

Цей винахід має відношення до галузі *in vivo* та *in vitro* допоміжних методик репродукції (ART), зокрема, регульованої гіперстимуляції яєчників (COH), із застосуванням гонадотропнів.

Кожного року численні безплідні пацієнти піддаються процедурам індукції овуляції. Біля двох десятків років тому до індукції овуляції вдавались виключено для лікування ановуляторного безпліддя; впровадження допоміжних методик репродукції (ART), однак, розширило застосування цих процедур на жінок із нормальним менструальним циклом із метою досягнення множинного фолікулогенезу.

Для допоміжних методик репродукції (ART), наприклад, *in vitro* запліднення (IVF) або IVF у поєднанні з інтрацитоплазматичним введенням сперми (IVF/ICSI) та трансплантації ембріонів (ET), ооцити відбирають у пацієнта-жінки безпосередньо перед овуляцією. Ооцити запліднюють *in vitro*, одержані ембріони піддають експертизі і відбирають для імплантування. Не кожен ооцит піддається заплідненню, і не кожен запліднений ооцит розвинеться до життєздатного ембріона. Крім того, імплантація може виявитись невдалою. З причини існування багатьох можливостей невдалого кінцевого результату та відносно інвазивної природи відбирання ооцитів, кількість зібраних ооцитів бажано довести до максимального рівня.

З цієї причини, ART, як правило, здійснюють із застосуванням регульованої гіперстимуляції яєчників (COH) для збільшення кількості ооцитів [1]. Стандартні режими [2] COH включають фазу регуляції за типом негативного зворотного зв'язку, впродовж якої ендогенний лютеїнізуючий гормон (LH) піддають регуляції за типом негативного зворотного зв'язку шляхом введення агоніста гонадотропін-вивільнюючого гормону (GnRH) з подальшою стимулювальною фазою, під час якої розвиток фолікулів (фолікулогенез) індукється щоденним введенням фолікулостимулювального гормону (FSH), як правило, у дозі приблизно 150-225МОд на добу. Застосовуватись можуть також інші молекули, які мають активність FSH. За альтернативним варіантом стимулювання розпочинають шляхом введення FSH після спонтанної або індукованої менструації, з подальшим введенням антагоніста GnRH (як правило, із започаткуванням приблизно на шостий день стимулювальної фази). У разі утворення щонайменше 3 фолікулів >16мм (одного 18мм), вводять одноразову ударну дозу hCG (людського хоріонічного гонадотропіну) (5-10000МОд) для імітації природного викиду LH та запуску механізму овуляції. Виділення ооцитів здійснюють через 36-38год після ін'єкції hCG.

Головною причиною застосування аналогів GnRH, наприклад, агоністів або антагоністів, у цьому контексті є запобігання несвоєчасного викиду LH, який може викликати передчасну овуляцію та лютеїнізацію фолікулів [3]. Послідовно встановлюють, що тривалі режими введення агоніста GnRH (тобто режими, які розпочинають у середині фази лютеїнізації циклу, з передуванням індукції овуляції або перед тим) пов'язуються із легшим включенням пацієнтів до графіка застосування відповідних препаратів, більшим виходом фолікулів та кращими загальними клінічними результатами [4]. Застосування антагоністів є відносно новим у клініці, сподіваються, однак, що це забезпечить одержання подібних благотворних результатів із перевагою, яка полягає у коротшому періоді введення відповідних препаратів.

Наслідком тривалого введення агоністів GnRH або антагоністів GnRH є глибоке пригнічення ендогенного LH впродовж усього циклу, у разі агоніста, або на пізній стадії стимулювальної фази, у разі антагоніста. Ця ситуація, хоча і є сумісною з розвитком фолікулів, не імітує природного циклу. У разі природного циклу, рівні LH повільно збільшуються впродовж декількох днів перед великим піком у середині циклу.

Багато груп досліджували значення LH впродовж стимулювальної фази COH та режимів індукції овуляції. Добре відомим і загальновизнаним у цій галузі є те, що методики або способи індукції овуляції (OI) відрізняються від способів COH, хоча обидва можуть залучати введення FSH.

Філікорі (Filicori) та інші досліджували роль низьких доз hCG як заміника LH у фолікулогенезі та індукції овуляції [5]. Введення hCG (50МОд hCG на добу) розпочинали одночасно із введенням FSH. Цей режим продовжували на щоденній основі доти, доки ударною дозою hCG не запускали механізм овуляції. Кількість невеликих (<10мм), середніх (10-14мм) та великих (>14мм) фолікулів була порівнянною між групою, що одержувала hCG, та контрольною групою, що одержувала лише FSH, однак сумарна доза FSH та тривалість стимуляції за допомогою FSH у групі, яку піддавали обробці hCG, були зменшені.

[WO 00/67778] (Applied Research Systems) пропонує застосовувати LH впродовж стимулювальної фази. Під час проведення одного із досліджень, на ранньому етапі стимулювальної фази пацієнтам вводили FSH та LH, після чого, на пізньому етапі стимулювальної фази, вводили разом FSH та LH або лише LH. Під час проведення іншого дослідження на ранньому етапі стимулювальної фази пацієнтам вводили лише FSH, після чого, на пізньому етапі стимулювальної фази, LH. Висунули припущення про те, що LH на пізньому етапі стимулювальної фази несе відповідальність за атрезію неосновних фолікулів. Застосування згаданого режиму пропонується для стимулювання розвитку одного основного фолікула.

European Recombinant Human LH Study Group повідомляє про введення rhLH (рекомбінантного людського лютеїнізуючого гормону) (75МОд/добу та 225МОд/добу) для підтримки rhFSH-індукованого розвитку фолікулів у жінок з гіпогеніталізмом, обумовленим гіпогонадотропним синдромом, для стимулювання секреції естрадіолу, посилення впливу FSH на ріст фолікулів та забезпечення успішної лютеїнізації фолікулів у разі їх піддання впливу hCG, порівняно із режимом введення лише FSH [6]. Введення LH розпочинали того самого дня, що і стимуляцію за допомогою FSH і продовжували до введення hCG із метою запуску механізму овуляції.

Саллівен (Sullivan) та інші повідомляють про те, що LH на пізньому етапі стимулювальної фази підтримує продукування фолікулярного естрадіолу у разі припинення введення FSH [7].

