



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 30 813 T2** 2008.07.03

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 463 493 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 30 813.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP01/14730**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 274 987.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/051344**

(86) PCT-Anmeldetag: **14.12.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **26.06.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.10.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **03.10.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.07.2008**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 31/00** (2006.01)

A61K 31/277 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/502 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 15/08 (2006.01)

(73) Patentinhaber:

Laboratoires Serono S.A., Coinsins, Vaud, CH

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**PALMER, Stephen, Plympton, MA 02367, US;
TEPPER, Mark, Canton, MA 02021, US; MCKENNA,
Sean, Ducksberry, MA 02332, US; MACNAMEE,
Michael C., Bourn, Cambridgeshire CB3 7SP, GB;
ESHKOL, Aliza, CH-1278 La Rippe, CH**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUM HERBEIFÜHREN EINES EISPRUNGS MITTELS EINES NICHT-POLYPEPTID
CAMP-LEVEL-MODULATORS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Steigerung der Fruchtbarkeit in einem weiblichen Wirt indem durch die Verabreichung eines nicht-polypeptiden cAMP-Niveau-Modulators, welcher der Phosphodiesterase-Hemmer cis-4-cyano-4-(3-cyclopentyl-4-methoxyphenyl)cyclohexan-1-Carboxylsäure ist, eine Ovulation induziert wird.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Ovulation ist der Vorgang, bei dem eine Eizelle oder mehrere Eizellen von den Ovarien abgegeben wird. Für die Fruchtbarkeit ist die zeitliche Abstimmung der Ovulation innerhalb des Menstruationszyklus von äußerster Wichtigkeit. Es ist allgemein anerkannt, dass Follikel die Fähigkeit zu ovulieren nach ihrem Wachstum und ihrer Reifung erlangen, die durch die pituitären Gonadotropine stimuliert wird. Das follikelstimulierende Hormon (FSH) ist in erster Linie für das Follikelwachstum verantwortlich und das luteinisierende Hormon (LH) stimuliert die Ovulation. Dieser koordinierte Prozess der Gonadotropin-stimulierten Reifung des Follikels stellt sicher, dass bei der Ovulation eine fortpflanzungsfähige Eizelle abgegeben wird. Das ausreichend vorbereitete Ovum ist dann innerhalb von Stunden nach der Ovulation für eine Fertilisation durch Sperma verfügbar.

[0003] Die Ovulation ist ein genau zeitlich abgestimmter Ablauf, welcher durch die pituitäre Gonadotropin-stimulation der Ovarie Antrieb erhält und durch das Wachstum und die biochemische (z. B., steroidogen, Inhibinsekretion, etc.) Reaktion der Follikel auf die Gonadotropin-stimulation modifiziert wird. Während des normalen weiblichen Menstruationszyklus zeigen diese Hormone zyklische Muster. Der Menstruationszyklus kann funktionell in drei Phasen eingeteilt werden; die follikuläre, die ovulatorische und die luteale Phase. Die follikuläre Phase beginnt am Ende der lutealen Phase des vorhergehenden unempfindlichen Zyklus vor dem oder gleichzeitig mit dem Einsetzen der Menstruation. Der Zyklus beginnt mit einem transienten Anstieg der FSH-Niveaus im Blut, welcher die Entwicklung einer Kohorte von Ovarialfollikel stimuliert. Die Abmessung der Follikel, die zum Wachsen rekrutiert wurden, beträgt etwa 5 mm im Durchmesser. In einem natürlichen Menstruationszyklus wird üblicherweise während der follikulären Phase ein großes oder dominantes Follikel aufgebaut, dessen Entwicklung bis zur Reife vorangetrieben wird. Bei Menschen weist ein Follikel, das für eine Ovulation bereit ist, etwa einen Durchmesser von 15 mm oder mehr auf.

[0004] Das zweite kritische Ereignis, welches in Ovarie während der follikulären Phase eintritt ist,

dass Granulosazellen innerhalb des Ovarienfollikels Rezeptoren für LH ausbilden und in zunehmenden Maß auf LH reagieren. Die Sekretion von Estradiol und Estron von der Ovarie nimmt zuerst langsam, gleichzeitig mit dem zunehmenden Durchmesser des Follikels und der Empfindlichkeit des Follikels auf LH zu. Der relative Anstieg der Estrogen- und Inhibin-niveaus bewirkt die Inhibition der Sekretion von Gonadotropin-Freisetzungshormon (GnRH) vom Hypothalamus und der Gonadotropinsekretion von der Hypophyse. Die Estrogenproduktion erreicht einen Tag vor der LH-Wertspitze ein Maximum und die neuroendokrine Reaktion auf das erhöhte Estrogen und die die graduell ansteigenden Progesteronkonzentrationen ist die präovulatorische Freisetzung von Gonadotropinen, die unten erörtert wird.

[0005] Während der ovulatorischen Phase kommt es zu einer Änderung der neuroendokrinen Reaktion auf Estrogen und Progesteron. An diesem Punkt im Zyklus ruft das erhöhte Estrogen aufgrund einer positiven Rückmeldung zum Hypothalamus einen präovulatorischen Anstieg der Serum-FSH- und LH-Niveaus hervor, wobei das Estrogen nun einen Anstieg der GnRH-Niveaus und in der Folge der Freisetzung von FSH und LH von der Hypophyse stimuliert. Dieser Anstieg der Gonadotropine induziert den Abschluss der follikulären Reifung und bewirkt die Ruptur des dominanten oder Graaf'schen Follikels und die Abgabe des Ovums etwa 16 bis 24 Stunden nach der LH-Wertspitze. Während des Abschnitts, der auf den präovulatorischen Anstieg folgt, nehmen die Serum-Estradiol-Niveaus zeitweilig ab, und die Plasma-Progesteron-Niveaus beginnen anzusteigen.

