

Сполука 4 - 7-бензиламіно-6-хлор-2-піперазино-4-піролідиноптеридин.

Приклад 1. Вплив Сполуки 1 та Сполуки 2 на рівень cAMP в зернистих клітинах яєчників пацюків при застосуванні окремо або в комбінації з гонадотропінами *in vitro*.

У статевонезрілих пацюків лінії Sprague-Dawley у віці 25 днів після видалення гіпофіза та оброблення діетилstilbestролом видаляли яєчники. Яєчники кілька разів проколювали голками 27 калібру для вивільнення зернистих клітин із фолікулів. Клітини промивали та повторно суспендували в середовищі McCoys 5A з домішкою 0,1% BSA та 2мкМ андростендіону. Життєздатні клітини в кількості 100,000 висівали в 6-лункові культивувальні чашки в 1,0мл середовища (зі Сполукою 1 та Сполукою 2 в концентрації 25мкМ окремо або в комбінації з малою дозою гонадотропіну, 0,1пМ). Культури інкубували при 37°C при 100% вологості в атмосфері 5% CO₂ протягом 48год. Кондиціоновані середовища аналізували методом cAMP-специфічного радіоімунного аналізу (RIA). Результати виражені у формі середнього значення плюс/мінус стандартне відхилення. Як видно з Фіг.2, Сполуки 1 та 2 викликають значне підвищення рівня cAMP у присутності субефективних концентрацій гонадотропіну.

Приклад 2. Вплив інгібітора PDE - Сполуки 1 на визрівання фолікулів *in vivo*

Зрілі яєчникові фолікули, утворення яких у статевонезрілих самок пацюків було стимульоване дією субоптимальної дози FSH (1,08МО/ін'єкцію для кожної тварини; двічі на день протягом 3 днів) з одночасним застосуванням Сполуки 1 (0,1мг/кг; 1мг/кг, 10мг/кг та 50мг/кг за одну ін'єкцію, двічі на день протягом 3 днів) або без такого застосування. Разом з останньою ін'єкцією FSH вводили од-

норазову овуляторну дозу hCG (20МО). Інгібітори PDE застосовували в поєднанні із субоптимальними дозами FSH. Усі ін'єкції виконували підшкірно. Овуляцію визначали через 18год після введення hCG шляхом рахування овоцитів у фалопієвих трубах. Результати виражені у формі середнього значення плюс/мінус стандартне відхилення. Показані на Фіг.3 дані характеризують середню кількість овоцитів у трубах усіх пацюків кожної групи та кількість овулюючих пацюків. Як видно з Фіг.3, інгібітор PDE (Сполука 1) пригнічує (а не стимулює) овуляцію при введенні в дозі 50мг/кг. Ці результати свідчать, що підвищені дози інгібітора PDE не посилюють здатність субоптимальної дози FSH готувати фолікули до овуляції.

Приклад 3. Вплив інгібітора PDE - Сполуки 1 на овуляцію в присутності субефективної дози hCG *in vivo*

Овуляцію зрілих яєчникових фолікулів, утворення яких у статевонезрілих самок пацюків було стимульоване дією ефективної дози FSH (2,16МО/ін'єкцію для кожної тварини; двічі на день протягом 2 днів) індукували одноразовою ін'єкцією hCG. Останній вводили в субефективній дозі (3 МО) з одночасним введенням Сполуки 1 (50мг/кг, 10мг/кг та 1мг/кг) в момент останнього введення FSH або без такого введення. Овуляцію визначали через 18год після введення hCG шляхом рахування овоцитів у фалопієвих трубах. Як видно з Фіг.4, одноразова ін'єкція Сполуки 1, введена спільно з субовуляторною дозою hCG, спричиняла індукування овуляції. Усі ін'єкції виконували підшкірно. Результати виражені у формі середнього значення плюс/мінус стандартне відхилення. Ці дані свідчать, що неополіпептидний модулятор рівня cAMP, в даному разі інгібітор PDE, посилює стимульовану hCG овуляцію при застосуванні субоптимальної дози hCG. Таким чином, показано ефект Сполуки 1, яка є відомим інгібітором PDE.