Сілліз (Sills) та інші повідомляють про проведення дослідження, під час якого пацієнти, що страждають на безпліддя різних типів, впродовж стимулювальної фази одержували FSH або FSH та 75МОд rhLH. Згадані автори доходять висновку, що додання екзогенного LH впродовж індукції овуляції не справляє відчутного впливу на характеристики циклу [8].

Бен-Амор (Ben-Amor) та інші [9] і Берлін (Werlin) та інші [10] досліджували ефект введення rhLH впродовж другої половини фолікулярної фази у пацієнтів із нормальним овуляторним циклом під час тривалого режиму регуляції за типом негативного зворотного зв'язку, а Уільямс (Williams) та інші [11] досліджували ефект введення різних доз rhLH впродовж усього періоду стимуляції за допомогою FSH. Значних клінічних благотворних результатів у групах цих пацієнтів не спостерігалось.

У режимах COH із застосуванням FSH, деякі пацієнти ("слабореагуючі") не реагували на початкові дози FSH. Цикл лікування можна було припиняти і новий цикл розпочинати з більш високої початкової дози FSH. Інші групи пацієнтів потребували повторних циклів, оскільки вони не вагітніли навіть у тому разі, коли виділення ооцитів було успішним. Виникнення потреби у повторних циклах може мати негативні фізичні та емоційні ефекти на пацієнта. Кожен повторний цикл тягне за собою значний розлад у житті безплідної пари.

Бажано було б мати спосіб, який забезпечував би можливість одержання однакової або поліпшеної фолікулярної реакції на COH із застосуванням зменшених доз FSH або скорочених періодів введення цього гормону. Бажано було б також мати діагностичний тест, за допомогою якого можна було б визначати, які пацієнти можуть мати слабку або субоптимальну реакцію та які пацієнти можуть реагувати на зменшену дозу FSH.

Метою цього винаходу є надання поліпшеного режиму COH.

Додатковою метою цього винаходу є надання способу одержання численних фолікулів для виділення численних ооцитів для ART.

Додатковою метою цього винаходу є надання способу визначення, які пацієнти можуть мати добру, слабку або субоптимальну реакцію на FSH під час COH.

За першим аспектом, цей винахід пропонує застосування лютеїнізуючого гормону (LH) або його аналога для виготовлення лікарського засобу для індукування множинного фолікулогенезу у пацієнта-людини, де згаданий лікарський засіб повинен вводиться від дня 1 до або приблизно до дня 4 стимулювальної фази COH.

З огляду на альтернативний варіант, цей винахід пропонує застосування лютеїнізуючого гормону (LH) або його аналога для виготовлення лікарського засобу для індукування множинного фолікулогенезу у пацієнта-людини, де згаданий лікарський засіб повинен вводиться впродовж періоду праймування, який триває від дня 1 до або приблизно до дня 4 стимулювальної фази COH.

За другим аспектом, цей винахід пропонує застосування лютеїнізуючого гормону (LH) або його аналога для індукування множинного фолікулогенезу у пацієнта-людини, де згаданий LH повинен вводиться від дня 1 до або приблизно до дня 4 стимулювальної фази COH.

З огляду на альтернативний варіант, цей винахід пропонує застосування лютеїнізуючого гормону (LH) або його аналога для індукування множинного фолікулогенезу у пацієнта-людини, де згаданий LH повинен вводиться впродовж періоду праймування, який триває від дня 1 до або приблизно до дня 4 стимулювальної фази COH.

За третім аспектом, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію, що містить LH або його аналог, у добовій дозі 20-400МОд LH, для введення від дня 1 до або приблизно до дня 4 стимулювальної фази COH.

За варіантом, якому віддається перевага, лікарський засіб або фармацевтична композиція (що містить LH або його аналог), повинні вводиться від дня 1 до дня 4, за варіантом, якому віддається перевага, від дня 1 до дня 3 або за варіантом, якому віддається найбільша перевага, із дня 1 до дня 2 стимулювальної фази. Можуть вводиться разові добові дози лікарського засобу або фармацевтичних композицій. За альтернативним варіантом, лікарський засіб або фармацевтична композиція можуть вводиться у вигляді разової дози у день 1 стимулювальної фази. За варіантом, якому віддається перевага, фармацевтичні композиції за цим винаходом призначені для застосування у способах та варіантах застосування за цим винаходом.

За четвертим аспектом, цей винахід пропонує набір для індукування фолікулогенезу у людини-пацієнта, де згаданий набір містить від однієї до п'яти добових доз (20-400МОд) LH або еквівалентну дозу його аналога, та приблизно шість або більше добових доз FSH або його аналога. Таким чином, згадані набори за цим винаходом можуть містити або включати одну, дві, три, чотири або п'ять добових доз LH або його аналога, та приблизно шість або більше добових доз FSH або його аналога. Опис відповідних добових доз LH та FSH наведено у цьому описі. Набори, яким віддається перевага можуть включати дві, три або чотири добові дози (приблизно 150МОд LH або 225МОд LH) та від восьми до дванадцяти добових доз (приблизно 150МОд) FSH. За варіантом, якому віддається перевага, згадані набори за цим винаходом призначені для застосування у способах та варіантах застосування за цим винаходом.

За п'ятим аспектом, цей винахід пропонує спосіб визначення реакції пацієнта на FSH при COH, де згаданий спосіб включає стадії:

- (A) визначення концентрації андрогена у згаданого пацієнта з одержанням вихідного значення  $A^1$ ;
- (B) введення згаданому пацієнту LH у дозі від приблизно 20МОд до приблизно 400МОд;
- (C) визначення концентрації андрогена у згаданого пацієнта щонайменше один раз після введення LH через приблизно 6 або більше годин, або, за варіантом, якому віддається перевага, через приблизно 12 або більше годин після введення LH, з одержанням значення  $A^2$ ;
- (D) віднесення згаданого пацієнта до групи пацієнтів зі слабкою, субоптимальною або хорошою реакцією на основі зміни рівнів андрогена.