[0006] Nach der Ovulation werden die post-ovulatorischen Ovarialfollikel-Zellen unter dem Einfluss von LH luteinisiert, um ein Corpus Luteum zu bilden – die luteale Phase. Die diagnostischen Marker der lutealen Phase des Menstruationszyklus sind der markante Anstieg der Progesteronsekretion durch das Corpus Luteum und die uterine Transformation, die in Reaktion auf das Progesteron auftritt. Mit der lutealen Progesteronproduktion ist eine weniger ausgeprägte Zunahme der Serumestrogen-Niveaus verbunden. Während das Progesteron und die Estrogene zunehmen, nehmen LH und FSH über den Großteil der lutealen Phase ab. Gegen Ende der lutealen Phase nimmt, in einem unempfindlichen Menstruationszyklus, das Corpus Luteum ab, und die Serum-FSH-Niveaus beginnen anzusteigen, um das Follikularwachstum des nächsten Zyklus zu initiieren.

[0007] FSH und LH unterscheiden sich von einander in ihrer Fähigkeit, die follikuläre Entwicklung bzw. die Ovulation zu stimulieren. Von beiden Wirkstoffen ist bekannt, dass sie eine Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentrationen stimulieren. Es wurde in vitro nachgewiesen, dass Wirkstoffe, welche cAMP nachahmen, wie etwa Forskolin, oder stabile Analo-

ga von cAMP, in Granulosazellen von unreifen Follikel eine ähnliche Wirkung haben wie FSH, und in Zellen reifer Follikel eine ähnliche Wirkung haben wie LH. Obwohl sowohl für FSH, als auch für LH alternative intrazelluläre Signalwege vorgeschlagen wurden, wird allgemein anerkannt, dass cAMP in Reaktion auf beide Gonadotropine stimuliert wird. Ob und wann die Erhöhungen der cAMP-Niveaus mit der follikulären Entwicklung und Reifung oder mit der Induktion der Ovulation assoziiert werden, hängt von den Zelltypen und dem Vorhandensein oder der Abwesenheit der entsprechenden Rezeptoren ab. In der Tat wurde gezeigt, dass Mäuse, welche in einer bestimmten Phosphodiesterase defizient sind, eine beeinträchtigte Ovulation und eine verringerte Sensitivität der Granulosazellen zu Gonadotropinen aufweisen.

[0008] Unfruchtbarkeitsbehandlungen, die derzeit in klinischer Verwendung sind, beziehen einige der oben beschriebenen Ereignisse mit ein. Ein Wirkstoff, welcher das Follikelwachstum stimuliert und für die Behandlung von Anovulation verwendet wird, ist Clomiphen. Clomiphen ist ein nichtsteroidales Antiestrogen, welches mit Estrogenen an deren Bildungsstellen konkurriert. Es wird vermutet, dass Clomiphen an Estrogenrezeptoren im Hypothalamus und der Hypophyse bindet, und die negative Rückmeldung, die von den ovariellen Estrogenen ausgeht, blockiert. Dies führt während der frühen follikulären Phase zu einer erhöhten Ausgabe von Gonadotropinen (FSH und LH). Clomiphen bewirkt eine Zunahme der endogenen FSH-Serumniveaus und die Verstärkung des Wachstums und der Reifung der Follikel. Infolgedessen leiten entweder endogenes LH oder exogenes LH/CG bei diesen Patienten die Ovulation ein.

[0009] Die WO 01/47905 beschreibt Pyrrolidin-Derivate, welche Inhibitoren der Phosphodiesterase-4 sind, für die Behandlung, unter anderem, von Unfruchtbarkeit sowohl bei weiblichen, als auch bei männlichen Subjekten. Zussman u. a., Journal of Clinical Pharmacology, Band 41, Nr. 9, 2001, Seiten 950-958 beschreibt den Phosphodiesterase-4-Hemmer Cilomilast.

[0010] Zusätzlich zu Clomiphen wurden Frauen auch mit Ovulationsinduktions-Regimen behandelt, welche kommerzielle Zubereitungen der humanen Gonadotropine enthielten, einschließlich des follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des luteinisierenden Hormons (LH) oder des Chorion-Gonadotropins (CG), von denen alle zuerst durch Reinigung aus Urin schwangerer Frauen, und in jüngerer Zeit durch rekombinante Technologien erhalten wurden. Im Allgemeinen ist diese Behandlung bei der Stimulation der Follikulogenese und der Steroidogenese hochgradig wirksam. Komplikationen bei dieser Behandlung ergeben sich aus der Tatsache, dass diese Präparate und Regime die follikuläre Entwicklung und Reifung