Приклад 4. Вплив інгібітора PDE - Сполуки 1 на овуляцію в присутності та у відсутності субефективної дози hCG *in vivo*

Після індукованого FSH визрівання фолікулів (2,16МО/ін'єкцію для кожної тварини; двічі на день протягом 2 днів) вводили Сполуку 1 із застосуванням або без застосування субефективної дози hCG. Овуляцію визначали через 18 год після введення hCG/Сполуки 1 шляхом рахування овоцитів у фалопієвих трубах. Одержані дані характеризують середню кількість овоцитів у трубах усіх пацюків кожної групи та кількість овулюючих пацюків. Як видно з Фіг.5, одноразова ін'єкція Сполуки 1, виконана окремо, без субовуляторної дози hCG, спричинила індукування овуляції у пацюків, котрі попередньо одержували FSH. Результати виражені у формі середнього значення плюс/мінус стандартне відхилення. Ці дані свідчать, що неополіпептидний модулятор рівня cAMP, в даному разі інгібітор PDE - Сполука 1, здатний індукувати овуляцію у відсутності введеного hCG. Попередні експерименти, а також експеримент за цим Прикладом, показують, що фолікули, підготовлені такими дозами FSH, не овулюють спонтанно, а вимагають подальшого введення hCG.

Приклад 5. Вплив інгібітора PDE - Сполуки 2 на овуляцію в присутності та у відсутності субефе-

ктивної дози hCG in vivo

Після індукованого FSH визрівання фолікулів (2,16МО/ін'єкцію для кожної тварини; двічі на день протягом 2 днів) вводили Сполуку 2 із застосуванням або без застосування субефективної дози hCG. Овуляцію визначали через 18год після введення hCG/Сполуки 2 шляхом рахування овоцитів у фалопієвих трубах. Одержані дані характеризують середню кількість овоцитів у трубах усіх пацюків кожної групи та кількість овулюючих пацюків. Результати виражені у формі середнього значення плюс/мінус стандартне відхилення. Як видно з Фіг.6, одноразова ін'єкція Сполуки 2, виконана окремо, без субовуляторної дози hCG, спричинила індукування овуляції у пацюків, котрі попередньо одержували FSH. Ці дані свідчать, що неополіпептидний модулятор рівня cAMP, в даному разі інгібітор PDE - Сполука 2, здатний індукувати овуляцію у відсутності введеного hCG.

Приклад 6. Вплив інгібітора PDE - Сполуки 2 на овуляцію in vivo після перорального та підшкірного введення

Після індукованого FSH визрівання фолікулів (2,16МО/ін'єкцію для кожної тварини; двічі на день протягом 2 днів) вводили Сполуку 2 або підшкірно (subcutis), або перорально шляхом згодовування. Овуляцію визначали через 18 год після введення Сполуки 2 шляхом рахування овоцитів у фалопієвих трубах. Одержані дані характеризують середню кількість овоцитів у трубах усіх пацюків кожної групи та кількість овулюючих пацюків. Результати виражені у формі середнього значення плюс/мінус стандартне відхилення. Як видно з Фіг.7, підшкірне або пероральне введення Сполуки 2 спричинило індукування овуляції у пацюків, котрі попередньо одержували FSH. Ці дані свідчать, що неополіпептидний модулятор рівня cAMP, в даному разі інгібітор PDE - Сполука 2, здатний індукувати овуляцію при пероральному застосуванні.

Приклад 7. Вплив інгібітора PDE - Сполуки 3 на овуляцію in vivo після перорального та підшкірного введення

Після індукованого FSH визрівання фолікулів (2,16МО/ін'єкцію для кожної тварини; двічі на день протягом 2 днів) вводили Сполуку 3 або підшкірно (subcutis), або перорально шляхом згодовування. Овуляцію визначали через 18год після введення Сполуки 3 шляхом рахування овоцитів у фалопієвих трубах. Одержані дані характеризують середню кількість овоцитів у трубах усіх пацюків кожної групи та кількість овулюючих пацюків. Результати виражені у формі середнього значення плюс/мінус стандартне відхилення. Як видно з Фіг.8, підшкірне або пероральне введення Сполуки 3 спричинило індукування овуляції у пацюків, котрі попередньо одержували FSH. Ці дані свідчать, що неополіпептидний модулятор рівня cAMP, в даному разі інгібітор PDE - Сполука 2, здатний індукувати овуляцію при пероральному застосуванні.