За альтернативним варіантом, як буде докладніше описано нижче, на стадії (C) згаданого способу, рівні/концентрації андрогена можуть відслідковуватись/визначатись щонайменше один раз впродовж періоду часу після введення LH, і одне або декілька із цих визначень рівнів андрогена можуть здійснюватись впродовж перших шести годин після введення LH, наприклад, через 1 год, після чого подальші визначення можуть здійснюватись через один або декілька пізніших періодів часу, з одержанням значення  $A^2$ . Взагалі, визначення здійснюються впродовж 24 год періоду після введення LH. За шостим аспектом, цей винахід пропонує спосіб визначення реакції пацієнта на FSH при COH, де згаданий спосіб включає стадії:

- (A) визначення концентрації естрогену у згаданого пацієнта з одержанням вихідного значення  $E^1$ ;
- (B) введення згаданому пацієнту LH у дозі від приблизно 20МОд до приблизно 400МОд;
- (C) введення згаданому пацієнту FSH у дозі від приблизно 50МОд до приблизно 300МОд через приблизно 6 або більше годин, або, за варіантом, якому віддають перевагу, через приблизно 12 або більше годин, або за варіантом, якому віддають більшу перевагу, через приблизно 24 або більше годин після введення LH;

(D) визначення концентрації естрогену у згаданого пацієнта через приблизно 12 або більше годин після введення FSH, з одержанням значення  $E^2$ ;

(E) віднесення згаданого пацієнта до групи пацієнтів зі слабкою, субоптимальною або хорошою реакцією на основі зміни рівнів естрогену ( $E^2$ - $E^1$ ).

За альтернативним варіантом, як буде докладніше описано нижче, на стадії (D) згаданого способу, рівні/концентрації естрогену можуть відслідковуватись/визначатись щонайменше один раз впродовж періоду часу після введення FSH, і одне або декілька із цих визначень рівнів естрогену можуть здійснюватись впродовж перших 12 год після введення FSH, наприклад, через 6 год, після чого подальші визначення можуть здійснюватись через один або декілька пізніших періодів часу, з одержанням значення  $E^2$ .

В усіх вищеописаних способах визначення, вимірювання рівнів естрогену та андрогена, за варіантом, якому віддається перевага, здійснюється *in vitro* на зразку, який одержують від відповідного пацієнта.

Додатковий аспект цього винаходу пропонує LH або його аналог для індукування множинного фолікулогенезу у пацієнта-людини, де LH або його аналог повинен вводитись від дня 1 до або приблизно до дня 4 стимульовальної стадії СОН.

Додатковий аспект цього винаходу пропонує LH або його аналог для індукування множинного фолікулогенезу у пацієнта-людини, де LH або його аналог повинен вводитись впродовж періоду праймування, який триває від дня 1 до або приблизно до дня 4 стимульовальної фази СОН.

За ще одним додатковим аспектом, цей винахід пропонує спосіб індукування множинного фолікулогенезу у пацієнта, де згаданий спосіб включає введення LH або його аналога згаданому пацієнту, де згадане введення здійснюють від дня 1 до або приблизно до дня 4 стимульовальної фази СОН.

За додатковим аспектом, цей винахід пропонує спосіб індукування множинного фолікулогенезу у пацієнта, де згаданий спосіб включає введення LH або його аналога згаданому пацієнту, де згадане введення здійснюють впродовж періоду праймування, який триває від дня 1 до або приблизно до дня 4 стимульовальної фази СОН.

Цей винахід має відношення до введення LH (або його аналога) для індукування множинного фолікулогенезу або поліпшення режимів СОН іншим шляхом у пацієнта-людини, з точки зору, наприклад, збільшення кількості одержаних ембріонів, які демонструють раннє роздроблення і, завдяки цьому, мають більший шанс імплантування та вагітності, збільшення кількості фолікулів розміром понад 15мм у день запуску механізму овуляції, підвищення відношення між фолікулами великого розміру та фолікулами невеликого розміру у день запуску механізму овуляції та збільшення кількості ооцитів. Таким чином, цей винахід може також розглядатись як такий, що пропонує поліпшені режими СОН, наслідком чого є збільшення або поліпшення показників імплантації та/або частоти настання вагітності у пацієнта-людини, наприклад, порівняно з пацієнтом або групою пацієнтів, яких піддають традиційним режимам СОН.

Було встановлено, що наслідком здійснення схеми порівняно нетривалого введення LH, яке розпочинали на початку стимульовальної фази, з подальшим введенням FSH при здійсненні СОН, є стимулювання множинного фолікулогенезу і, взагалі, поліпшення режиму СОН з точки зору, наприклад, збільшення кількості одержаних ембріонів, які демонструють раннє роздроблення і, завдяки цьому, мають більший шанс імплантування та вагітності, збільшення кількості фолікулів розміром понад 15мм у день запуску механізму овуляції, підвищення відношення між фолікулами великого розміру та фолікулами невеликого розміру у день запуску механізму овуляції та збільшення кількості ооцитів. Більше того, можна зменшити дозу FSH, яка є необхідною для забезпечення розвитку численних фолікулів у пацієнта. Ця методика одержала назву "LH праймування".

Період, впродовж якого вводять LH, називається періодом праймування. У цілях цього опису, започаткування періоду праймування означає започаткування стимульовальної фази.

Гадають, що LH взаємодіє із рецепторами на клітинах оболонки фолікула, що розвивається, зі стимулювання продукування андрогенів. Синтез естрогенів потребує доступності андрогенів, як субстратів ароматази.

Гадають, що підвищена місцева концентрація андрогенів, індукованих LH, стимулює дію FSH на фолікул, що зростає.

У разі застосування або введення LH за аспектами цього винаходу, опис якого наведено, доза може бути у діапазоні від або приблизно від 20МОд до або приблизно до 400МОд, за варіантом, якому віддається перевага, від або приблизно від 50МОд до або приблизно до 300МОд чи від або приблизно від 75МОд до або приблизно до 225МОд, за варіантом, якому віддається більша перевага, від або приблизно від 100МОд до або приблизно до 200МОд чи від або приблизно від 75МОд до або приблизно до 150МОд LH, за варіантом, якому віддається найбільша перевага, від або приблизно від 150МОд. За альтернативним варіантом, дози можуть бути від або приблизно від 150МОд до або приблизно до 300МОд LH, за варіантом, якому віддається перевага, від або приблизно від 225МОд LH. За варіантом, якому віддається перевага, ці дози є добовими дозами. У разі застосування аналога LH, може обчислюватись і вводитись еквівалент цих доз LH.