von Follikeln überstimulieren können. Bei einer Untergruppe von Patienten, kann die Ovarie hyperstimuliert werden, was zu mehrfachen Ovulationen und in der Folge zu Mehrfachgeburten führen kann. Eine ovarielle Hyperstimulation kann nicht nur für die Mutter lebensbedrohlich sein, sondern sie führt auch typischerweise zu Neugeborenen mit geringerem Geburtsgewicht, die in der Folge einer intensiven Pflege bedürfen. Man glaubt, dass die wesentlichen Komplikationen, die einer Gonadotropin-induzierten Hyperstimulation zugeschrieben werden, und die Mehrfachschwangerschaften sich wahrscheinlich aus den verlängerten Auswirkungen von hCG ergeben. Zusätzlich kann die Verwendung von Gonadotropinen bei Ovulationsinduktions-Regimen zu Reaktionen an der Injektionsstelle führen, sowohl lokal als auch systemisch. Daher böte die Entwicklung von Ovulationsinduktions-Regimen, welche orale Wirkstoffe mit einer mildereren gonadotropinartigen Aktivität verwenden, gegenüber Therapien, welche starke Injektionsstoffe verwenden, einen erheblichen Vorteil. Ein noch wichtigerer erheblicher Vorteil ergäbe sich, wenn Ovulationsinduktions-Regime entwickelt werden könnten, die zu weniger ovariellen Hyperstimulationen führen würden, und somit eine geringere Gefahr für die Mutter darstellen würde und gesündere Neugeborene hervorbringen würde.

Zusammenfassung der Erfindung

[0011] In einem ersten Aspekt bietet die Erfindung die Verwendung des PDE4-Hemmers cis-4-cyano-4-(3-(cyclopentyloxy)-4-methoxyphenyl)cyclohexan-1-Carboxylsäure für die Herstellung eines Medikaments zur Induktion der Ovulation bei einem Patienten.

[0012] In einem weiteren Aspekt bietet die Erfindung eine Verwendung des PDE4-Hemmers cis-4-cyano-4-(3-(cyclopentyloxy)-4-methoxyphenyl)cyclohexan-1-Carboxylsäure für die Herstellung eines Medikaments für die Induktion der Ovulation in einem Patienten, in einem Regime, wobei die follikuläre Reifung vor der Induktion der Ovulation mit Clomiphen oder einem Aromatase-Hemmer induziert wird, welcher aus YM-511, Letrozol, Fadrozol, und Anastrozol, bevorzugter aus Letrozol und Anastrozol, ausgewählt ist.

[0013] In einem weiteren Aspekt bietet die Erfindung die Verwendung des PDE4-Hemmers wie in den Ansprüchen festgelegt.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0014] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung einer Zusammensetzung, welche den Phosphodiesterase-Hemmer cis-4-cyano-4-(3-(cyclopentyloxy)-4-methoxyphenyl)cyclohexan-1-Carboxylsäure enthält, bei der Herstellung eines Medika-

ments zur Verbesserung der Fruchtbarkeit in einem weiblichen Wirt. In einem weiteren Aspekt bietet die Erfindung die Verwendung dieser Zusammensetzung zur Herstellung eines Medikaments für die Induzierung der Ovulation des dominanten reifen Follikels vor der lutealen Phase eines ovulatorischen Zyklus.

[0015] Obwohl Auswirkungen des PDE-Hemmers auf die LH-stimulierte Steroidogenese von Granulosazellen in vitro beschrieben wurden, beschreibt die vorliegende Erfindung zwei neuartige Entdeckungen. Erstens versagen die PDE-Hemmer dabei, das FSH-stimulierte follikuläre Wachstum in vivo zu verstärken, abgesehen von der anerkannten Rolle von cAMP in den zellulären Signalwegen von sowohl FSH, als auch LH. Darüber hinaus wird der Nachweis erbracht, dass PDE-Hemmer die Gonadotropin-stimulierte Steroidogenese in vitro verstärken, was die neuartige Aktivität des PDE-Hemmers auf die LH-abhängige Ovulation weiter verdeutlicht. Zweitens verstärken in Abwesenheit von hinzugefügtem LH oder hCG die PDE-Hemmer die Ovulationsrate in vivo. Anbetracht der oralen Aktivität der PDE-Hemmer, bietet diese zweite Entdeckung die Basis für das erste potentiell injektionsfreie Regime für die Ovulationsinduktion, da die PDE-Hemmer in Zusammenhang mit bestehenden Regimen verwendet werden können, wie unten beschrieben wird.

[0016] Es wird hierin auch die Stimulation der follikulären Entwicklung vor der Verabreichung eines nichtpolypeptiden cAMP-Niveau-Modulators beschreiben, wozu die Verabreichung eines Wirkstoffes zählt, welcher die FSH-Konzentrationen während der follikulären Phase des ovulatorischen Zyklus des Wirts verstärkt. Das Ziel des Verstärkens des FSH betrifft alleine die follikuläre Entwicklung und Reifung und nicht die Induktion der Ovulation. Zu bevorzugten Wirkstoffen zählen FSH selbst, Clomiphen, selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren, Aromatase-Hemmer und selektive Modulatoren der neuroendokrinen Regulation der FSH-Produktion.

[0017] In noch einem weiteren Aspekt sieht die Erfindung die Verwendung des ersten Aspekts vor, wobei die Zusammensetzung weiters LH oder Chorion-Gonadotropin (CG), für eine Verabreichung vor der lutealen Phase des ovulatorischen Zyklus des weiblichen Wirts, aufweist. Zusätzlich sieht die Erfindung die Verwendung geringerer Konzentrationen von LH oder CG für eine Verabreichung an den Wirt vor, als die Konzentrationen, die in derzeitigen Ovulationsinduktions-Regimen verwendet werden, und verringert dabei die Wahrscheinlichkeit einer ovariären Hyperstimulation.

[0018] Zusätzlich sieht die vorliegende Erfindung die Verwendung des Phosphodiesterase-Hemmers cis-4-cyano-4-(3-(cylopentylloxy)-4-methoxyphenyl)cyclohexan-1-Carboxylsäure zur Herstellung ei-

nes Medikaments vor, wobei das Medikament zur Verabreichung in einem Verfahren dient, mit dem Oozyten für eine In-Vitro-Fertilisation gesammelt werden.