Приклад 8. Вплив інгібітора PDE - Сполуки 4 на овуляцію в присутності та у відсутності субефективної дози hCG in vivo

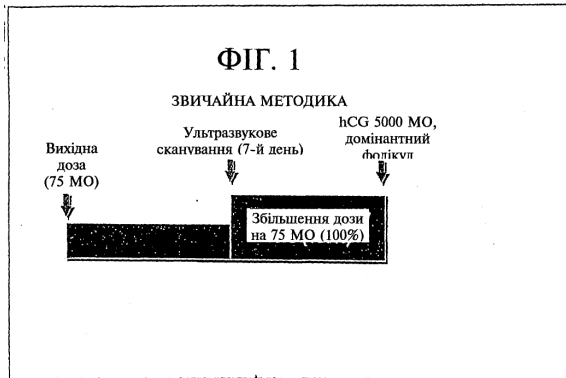
Після індукованого FSH визрівання фолікулів (2,16МО/ін'єкцію для кожної тварини; двічі на день протягом 2 днів) вводили підшкірно Сполуку 4 із

застосуванням або без застосування субефективної дози hCG. Овуляцію визначали через 18год після введення hCG/Сполуки 4 шляхом рахування овоцитів у фалопієвих трубах. Одержані дані характеризують середню кількість овоцитів у трубах усіх пацюків кожної групи та кількість овулюючих пацюків. Як видно з Фіг.9, одноразова ін'єкція Сполуки 4, виконана в комбінації із субовуляторною дозою hCG, спричинила індукування овуляції у пацюків, котрі попередньо одержували FSH. Сполука 4, введена окремо, не індукувала овуляції або індукувала її в дуже слабкому ступені. Результати виражені у формі середнього значення плюс/мінус стандартне відхилення. Ці дані свідчать, що неополіпептидний модулятор рівня cAMP, в даному разі інгібітор PDE - Сполука 4, сам по собі недостатній для індукування овуляції, здатний індукувати овуляцію у присутності субефективної дози hCG.

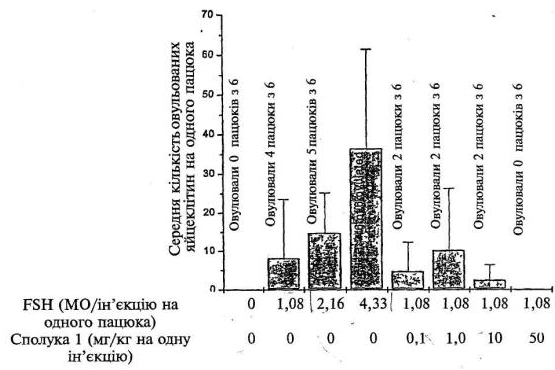
Приклад 9. Вплив інгібітора PDE - Сполуки 2 на овуляцію та фертильність. Визрівання фолікулів у статевонезрілих пацюків індукували FSH (4,33МО/ін'єкцію для кожної тварини; двічі на день протягом 2 днів) та сироватковим гонадотропіном вагітних кобил (PMSG) (1,5МО/ін'єкцію для кожної тварини; двічі на день протягом 2 днів). Попереднім дослідженням було виявлено, що ця комбінація індукує визрівання фолікулів та сприяє поведінці, характерній для готовності до парування, при низькому ступені спонтанної овуляції у відсутності додаткової ін'єкції hCG. Потім пацюки, індуковані FSH та PMSG, одержували Сполуку 2 (12 тварин) або носій (12 тварин) шляхом підшкірного введення. В одній підгрупі пацюків (6 тварин в кожній групі) визначали овуляцію через 18год після введення Сполуки 2 або носія рахування овоцитів у фалопієвих трубах. Для оцінки фертильності іншу підгрупу тварин (по 6 з кожної групи) залишали на ніч поодиноці в клітці з одним дорослим пацюком-самцем, фертильність якого була перевірена. Наступного дня самця видаляли, а самок вмішували в спільні клітки по групах до дня пологів. Реєстрували кількість живих доношених дитинчат, що спостерігалися при пологах. Як видно з Фіг.10, одноразова ін'єкція Сполуки 2 спричиняла індукування овуляції у пацюків, які попередньо одержували FSH та PMSG. Крім того, пацюки, які одержували Сполуку 2, мали більшу кількість живих дитинчат на момент пологів. Результати як для овуляції, так і для кількості дитинчат виражені у формі середнього значення плюс/мінус стандартне відхилення. Ці дані свідчать, що неополіпептидний модулятор рівня cAMP, в даному разі інгібітор PDE - Сполука 2, індукує овуляцію яйцеклітин, які здатні до запліднення in vivo.