У разі застосування або введення FSH за аспектами цього винаходу, опис якого наведено, доза може бути у діапазоні від або приблизно від 50МОд до або приблизно до 300МОд, за варіантом, якому віддається перевага, від або приблизно від 100МОд до або приблизно до 250МОд, за варіантом, якому віддається найбільша перевага, від або приблизно від 150МОд. За альтернативним варіантом, дози FSH можуть дорівнювати або приблизно дорівнювати 75-600МОд, 75-450МОд, за варіантом, якому віддається перевага, дорівнювати або приблизно дорівнювати 150-375МОд, за варіантом, якому віддається більша перевага, дорівнювати або приблизно дорівнювати 300МОд. За варіантом, якому віддається перевага, ці дози є добовими дозами. У разі застосування аналога FSH, може обчислюватись і вводитись еквівалент цих доз LH.

За методикою, якій віддається перевага, пацієнту вводять агоніст GnRH у дозі, достатній для забезпечення пригнічення функції яєчника. Відповідні способи досягнення такого пригнічення є добре відомими та задокументованими у цій галузі, і застосовуватись може будь-який з цих способів, наприклад, може застосовуватись одноразова ін'єкція (3,75мг) триптореліну (Triptorelin), речовини уповільненого

всмоктування, або добові дози бузереліну (Buserelin) чи лейпроліду ацетату. Пригнічення функції яєчника може відслідковуватись шляхом контролювання рівнів LH або естрадіолу (рівні  $LH < 5 \text{ МОд/л}$ ,  $E_2 < 50 \text{ пг/мл}$ , як правило, вказують на латентність). Стимулювальна фаза може започатковуватись добовими ін'єкціями LH (наприклад, у дозах, опис яких було наведено вище, наприклад, приблизно 20-400МОд та, за варіантом, якому віддається перевага, 150МОд або 225МОд). Приблизно через 3-4 дні, наприклад, через 2,5 дні, 3 дні, 3,5 дні, 4 дні або 4,5 дні, введення LH припиняють і вводять FSH (наприклад, у дозах, опис яких було наведено вище, як правило, приблизно, 50-300МОд на добу). Введення FSH продовжують, як правило, доти, доки під час ультразвукографічного обстеження не буде виявлено щонайменше 3 фолікули  $> 16 \text{ мм}$  (один із них 17мм або 18мм чи більше). Механізм овуляції запускають ударною дозою hCG (5000-10000МОд). За альтернативною методикою, якій віддається перевага, введення FSH та LH може взаємно перекриватись на один день, тобто FSH може вводиться у останній день введення LH.

Разове введення LH або його аналога може виявитись достатнім і введення FSH може розпочинатись одночасно або, за варіантом, якому віддається перевага, наступного дня. У разі введення разової дози LH, вона, за варіантом, якому віддається перевага, повинна дорівнювати приблизно 20-400МОд LH. За альтернативним варіантом LH може вводиться впродовж у загальній кількості чотирьох днів, наприклад, LH (або аналог) може вводиться від дня 1 до або приблизно до дня 4, або від дня 1 до або приблизно до дня 3, або від дня 1 до або приблизно до дня 2. У таких випадках, за варіантом, якому віддається перевага, LH вводять на добовій або півдобовій основі, наприклад, у дозах, опис яких було наведено вище. Введення FSH може розпочинатись одночасно із введенням LH або може перекривати його на три, два або один день, але, за варіантом, якому віддається перевага, починається після того, як припинилось введення LH або лише з одним днем перекриття. Іншими словами, за варіантами, яким віддається перевага, LH вводять за відсутності введення екзогенного FSH під час періоду праймування. Опис доз FSH та LH, яким віддається перевага у цьому відношенні, знову-таки наведено вище.

Добові дози не повинні бути однаковими. Наприклад, за режимом, якому віддається перевага, у день 1 може вводиться доза 150-300МОд, за варіантом, якому віддається перевага, 225МОд LH, у день 2 може вводиться доза 75-225МОд, за варіантом, якому віддається перевага, 150МОд LH, у день 3 та день 4 можуть вводиться дози 75-225МОд, за варіантом, якому віддається перевага, 75-150МОд LH. За альтернативним варіантом, добові дози можуть бути однаковими та, за альтернативним режимом, якому віддається перевага, можуть вводиться добові дози 225МОд LH.

Шляхи для введення гонадотропіну, яким віддається перевага, є добре відомими та задокументованими у цій галузі. Ними є підшкірна, внутрішньом'язова або внутрішньовенна ін'єкції. Аналоги можуть вводиться шляхом підшкірної, внутрішньом'язової або внутрішньовенної ін'єкції або пероральним, черезшкірним, ректальним або інтраназальним шляхом, прийнятним для відповідного аналога.

Режим праймування (початку введення) LH у варіанті, якому віддається перевага, може застосовуватись також у поєднанні з обробкою антагоністом GnRH, аніж з обробкою агоністом GnRH. Стимулювальна фаза розпочинається введенням LH (як описано вище) на пізній фазі утворення жовтого тіла попереднього циклу (за варіантом, якому віддається перевага, у дні 23-26 або приблизно за три дні до передбачуваного початку менструації). Після цього вводять FSH, як описано вище, із започаткуванням у день 1-3 менструації (без попереднього введення агоніста GnRH). Після чого, приблизно у день 6 стимулювання FSH, вводять антагоніст GnRH, наприклад, антид (Antide), азалін Б (Azaline B), цетрорелікс (Cetrorelix), ганірелікс (Ganirelix) або антарелікс (Antarelix). Механізм овуляції запускають ударною дозою hCG. Антагоніст, як правило, вводять до дня введення hCG. За варіантом, якому віддають перевагу, введення LH та FSH суттєво не перекривається, наприклад, за варіантом, якому віддається перевага, це перекриття не перевищує трьох днів, за варіантом, якому віддається більша перевага, це перекриття не перевищує двох днів і за варіантом, якому віддається найбільша перевага, це перекриття не перевищує одного дня. За варіантом, якому віддається більша перевага, введення FSH розпочинається після припинення введення LH, тобто перекриття відсутнє.