[0019] Somit sieht die Erfindung die Verwendung dieses ersten Aspekts für eine orale Verabreichung vor, anstatt einer Verabreichung durch eine Injektion, welche Verabreichungsform für Proteine erforderlich ist, und die Verabreichungsform darstellt, die bei derzeitigen Ovulationsinduktions-Regimen Verwendung findet. Eine orale Verabreichung verhindert die akuten und systemischen Nebenwirkungen, die mit solchen Injektionen verbunden sind. In erster Linie dient die Verwendung des ersten Aspekts der Einleitung von Ovulationen, und er kann für eine Verabreichung alleine oder mit oder ohne LH oder CG geeignet sein, und optional geringere Konzentrationen an LH oder CG aufweisen, als die derzeit verwendeten, und somit das Auftreten einer ovariären Hyperstimulation und die damit verbundenen Risiken verringern. Demzufolge können Mehrfachgeburten und lebensbedrohliche Komplikationen für die Mutter und die Neugeborenen vermieden werden. Zusätzlich ist die vorliegende Erfindung für die Möglichkeit nützlich, frühere diagnostische Schwangerschaftstests durchzuführen, als bei derzeitigen Ovulationsinduktions-Regimen, welche die Verwendung von CG enthalten.

[0020] Die Verwendungen der Erfindung, wie sie in den Ansprüchen definiert ist, wird für die Behandlung von Unfruchtbarkeit beim Menschen, aber auch bei anderen Säugetieren (wie etwa bei Pferden und Vieh, z. B. Rindern, Schafen, Kühen und dergleichen) und anderen Arten, wie etwa Fischarten (z. B. Fischen) und Vögeln (z. B. Geflügel) nützlich sein.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0021] [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung eines verallgemeinerten Ovulationsinduktions-Regimes bei Menschen.

[0022] [Fig. 2](#) ist eine Balkendiagramm-Darstellung der Auswirkung von Phosphodiesterase-Hemmern in vitro (d. h. Verbindung 1 und Verbindung 2 (Referenz)) auf die zunehmenden intrazellulären cAMP-Niveaus in Granulosazellen.

[0023] [Fig. 3](#) ist eine Balkendiagramm-Darstellung der Auswirkung eines Phosphodiesterase-Hemmers (d. h. Verbindung 1) auf die Follikelreifung in Ratten, in vivo.

[0024] [Fig. 4](#) ist eine Balkendiagramm-Darstellung der Auswirkung eines Phosphodiesterase-Hemmers (d. h. Verbindung 1) auf die Ovulation mit CG in Ratten, in vivo.

[0025] [Fig. 5](#) ist eine Balkendiagramm-Darstellung

der Auswirkung eines Phosphodiesterase-Hemmers (d. h. Verbindung 1) auf die Ovulation mit und ohne GC in Ratten, in vivo.

[0026] [Fig. 6](#) ist eine Balkendiagramm-Darstellung der Auswirkung eines Phosphodiesterase-Hemmers (d. h. Verbindung 2 (Referenz)) auf die Ovulation mit und ohne CG in Ratten, in vivo.

[0027] [Fig. 7](#) ist eine Balkendiagramm-Darstellung der Auswirkung eines Phosphodiesterase-Hemmers (d. h. Verbindung 2 (Referenz)) auf die Ovulation in Folge einer oralen und subkutanen Verabreichung.

[0028] [Fig. 8](#) ist eine Balkendiagramm-Darstellung der Auswirkungen des PDE-Hemmers Verbindung 3 (Referenz) auf die Ovulation in vivo in Folge einer oralen und subkutanen Verabreichung.

[0029] [Fig. 9](#) ist eine Balkendiagramm-Darstellung der Auswirkungen des PDE-Hemmers Verbindung 4 (Referenz) auf die Ovulation bei Vorhandensein oder in Abwesenheit einer subeffektiven Dosis von hCG in vivo.

[0030] [Fig. 10](#) ist eine Balkendiagramm-Darstellung der Auswirkungen des PDE-Hemmers Verbindung 2 (Referenz) auf die Ovulation und die Fruchtbarkeit.

I. Definitionen

[0031] Die folgenden Worte und Ausdrücke sind, wenn sie in der Beschreibung, den Beispielen und den Ansprüchen verwendet werden, im Allgemeinen, wie folgt definiert.

[0032] „Verabreichung“ bezeichnet die Abgabe eines therapeutischen Wirkstoffs in einen weiblichen Wirt. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung würde dies die Abgabe eines nicht-polypeptiden cAMP-Niveau-Modulators und/oder eines Wirkstoffes, welcher die FSH-Konzentrationen erhöht, beinhalten. Dieser Ausdruck ist vollständiger unter dem hierin enthaltenen Abschnitt mit dem Titel „Pharmazeutische Zusammensetzungen“ beschreiben.

[0033] „Ovulation“ bezeichnet für die Zwecke hierin den Vorgang, bei dem ein Ovum oder Ova von den Ovarien freigegeben wird/werden. Wenn die Mitte des Zyklus näher rückt, steigt das Estrogen dramatisch an, gefolgt von einem Anstieg des LH und in einem geringeren Ausmaß einem Anstieg des FSH. Dies löst die Ovulation des dominanten Follikels aus. Die Ovulation besteht aus einer schnellen follikulären Vergrößerung, in deren Folge das Follikel aus der Oberfläche des ovarialen Kortex hervorsticht. Schließlich führt eine Ruptur des Follikels zum Ausstoßen eines Oozyten-Kumulus-Komplexes. Die Reste des dominanten Follikels bilden sich dann um, und werden zum Corpus Luteum.