Обсяг винаходу не обмежується конкретними варіантами здійснення, описаними в цьому документі. Дійсно, різноманітні модифікації винаходу, окрім описаних, є очевидними для фахівців із вищевизначеного опису та фігур, що додаються. Такі модифікації слід вважати такими, що охоплюються обсягом винаходу. Повний зміст усіх публікацій, патентів та опублікованих заявок на патенти, які цитуються в цій заявці, включено до неї шляхом посилання.

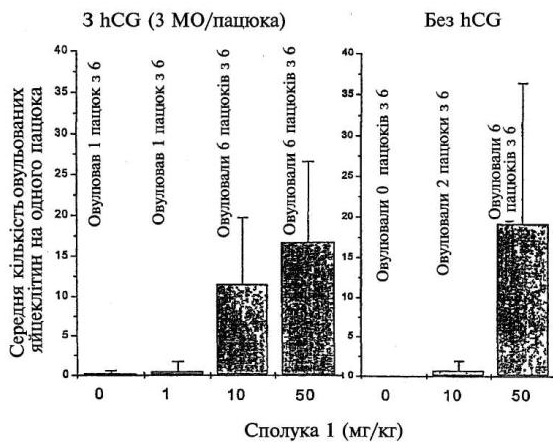
ФІГ. 2



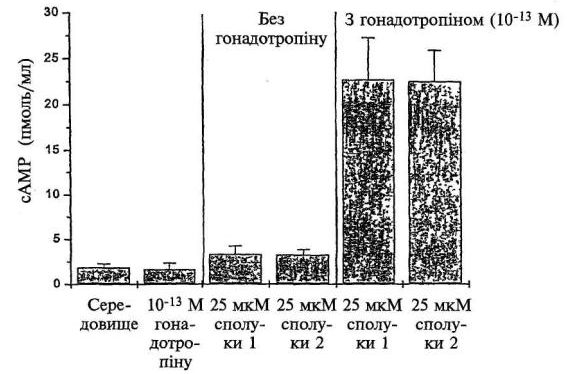
ФІГ. 3



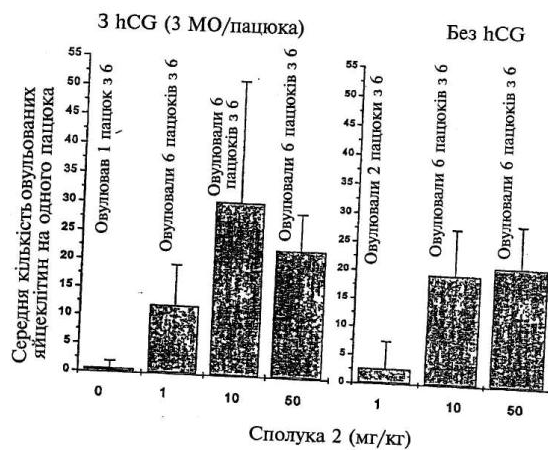
ФІГ. 5



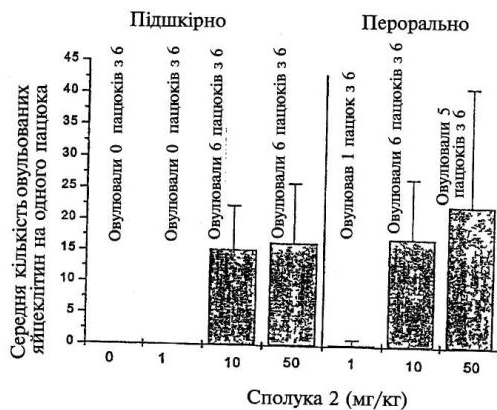
ФІГ. 4



ФІГ. 6



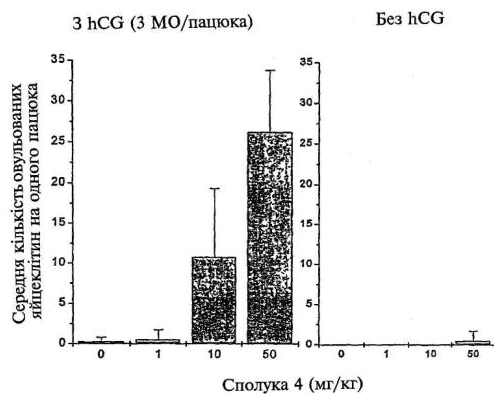
ФІГ. 7



ФІГ. 8



ФІГ. 9



ФІГ. 10