З метою кращого прогнозування початку менструації, перед започаткуванням режиму праймування LH, бажаним може бути введення пацієнту впродовж приблизно одного місяця протизачаткових таблеток. Через два-три дні після припинення введення протизачаткового засобу, як правило, розпочинається менструація. У разі застосування протизачаткових таблеток, праймування LH може розпочинатись у день припинення введення протизачаткового засобу.

Для моніторингу розвитку фолікулів впродовж стимулювальної фази може застосовуватись ультразвукографія.

Застосування LH на ранній стадії стимулювальної фази режиму СОН може надати можливість зменшення загальної дози FSH, яка застосовується, порівняно із режимом СОН без LH. Наприклад, звичайна доза FSH, яка застосовується без попереднього введення LH, становить 100-250МОд на добу, як правило, приблизно 150МОд на добу. Без праймування LH, якщо гадають, що реакція фолікулів є достатньою, доза FSH може зменшуватись до, наприклад, дози менше за 150МОд на добу або менше за 100МОд на добу, наприклад, до дози 50-140МОд на добу або 50-90МОд на добу. За альтернативним варіантом може застосовуватись така сама або менша добова доза, і механізм овуляції запускатись раніше, аніж у варіанті без праймування LH, що означає, що сумарна доза FSH є меншою.

Опис цього винаходу здійснюється відносно лютеїнізуючого гормону (LH), однак, фахівцю у цій галузі буде ясно, що застосовуватись можуть також сполуки, що мають активність LH, тобто аналоги LH, які мають такі самі фізіологічні, біохімічні або біологічні ефекти, що і LH. Наприклад, добре відомо, що хоріонічний гонадотропін (CG) може служити заміною LH. Як загальне правило, за результатами фармакологічного біоаналізу Ван Хелла (Van Hell) [12], 1МОд hCG є еквівалентною 5-7МОд LH і, таким чином, фахівець у цій галузі може обчислювати еквівалентні дози hCG.

Інші приклади аналогів LH розкриваються, наприклад, у [європейському патенті № EP 0322226 (Applied Research Systems), WO 99/25849, WO 90/06844, WO 93/06844 та WO 96/05224 (усі на ім'я Вашингтонського університету) та WO 00/61586 (Akzo Nobel)].

Цей винахід обговорюється у контексті FSH, як головного фолікулостимулювального агента. Фахівцю у цій галузі техніки зрозуміло, що FSH може замінюватись біологічно активним аналогом або сполукою, що

стимулює секрецію ендogenous FSH. До останнього згаданого класу належать інгібітори ароматази та антиестрогени, наприклад, тамоксифен та кломіфену цитрат (CC). Ці сполуки стимулюють секрецію ендogenous FSH шляхом видалення негативного зворотного зв'язку, який справляється естрогеном на гіпоталамус (або антагонізуюванням рецепторів естрогену, як у разі CC та тамоксифену, або значним зниженням концентрації естрогену, як у разі з інгібіторами ароматази). FSH може також застосовуватись у поєднанні з цими агентами впродовж стимулювальної фази.

Форма FSH, якій віддається особлива перевага для застосування у поєднанні із застосуванням LH за цим винаходом, є відомою як FSH-CTP. Опис цього людського FSH тривалої дії наведено у [WO 93/06844]. Він має  $\alpha$ -субодиницю FSH дикого типу і  $\beta$ -субодиницю, яка являє собою  $\beta$ -субодиницю FSH дикого типу, злику на карбоксильному кінці з карбоксикінцевим пептидом (CTP)  $\beta$ -субодиниці hCG (залишки 112-118 до положення 145 послідовності нативного hCG). Аналогами FSH інших типів є, наприклад, одноланцюгові аналоги FSH,  $\beta$ -субодиниця яких є зликою із CTP hCG, який, у свою чергу, є злитим із  $\alpha$ -субодиницею FSH, як описано у [WO 96/05224] (одноланцюговий FSH-CTP). FSH може також застосовуватись у поєднанні із цими агентами впродовж стимулювальної фази.

Введення LH, за варіантом, якому віддається перевага, розпочинається у день 1 стимулювальної фази і триває не довше дня 4. У разі, якщо пацієнт, як гадають, реагує добре, у дні 1 та 2 достатніми можуть виявитись добові дози, що становлять приблизно 20-400МОд LH. У разі, якщо реакція пацієнта, як гадають, є слабкою або субоптимальною, введення добових доз у межах 20-400МОд LH може бути продовженим і припиненим у день 3 або день 4. Визначення того, чи є реакція пацієнта доброю, субоптимальною або слабкою, може базуватись на результатах попередніх циклів ART або на результатах діагностичного тесту, як описується нижче.

Як згадувалось раніше, hCG викликає багато із тих самих біологічних ефектів, що і LH. HCG має значно довший період напіввиведення, ніж LH, завдяки чому у разі застосування hCG замість LH, у день 1 достатнім може виявитись одноразове введення hCG (приблизно 3-100МОд hCG).

Як згадувалось вище, цей винахід, за додатковим аспектом, пропонує спосіб визначення реакції пацієнта на FSH при COH. Це надає можливість пристосування режиму COH до пацієнта, запобігання надмірних доз FSH у пацієнтів із доброю реакцією та підвищення шансів на успіх у пацієнтів із субоптимальною або слабкою реакцією. За цим способом разове введення, наприклад, ін'єкція LH (наприклад, у дозах, опис яких було наведено вище, наприклад, приблизно 50-300МОд, за варіантом, якому віддають перевагу, 100-200МОд, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, приблизно 150МОд) на початку стимулювальної фази режиму COH, застосовується як "стимул" з метою стимулювання синтезу андрогена клітинами оболонки. Ін'єкція LH здійснюється у день 1 стимулювальної фази. Після цього сироваткові рівні андрогена визначають щонайменше один раз, щонайменше через або приблизно через 6год після введення LH, за варіантом, якому віддають перевагу, через або приблизно через 12год після введення LH. До того як минуть 6год, реакція на стимулювальне введення LH не буде значною. За варіантом, якому віддають більшу перевагу, рівні андрогена контролюють впродовж певного періоду часу, наприклад, через 0год, 1год, 6год, 12год та 24год після ін'єкції LH, що дає картину підвищення концентрацій андрогена у відповідь на ін'єкцію LH. Рівні андрогена після стимулювального введення LH порівнюють із рівнями перед стимулювальним введенням. Наприклад, якщо рівень андрогена перед ін'єкцією LH дорівнює  $A^1$ , а рівень андрогена після ін'єкції дорівнює  $A^2$ , обчислюють різницю,  $\Delta A$ , між цими двома значеннями (тобто  $\Delta A = A^2 - A^1$ ). Значення  $\Delta A$  являє собою загальний параметр, що зображує зміну сироваткових рівнів андрогена. Він не обмежується простою обчисленою різницею двох значень, але може бути також складовим результатом ряду часових точок.