[0034] „Anovulation“ bezeichnet ein Fehlen einer Ovulation.

[0035] „Nicht-polypeptide cAMP-Niveau-Modulatoren“ bezeichnen Verbindungen, die nicht in ihrer Gänze aus Aminosäuren bestehen, ungeachtet einer Glycosylierung, und direkt oder indirekt wirken, um die intrazellulären cAMP-Niveaus zu erhöhen. Solche Verbindungen können die cAMP-Niveaus erhöhen, indem sie die cAMP-Synthese stimulieren, oder indem sie deren Abbau hemmen, oder durch beides. Zu Beispielen von Modulatoren, welche die Synthese von cAMP erhöhen, zählen Aktivatoren von Adenylcyclase, wie etwa Forskolin. Zu Beispielen von Modulatoren, welche den Abbau von cAMP hemmen, zählen Inhibitoren von Phosphodiesterasen, wie etwa Theophyllin.

[0036] „Weiblicher Wirt“ bezeichnet ein Individuum weiblichen Geschlechts einer Spezies, an welche Wirkstoffe gemäß der vorliegenden Erfindung verabreicht werden. Menschen, andere Säugetiere, und andere Spezies, wie etwa Fisch oder Geflügel, sind per Definition hierin miteinbezogen.

[0037] „Phosphodiesterase-Hemmer“ bezieht sich auf chemische Verbindungen, welche Phosphodiesterasen (PDEs) blockieren oder hemmen, deren Wirkung es ist, ihre zyklischen Nukleotidziele (z. B. cAMP und cGMP) zu inaktivieren, indem sie die 3'-Phosphodiester-Bindung hydrolytisch spalten, wodurch sich eine passive Anhäufung von bestimmten zyklischen Nukleotiden ergibt. Hemmer können nichtselektiv für alle Phosphodiesterase-Isoformen, oder selektiv für bestimmte Isoformen wirken. Siehe hierin zitierte Verbindungen.

[0038] „Phosphodiesterase-Isoforme“ bezeichnen eine Familie von Isozymen oder Isoformen, die für den Metabolismus oder den Abbau der intrazellulären zweiten Messenger, cAMP und cGMP, verantwortlich sind. Bestimmte Isoforme können hoch selektive zelluläre und subzelluläre Lokalisierungen aufweisen. Zu Beispielen von Phosphodiesterase-Isoformen zählen PDE3 und PDE4.

[0039] „Follikuläre Phase“ bezeichnet den ersten Teil des Menstruationszyklus, wofür eine fortschreitende Zunahme der zirkulierenden Niveaus von Estradiol und Inhibin B durch das sich entwickelnde Graafsche Follikel charakteristisch ist.

[0040] „Vor der lutealen Phase“ bezeichnet den Abschnitt des Menstruationszyklus vor der Verschiebung von der estrogendominierten follikulären Phase zu der progesterondominierten lutealen Phase. Vor der lutealen Phase sind die Estrogenniveaus im Allgemeinen größer als oder gleich 150 pg/ml/Follikel für ein Follikel von 16 mm Durchmesser und die Follikelgröße ist im Allgemeinen nicht geringer als 14

mm im Durchmesser. Diese Kriterien sind nicht absolut und variieren von Patienten zu Patienten. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung und hinsichtlich der zeitlichen Abstimmung der Verabreichung des nicht-polypeptiden cAMP-Niveau-Modulators, kann der nicht-polypeptide cAMP-Niveau-Modulator einem weiblichen Wirt zu dem Zeitpunkt verabreicht werden, zu dem diesem Wirt in bestehenden Ovulationsinduktions-Regime(n) normalerweise hCG oder LH verabreicht wird.

[0041] „Ovulatorischer Zyklus“ oder „Menstruationszyklus“ bezeichnet eine Reihe klinischer Ereignisse über einen speziesspezifischen Zeitraum, welcher das folliculäre Wachstum und die folliculäre Entwicklung, die Anwerbung, die Selektion, die Dominanz, die Ovulation und die Bildung und das Absterben des Corpus Luteum enthält. Funktional kann dieser Zyklus in drei Phasen eingeteilt werden, die folliculäre, die ovulatorische und die luteale Phase. Dieser Zyklus kann auch als Menstruationszyklus bezeichnet werden.

[0042] „Ovulationsinduktion“ bezieht sich auf das Verfahren, bei dem ein (mehrere) Polipeptid(e) und/oder synthetische Chemikalien verwendet werden, um eine Ovulation in weiblichen Wirten herbeizuführen, die anderenfalls anovulatorisch waren, was zu einer Induktion einer folliculären Ruptur und einer Ovulation fertilisierbarer Oozyten führt. Zur Ovulationsinduktion zählen nicht die vorhergehenden Ereignisse in der Zeit während des ovulatorischen Zyklus der folliculären Reifung und Entwicklung.

[0043] „Ovariale Hyperstimulation“ bezeichnet eine pharmakologische Intervention eines ovulatorischen oder anovulatorischen Menstruationszyklus. Sie hat die Reifung mehrerer Follikel zur Folge, was zu einer Kodominanz mehrerer Follikel und zum Vorhandensein mehrerer fertilisierbarer Oozyten führt.

[0044] „Follikel“ bezeichnet den mit Fluid gefüllten Sack, welcher das Ovum umgibt, wobei der Sack auch Granulosazellen enthält.