Якщо здійснюють разове визначення рівнів андрогена, його не слід робити раніше, ніж минуть 6год, оскільки рівні андрогена не будуть мати часу для реагування на стимулювальне введення LH. Якщо здійснюють разове визначення, його, за варіантом, якому віддають перевагу, слід робити через 12год, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, впродовж періоду часу від або приблизно від 18год до або приблизно до 24год.

Згаданий спосіб стимулювання LH застосовується, за варіантом, якому віддається перевага, на пацієнтах, яких піддають режиму гіпофізарної регуляції за типом негативного зворотного зв'язку, що залучає обробку впродовж щонайменше приблизно 3 днів, за варіантом, якому віддають перевагу, впродовж приблизно 7 днів, за допомогою агоніста GnRH перед введенням LH.

Пацієнти, що демонструють хорошу реакцію на андроген, можуть продовжувати здійснення режиму COH із застосуванням лише FSH. Пацієнти, що демонструють слабу або субоптимальну реакцію, можуть одержувати ін'єкції LH (наприклад, у дозах, опис яких наведено вище, наприклад, 50-300МОд, за варіантом, якому віддають перевагу, 75-225МОд, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, приблизно 150МОд на добу), впродовж приблизно трьох додаткових днів, наприклад, пацієнти можуть одержувати додаткові ін'єкції впродовж 1, 2 або 3 днів, наприклад, до появи хорошої реакції на андроген. Після цього щоденно вводять FSH у дозі приблизно 75-600МОд на добу або 75-450МОд на добу, за варіантом, якому віддають перевагу, приблизно 150-375МОд на добу, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, приблизно 300МОд на добу.

Згаданими андрогенами, рівні яких, за варіантом, якому віддають перевагу, контролюють, є андростендіон та тестостерон, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, андростендіон. На додаток до цього, можуть визначатись рівні їх попередників, наприклад, 17- $\alpha$ -гідроксипрогестерону (17 $\alpha$ ОНР).

До пацієнтів з хорошою реакцією належать ті пацієнти, які демонструють підвищення сироваткової концентрації андростендіону ( $\Delta A$ ) через 24год на рівні або приблизно на рівні 2нмоль/л або більше. У пацієнтів зі слабкою або субоптимальною реакцією спостерігається підвищення менше за або таке, що дорівнює приблизно 2нмоль/л. У разі визначення концентрацій тестостерону, пацієнт з хорошою реакцією продемонструє підвищення сироваткових рівнів тестостерону через 24год на рівні або приблизно на рівні 0,25-0,75нмоль/л або більше, у той час як пацієнти зі слабкою або субоптимальною реакцією продемонструють підвищення менше за 0,25нмоль/л.

Пацієнти, які демонструють хорошу, слабу або субоптимальну реакцію на андроген, відповідно,

вказують, у свою чергу, на пацієнтів, які визначаються як такі, що, ймовірно, будуть демонструвати хорошу, слабу або субоптимальну реакцію, відповідно, на FSH при СОН. Так, наприклад, пацієнт, який демонструє хорошу реакцію на андроген, вказує на пацієнта, який визначається як такий, що, ймовірно, буде демонструвати хорошу реакцію на FSH при СОН за способами за цим винаходом, опис яких наведено.

Для підвищення чутливості згаданого способу, фонові рівні андрогена можуть суттєвою мірою ліквідуватись шляхом введення згаданому пацієнту інгібітора секреції андрогена наднирковою залозою, наприклад, дексаметазону, перед стимулювальним введенням LH.

За варіантом вищезгаданого стимулювального введення LH, замість рівнів андрогена контролюватись можуть сироваткові рівні естрогену. LH стимулює продукування андрогенів клітинами оболонки, після чого андрогени перетворюються на естрогени за допомогою ароматази.

Оскільки перетворення андрогенів на естрогени стимулюється FSH, за додатковим варіантом способу стимулювання LH, після стимулювального введення LH може здійснюватись ін'єкція FSH із подальшим визначенням рівнів естрогену. І знову ж таки, у день 1 стимулювальної стадії режиму СОН здійснюється разова ін'єкція LH (наприклад, у дозах, опис яких наведено вище, наприклад, приблизно 50-300МОд, за варіантом, якому віддають перевагу, 75-225МОд, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, приблизно 150МОд на добу) як "стимул" із метою стимулювання синтезу андрогенів клітинами оболонки. Після ін'єкції LH здійснюють ін'єкцію FSH (приблизно 50-300МОд, за варіантом, якому віддають перевагу, приблизно 150МОд). Ін'єкцію FSH здійснюють не раніше ніж через або приблизно через 6год, за варіантом, якому віддають перевагу, через або приблизно через 12год, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, через або приблизно через 24год після стимулювального введення LH. FSH стимулює продукування ароматази, завдяки чому підвищена кількість андрогена, яка є наслідком стимулювання LH клітин оболонки, буде перетворена ароматазою на естрогени. Після цього сироваткові рівні естрогенів визначають щонайменше один раз, за варіантом, якому віддають перевагу, через або приблизно через 12год після введення FSH. Дванадцятигодинний інтервал дає можливість відбутись позитивній регуляції ароматази у відповідь на FSH. За варіантом, якому віддають більшу перевагу, рівні естрогену контролюють впродовж певного періоду часу, наприклад, через 0год, 6год, 12год та 24год після ін'єкції FSH. Рівні естрогену після стимулювального введення LH порівнюють із рівнями перед стимулювальним введенням. Наприклад, якщо рівень естрогену перед ін'єкцією LH дорівнює  $E^1$ , а рівень естрогену після ін'єкції дорівнює  $E^2$ , обчислюють різницю,  $\Delta E$ , між цими двома значеннями (тобто  $\Delta E = E^2 - E^1$ ). Значення  $\Delta E$  являє собою загальний параметр, що зображує зміну сироваткових рівнів естрогену. Він не обмежується простою обчисленою різницею двох значень, але може бути також складовим результатом ряду часових точок.