[0045] „Folliculäre Entwicklung“ bezieht sich auf das fortschreitende Wachstum und die Entwicklung ovarialer Follikel, insbesondere während der folliculären Phase des ovulatorischen Zyklus, und sie führt zur Anwerbung und Dominanz eines zur Ovulation bestimmten Follikels.

[0046] „Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und Isoforme“ bezeichnet ein von der Hypophyse abgegebenes Hormon, welches das Wachstum des ovarialen Follikels stimuliert, und Isoforme von FSH, wie sie beispielsweise in dem US-Patent Nr. 5,087,615 beschrieben sind.

[0047] „Selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren“

bezeichnen chemische Verbindungen oder Polypeptide, welche auf dem Niveau des Hypothalamus und der Hypophyse als Estrogenrezeptor-Antagonisten, und auf dem Niveau des Uterus als ein Agonist wirken. Zu Beispielen solcher Modulatoren können Tamoxifen, Raloxifen, Toremifen, Clomiphen und Droloxifen zählen. Siehe auch: „Endocrinology“, Dezember 1999: 138(12): 5476-5484.

[0048] „Aromatase-Hemmer“ bezeichnen chemische Zusammensetzungen oder Polypeptide, welche die Aktivität der Aromatase, welche ein Enzym ist, das Androgene in Estrogene umwandelt, blockieren oder hemmen. Zu Beispielen für Aromatase-Hemmern zählen Letrozol, Anastrozol und Vorozol. Siehe auch 1) „Journal of Endocrinology“, Feb. 2000: 164(2): 225-238; und 2) „Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology“, April 1997: 61(3-6): 157-166.

[0049] „Zugehörige steroidogene Enzyme“ bezieht sich auf alle Enzyme, welche in die Katalyse von biochemischen Reaktionen miteinbezogen sind, welche zur Synthese von Estrogen und Progesteron führen, einschließlich 3-β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase, und zu Hemmern dieses Enzyms zählen Daidzein, Genistein, Biochanin A und Formononetin. Siehe auch: „Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology“, April 1996: 58(1): 95-101.

[0050] „Clomiphen“ bezieht sich auf 2-[4-(2-chloro-1,2-diphenylethenyl)phenoxy]-N,N-Diethylethanamin und dessen Salze.

[0051] „Luteinisierendes Hormon“ bezeichnet ein von der Hypophyse freigesetztes Hormon, welches dem zweifachen Zweck hat, ein dominantes Follikel zu veranlassen, sein Ovum freizusetzen, und den Corpus Luteum zur Abgabe von Progesteron zu stimulieren.

[0052] „Verringerte Konzentrationen“ bezeichnet geringere Konzentrationen eines verabreichten Wirkstoffs im Vergleich zu Standardniveaus von verabreichten Wirkstoffen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, werden geringere Konzentrationen von LH oder CG verabreicht, als in bestehenden Ovulationsinduktions-Regimen verabreicht werden.

[0053] „Bestehende Ovulationsinduktions-Regime“ bezeichnen derzeitige Verfahren zur Einleitung der Ovulation, einschließlich der Verwendung von Clomiphen, Gonadotropinen (d. h. FSH, LH und CG) oder einer Kombination dieser Wirkstoffe, um eine Follikulogenese und eine induzierte Ovulation in anovulatorischen weiblichen Subjekten zu fördern. Die Regime werden hinsichtlich der zeitlichen Abstimmung, der Frequenz und der Konzentration der verabreichten Wirkstoffe variiert. Diese Definition beinhaltet die Mo-

difikationen von derzeitigen Regimen, welche immer noch die Verabreichung von hCG oder LH zu einem Zeitpunkt während des Ovulationsinduktions-Regimes erfordern. Die folgenden Abhandlungen behandeln die Themen weibliche Unfruchtbarkeit, stimulierte Follikulogenese und Ovulationsinduktion: „Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology“, Bände 1 und 2; Herausgeber: E.Y. Adashi, J.A. Rock and Z. Rosenwaks; Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996 und „Female Infertility Therapy Current Practice“; Herausgeber: Z. Shoham, C.M. Howles und H.S. Jacobs; Martin Dunitz Ltd., London 1999.

[0054] „Chorion-Gonadotropin“ bezeichnet ein Glycoprotein-Hormon, welches pituitärem LH biologisch und immunologisch ähnlich ist. In der normalen Schwangerschaft wird CG von der Plazenta produziert und kann über erhöhte Niveaus in der Serumkonzentration als ein diagnostischer Marker für eine Schwangerschaft verwendet werden. Das Akronym hCG bezeichnet humanes Chorion-Gonadotropin.

[0055] „Wirkstoffe, welche die FSH-Konzentrationen steigern“ betreffen alle Stoffzusammensetzungen, Proteine oder synthetische Chemikalien, welche die Serumniveau-Konzentrationen von FSE steigern, wenn sie einem weiblichen Wirt verabreicht werden, entweder direkt oder indirekt, durch Verabreichung von FSH selbst oder einem Wirkstoff, welcher die endogene Produktion davon stimuliert oder den endogenen Abbau davon hemmt. Die Definition dieses Ausdrucks und der Wirkstoff schließt Zusammensetzungen mit ein, welche die FSH-Konzentrationen möglicherweise nicht steigern, jedoch eine biologische Funktion und Aktivität eines follikelstimulierenden Hormons aufweisen.

II. Prinzipien der Ovulationsinduktion

[0056] Die Probleme unzureichender oder ungeeigneter Gonadotropinniveaus wurden seit den 1960-ern als eine Ursache ovulatorischer Fehlfunktionen erkannt. Die klinische Effektivität der verschiedenen verwendeten Gonadotropinpräparate verhielt sich proportional zum Betrag des verabreichten FSH. Anfängliche Belege legten nahe, dass exogenes LH für eine ausreichende Follikulogenese während der Ovulationsinduktion nicht erforderlich wären. Es wurde jedoch klar, dass Frauen, denen nur exogenes FSH verabreicht wird, nicht ausreichend follikuläres Estradiol für die Ovulationsinduktion erzeugen. Das Vorhandensein von zumindest einer gewissen Menge an exogenen oder endogenen LH für die Ovulationsinduktion scheint beim Menschen wichtig zu sein. **Fig. 1** zeigt eine schematische Darstellung eines verallgemeinerten Ovulationsinduktions-Regimes. Ein FSH-Präparat wird bei 75 IU/Tag für die ersten 7 Tage verabreicht. Am Ende der 7 Tage wird ein Ultraschallscan durchgeführt, um den follikulären Durch-

messer zu ermitteln und das Serum-Estradiol wird gemessen. Falls das Follikel kleiner als 12 mm ist, wird die FSH-Dosis verdoppelt, und nach weiteren 5–7 Tagen wird eine nachfolgender Scan durchgeführt. Patienten mit einem Follikeldurchmesser ≥ 15 mm erhalten eine ovulatorische Bolusdosis hCG.

III. Verallgemeinertes Ovulationsinduktions-Regime

[0057] Die Ovulationsinduktion ist gleichermaßen als Kunstfertigkeit und als Wissenschaft zu sehen. Trotz eines beachtlichen Feldes an Behandlungsprotokollen kann kein einzelner Ansatz oder eine bestimmtes Verfahren als einzigartig richtig angesehen werden. Bestimmte Prinzipien sind jedoch anwendbar und bieten die Basis für eine sichere und effektive Behandlung. Es ist jedoch zu erwähnen, dass die unten dargelegten Kriterien für die Ovulationsinduktion nur beispielhaft dargelegt sind, und je nach Klinik, Patient und Behandlungsziel erheblich variieren können.

[0058] Der erste Zyklus beinhaltet üblicherweise die tägliche Verabreichung von FSH beginnend mit Tag 4 bis 7 einer Abbruchsblutung. Das Follikelwachstum und die Reaktion werden sowohl über Estrogenniveaus als auch über Ultraschall überwacht. Eine ausreichende Follikelstimulation wird üblicherweise durch eine kontinuierliche Verabreichung von FSH über 7 bis 14 Tage erzielt. Die Behandlung mit FSH für weniger als 8 Tage ist mit einer steigenden Rate an spontanen Aborts bei schwangeren Patienten verbunden.

[0059] Sobald eine ausreichend Follikelentwicklung erreicht wurde (zwei Follikel mit 16 bis 18 mm zusammen mit einem zunehmenden Ansteigen des Serum-Estrogens auf 500 bis 1.000 pg/mL), wird hCG (5.000 oder 10.000 IU) verabreicht. Die zeitliche Abstimmung der hCG-Verabreichung ist wichtig, da sich die vorrangigen Komplikationen, die einer Gonadotropininduzierten Hyperstimulation zugerechnet werden, und multiple Schwangerschaften wahrscheinlich das Ergebnis der anhaltenden Auswirkungen von hCG sind. Obwohl die Halbwertszeit von hCG etwa 8 Stunden beträgt, kann es im Blut des Patienten für 7 bis 10 Tage nach der Injektion nachweisbar bleiben und fälschlich als eine erfolgreiche Behandlungsschwangerschaft diagnostiziert werden. Nach erfolgter Verabreichung von hCG wird das Paar angehalten, in dieser Nacht und ein bis zweimal zusätzlich in den nächsten 48 Stunden Geschlechtsverkehr zu haben.

[0060] Die grundsätzliche Regel betreffend einer Gonadotropin-Verabreichung ist, dass jeder einzelne Behandlungszyklus passend individualisiert, überwacht und eingestellt werden muss. Die Überwachung ist nicht nur notwendig, um die Ovulation und die Schwangerschaftsraten zu verbessern, sondern

auch um das Risiko einer ernsthaften ovarialen Hyperstimulation und deren potentieller Folgen, sowie von Mehrfachschwangerschaften zu verringern.

[0061] Dies wird durch häufige Bestimmungen der Plasma-/Serum-Estradiolniveaus und durch Inspektion der Ovarien mittels Ultraschall erzielt. Die Estradiolniveaus korrelieren im Allgemeinen mit der Anzahl wachsender Follikel, jedoch nicht notwendigerweise mit der Anzahl reifer Follikel. Vertraute man auf die Estradiolniveaus als Marker für die Follikelreife, könnte die Tatsache, dass mehrere kleine Follikel vorhanden sind, fälschlich auf eine Follikelreife hinweisen, was zu einer verfrühten hCG-Verabreichung führt. Da das Follikelwachstum direkt mit der Reifung des Ovums korreliert, kann eine Ultraschalluntersuchung des mittleren Follikeldurchmessers einen besseren Hinweis bei der Beurteilung der Reife und der zeitlichen Abstimmung der hCG-Verabreichung bieten. Die Estrogenniveaus sollten daher verwendet werden, um eine frühe follikuläre Entwicklung als Hinweis auf eine Gonadotropin-Reaktion zu beurteilen, und Ultraschall sollte verwendet werden, um die Anzahl und die Größe der reifenden Follikel zu bewerten.