Якщо здійснюють разове визначення рівнів естрогену, його не слід робити раніше приблизно 12год після стимулювальної ін'єкції FSH, оскільки рівні естрогену не будуть мати часу для реагування на стимулювальне введення LH/FSH. Якщо здійснюють разове визначення, його за варіантом, якому віддають перевагу, слід робити через 18год, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, через або приблизно через 24год.

Згаданий спосіб стимулювання LH+FSH застосовується за варіантом, якому віддається перевага, на пацієнтах, яких піддають режиму гіпофізарної регуляції за типом негативного зворотного зв'язку, що залучає обробку впродовж щонайменше приблизно 3 днів, за варіантом, якому віддають перевагу, впродовж приблизно 7 днів, за допомогою агоніста GnRH перед введенням LH.

Пацієнти, що демонструють хорошу реакцію на естроген, можуть продовжувати здійснення режиму СОН із застосуванням лише FSH (приблизно 100-225МОд FSH на добу, за варіантом, якому віддається перевага, приблизно 150МОд FSH на добу). Пацієнти, що демонструють слабу або субоптимальну реакцію, можуть продовжувати одержувати ін'єкції LH (наприклад, у дозах, опис яких наведено вище, наприклад, 50-300МОд, за варіантом, якому віддають перевагу, 75-225МОд, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, приблизно 150МОд на добу), впродовж приблизно трьох додаткових днів, наприклад, пацієнти можуть одержувати додаткові ін'єкції впродовж 1, 2 або 3 днів, наприклад, до появи хорошої реакції на естроген, після чого розпочинають введення FSH (наприклад, у дозах, опис яких наведено вище, наприклад, приблизно 75-450МОд FSH на добу, за варіантом, якому віддають перевагу, приблизно 150-375МОд на добу, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, приблизно 300МОд на добу).

Згаданим естрогеном, який, за варіантом, якому віддають перевагу, контролюється, є естрадіол ( $E_2$ ).

До пацієнтів із хорошою реакцією належать ті пацієнти, які демонструють підвищення сироваткової концентрації естрадіолу через 24год на рівні або приблизно на рівні 50пмоль/л або більше. У пацієнтів зі слабою або субоптимальною реакцією спостерігається підвищення менше за вказане.

Пацієнти, які демонструють хорошу, слабу або субоптимальну реакцію на естроген, відповідно, вказують, у свою чергу, на пацієнтів, які визначаються як такі, що, ймовірно, будуть демонструвати хорошу, слабу або субоптимальну реакцію, відповідно, на FSH при СОН. Так, наприклад, пацієнт, який демонструє хорошу реакцію на естроген, вказує на пацієнта, який визначається як такий, що, ймовірно, буде демонструвати хорошу реакцію на FSH при СОН за способами за цим винаходом, опис яких наведено.

Для підвищення чутливості згаданого способу, фонові рівні андрогена можуть, по суті, ліквідуватись шляхом введення згаданому пацієнту інгібітора секреції андрогена наднирковою залозою, наприклад, дексаметазону, перед стимулювальним введенням LH.

Впродовж стимулювальної фази повтореною може бути будь-яка із вищезгаданих стимулювальних ін'єкцій.

У разі будь-якої із вищезгаданих стимулювальних ін'єкцій, контролюватись, за варіантом, якому віддають перевагу, можуть як андрогени, так і естрогени. Способи контролювання андрогенів та естрогенів є добре відомими та задокументованими у цій галузі і застосовуватись може будь-який із цих способів.

Рівні тестостерону можуть визначатись за допомогою, наприклад, твердофазного радіоімунаналізу у сенсibiliзованій пробірці (Coat-A-Count<sup>TM</sup>, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, США).

Рівні андростендіону можуть визначатись за допомогою, наприклад, радіоімунаналізу (Diagnostic Laboratories Inc., Webster, США).

Рівні 17 $\beta$ -естрадіолу можуть визначатись за допомогою, наприклад, радіоімунаналізу (Diagnostic

Products Corporation, Los Angeles, США).

Гонадотропінами, які застосовуються за способами та варіантами застосувань за цим винаходом, повинні, за варіантом, якому віддають перевагу, бути людські гонадотропіни, і вони можуть бути з будь-якого джерела, за умови, що вони не є забрудненими будь-якими матеріалами (зокрема, іншими гонадотропінами), які будуть значно впливати на їх дію. Можуть застосовуватись сечові гонадотропіни, хоча перевага віддається застосуванню рекомбінантного FSH та LH (rhFSH та rhLH) завдяки їхній високій чистоті. Особлива перевага віддається застосуванню rhLH.

Фармакокінетика rhLH є дуже подібною до фармакокінетики гіпофізарного LH. Після фази швидкого розподілу з початковим  $t_{1/2}$  1 год, rhLH видалається з кінцевим  $t_{1/2}$  приблизно 10 год. Загальний кліренс дорівнює 2л/год, причому менше ніж 5% згаданої дози видалається нирками. Стаціонарний об'єм становить 8л. Ці фармакокінетичні характеристики контрастують із фармакокінетичними характеристиками сечового hCG. У разі останнього, кінцевий  $t_{1/2}$  перевищує 30 год. Гадають, що hCG залишається у системі кровообігу у 2-3 рази довше, аніж LH.

До обсягу цього винаходу входять також фармацевтичні композиції, що містять LH або його аналог та фармацевтично прийнятний розчинник, носій або наповнювач, для застосування у способі за цим винаходом, наприклад, для індукування або стимулювання фолікулогенезу. Фахівцю у цій галузі є відомим цілий ряд таких розчинників або наповнювачів, придатних для введення до складу фармацевтичної композиції. За варіантом, якому віддають перевагу, згадані фармацевтичні композиції містять добову дозу LH (наприклад, дозу у 20-400МОд, за варіантом, якому віддають перевагу, 50-300МОд, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, 75-225МОд або 100-200МОд або, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, 150МОд LH) для введення від дня 1 до приблизно дня 4, за варіантом, якому віддають перевагу, від дня 1 до дня 4, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, від дня 1 до дня 3, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, від дня 1 до дня 2 або лише у день 1 стимулювальної фази СОН. У цьому описі наведено інші відповідні дози LH.

LH, за типовим варіантом, вводять до складу як одиничну дозу у формі твердої речовини, готової до розчинення з одержанням стерильного ін'єкційного розчину для внутрішньом'язового або підшкірного застосування. Згадану тверду речовину одержують, як правило, шляхом ліофілізації. До типових наповнювачів та носіїв належать цукроза, лактоза, хлорид натрію, буферні речовини, наприклад, одноосновний фосфат натрію та двоосновний фосфат натрію. Розчин можна одержати шляхом розчинення водою для ін'єкцій безпосередньо перед застосуванням.

LH може також вводиться до складу як розчин для ін'єкцій, що містить будь-який з наведених вище наповнювачів або буферних речовин, та інші, відомі фахівцю у цій галузі.

Низькомолекулярні агоністи LH, такі, наприклад, про які повідомляється у [WO 00/61586] (Akzo Nobel), можуть вводиться пероральним шляхом, у формі сиропу, таблетки або капсули, після змішування з придатним наповнювачем. За альтернативним варіантом вони можуть вводиться інтраназально, у формі розчину або тонкоподрібненого порошку, придатного для розпилювання.

Докладніший опис винаходу буде наведено у наведеному далі необмежувальному Прикладі.

Приклад

Пацієнтів відбирають таким чином:

Критерії включення

Тип безпліддя: трубне IVF і неясне безпліддя. (n=120 у цілому)

Нормальний менструальний ритм

Вік <37 років

Індекс маси тіла (BMI)  $\leq 30$

Без недавнього введення гормонів

2 функціональні яєчники

Критерії виключення

Ультразвукове визначення полікістозного яєчника

Індекс маси тіла >30

Один функціональний яєчник

Інші неприйнятні захворювання

Методика

Пацієнти піддаються регуляції за типом негативного зворотного зв'язку (із започаткуванням на 18-23 день менструального циклу) за допомогою ін'єкцій Lupron®, Synarel® або Zoladex® за 14-18 днів до початку. Вихідна точка періоду праймування (день L1) потребує сироваткових рівнів естрадіолу ( $E_2$ ) <150пмоль/л (50пг/мл) і не більше однієї кісти яєчника діаметром <30мм.

У дні L1-L4 (період праймування), пацієнти щоденно одержують плацебо або 225МОд rhLH.

Розпочинаючи з останнього дня періоду праймування, пацієнти щоденно впродовж 7 днів (S1-S7) одержують 150МОд FSH (введення LH припиняють після L4). Дози можуть бути зменшені у S7 або пізніше у разі існування ризику надстимулювання. У S7 дози підвищують до 300МОд FSH на добу, якщо концентрація  $E_2$  у системі кровообігу є меншою ніж 450пмоль/л та/або існує <6 фолікулів діаметром >8мм.

Введення FSH продовжують доти, доки середній діаметр найбільшого фолікула не досягне щонайменше 17мм і існує два інші фолікули із середнім діаметром >16мм. На цьому етапі вводять hCG у дозі запуску механізму овуляції (5000-10000МОд hCG). Відбирання ооцитів здійснюють через приблизно 36год після ін'єкції hCG. Ооцити запліднюють in vitro. Ембріони, які демонструють раннє роздроблення (через 25год після запліднення), розглядаються як такі, що мають значно більші шанси імплантування та вагітності. Перевірку раннього роздроблення (EC) здійснюють через 25год після запліднення і реєструють кількість роздроблених ембріонів, кількість подій сингамії (злиття сперми та яйцеклітини) та кількість недроблених ембріонів.

Реєструють також:

Кількість та діаметр фолікулів у день введення hCG і, зокрема, кількість фолікулів діаметром понад 15мм;

Вихід ооцитів;  
Кількість використаних ампул rFSH;  
Кількість використаних ампул rFSH на ооцит;  
Концентрацію естрадіолу на S7 у системі кровообігу;  
Зменшення кількості випадків "слабого реагування" на лікування стандартною дозою (150МОд FSH на добу) у групах пацієнтів;  
Співвідношення великих фолікулів до малих фолікулів на момент введення hCG;  
Кількість фолікулів із середнім діаметром >10мм у S7;  
Концентрації інгібіну-В у системі кровообігу у S7.  
Посилання

1. Healy et al.; Lancet 343 1994; 1539-1544
2. Наприклад, стандартне обладнання, розкрито в EP 0170502 (Serono Laboratories, Inc.).
3. Filicori M.; J. Clin. Endocrinol. Metab. 81 1996; 2413-6.
4. Filicori M. et al; Fertil. Steril 65 1996; 387-93.
5. Filicori et al.; J. Clin. Endocrinol. Metab. 84 1999; 2659-2663.
6. The European Recombinant Human LH Study Group; J. Clin. Endocrinol. Metab. 83 1998; 1507-1514.
7. Sullivan M.W. et al.; J. Clin. Endocrinol. Metab. 84 1999; 228-232.
8. Sills et al. ; Human Reproduction 14 1999; 2230-2235.
9. Ben-Amor A-F, on behalf of the Study Group (Tarlatzis B, Tavmergen E, Shoham Z, Szamatowicz M, Barash A, Amit A, Levitas I, and Geva E). The effect of luteinizing hormone administered during late follicular phase in normo-ovulatory women undergoing in vitro fertilization. Hum Reprod 2000; 15 (Abstract book 1):46 (Abstract no. 0-116).
10. Weriiri L., Kelly E, Weathersbee P., Nebiolo L., Ferrande L. A multi-center, randomized, comparative, open-trial to assess the safety and efficacy of Gonal-F (r-hFSH) versus Gonal-F and recombinant human luteinizing hormone (r-hLH) in patients undergoing ICSI: Preliminary data. Fertil. Steril. 1999 72;3 (Suppl 1) (Abstract no. O-032).
11. Williams R.S., A multi-center study comparing the efficacy of recombinant human FSH (Gonal-F) versus r-hFSH plus recombinant human LH in patients undergoing Controlled Ovarian Hyperstimulation for Assisted Reproductive Technology. Fertil. Steril. 2000, 74;3 (Suppl I)(Abstract no. P-428).
12. Van Hell et al; Acta Endocrin, 47 1964; 409-418.