[0062] Das Ziel der meisten Behandlungen ist es, die Möglichkeiten für eine Einzelschwangerschaft zu maximieren, während das Risiko für ein Hyperstimulationssyndrom minimiert wird. Estradiolniveaus zwischen 1000 und 1500 pg/mL scheinen optimal zu sein, die tatsächlichen Niveaus können jedoch in Abhängigkeit des verwendeten Labors und der Erfahrung des Arztes variieren. Das Risiko einer Hyperstimulation nimmt mit höheren Estradiolniveaus zu. Wenn das Serum-Estradiol 2000 pg/mL übersteigt, sollte das hCG im Allgemeinen mit großer Vorsicht verabreicht oder vorenthalten werden, um der Follikeln zu ermöglichen, sich zurückzuentwickeln. In einem hypogonadotropischen Hypogonadismus beträgt das Risiko einer schweren Hyperstimulation bei Werten, die 2400 pg/mL übersteigen, 5% in Schwangerschaftszyklen und 1% in Nichtschwangerschaftszyklen. Da eine Hyperstimulation mit der Anzahl vorhandener Follikel zu korrelieren neigt, kann darüber hinaus eine Entscheidung, das hCG vorzuenthalten, auch darauf gegründet werden, dass per Ultraschall 10 oder mehr sich entwickelnde Follikel gefunden werden.

[0063] Die folgenden Abhandlungen haben die weibliche Unfruchtbarkeit, die stimulierte Folliculogenese und die Ovulationsinduktion zum Thema: „Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology“, Bände 1 und 2; Herausgeber: E.Y. Adashi, J.A. Rock and Z. Rosenwaks; Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996 und „Female Infertility Therapy Current Practice“; Herausgeber: Z. Shoham, C.M. Howles und H.S. Jacobs; Martin Dunitz Ltd., London 1999.

[0064] Man glaubt, dass die vorrangigen Komplikationen, die einer Gonadotropininduzierten ovarialen Hyperstimulation zugeordnet werden, und daraus folgende Mehrfachschwangerschaften wahrscheinlich auf die anhaltenden Auswirkungen des hCG zurückzuführen sind. Ein Nutzen der Erfindung liegt darin, dass sie es ermöglicht, dem Wirt geringere Konzentrationen von LH oder CG zu verabreichen, als die Konzentrationen, die in bestehenden Ovulationsinduktions-Regimen verwendet werden, und dadurch die Wahrscheinlichkeit einer ovarialen Hyperstimulation zu verringern und in der Folge die nachteiligen Auswirkungen, die mit diesem Zustand einhergehen – Mehrfachschwangerschaften, geringes Gewicht der Neugeborenen und gesundheitliche Komplikationen für die Mutter – zu verhindern.

[0065] Es ist zu erwähnen, dass die Verabreichung von nichtpolypeptiden cAMP-Niveaumodulatoren keine therapeutischen Auswirkungen auf die follikuläre Reifung und Entwicklung während des Ovulatorischen Zyklus haben.

[0066] Somit betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung des ersten Aspekts. Nichtpolypeptide cAMP-Niveaumodulatoren bewirken, direkt oder indirekt, einen Anstieg intrazellulärer cAMP-Niveaus. Solche Verbindungen können die cAMP-Niveaus steigern, indem sie die cAMP-Synthese stimulieren, oder indem sie deren Abbau hemmen, oder beides. Zu Beispielen von Modulatoren, welche die Synthese von cAMP stimulieren, zählen Aktivatoren von Adenylcyclase, wie etwa Forskolin. Zu Beispielen von Modulatoren, welche den Abbau von cAMP verringern, zählen Hemmer von Phosphodiesterasen, wie etwa Theophyllin. Zu nichtpolypeptiden cAMP-Niveaumodulatoren zählen Phosphodiesterase-Hemmer, insbesondere Hemmer der Phosphodiesterase-4-Isoformen.

[0067] Die Erfindung ist auch deshalb nützlich, da sie die Stimulation der follikulären Entwicklung vor der Verabreichung des nichtpolypeptiden cAMP-Niveaumodulators, wie in den Ansprüchen definiert, ermöglicht, um die Ovulation einzuleiten, wobei dies das Verabreichen eines Wirkstoffs beinhaltet, welcher die Konzentrationen an follikelstimulierenden Hormon (FSH) während der follikulären Phase des Ovulationszyklus des Wirts stimuliert. Diese Wirkstoffe sind in den Ansprüchen definiert. Somit wird geltend gemacht, dass die Verabreichung der hierin beschriebenen Wirkstoffe in einer auf das Wachstum und die Reifung der Follikel bezogenen vorgeschriebenen zeitlichen Abstimmung die Vorgänge der Ovulation und der darauffolgenden Fertilisation, die stattfinden müssen, damit eine Empfängnis eintritt, verbessern.

[0068] Es ist zu erwähnen, dass die vorliegende Erfindung, wenn der nichtpolypeptide cAMP-Niveau-

modulator, wie in den Ansprüchen definiert, alleine ohne einer gleichzeitigen Verabreichung von hCG verabreicht wird, die Möglichkeit für ein früheres diagnostisches Testen der Schwangerschaft bietet, als dies mit derzeitigen Ovulationsinduktions-Regime, welche die Verwendung von GC miteinbeziehen, möglich ist.

V. Phosphodiesterase-Hemmer

[0069] Die in der Erfindung verwendeten Phosphodiesterase-Hemmer sind Ariflo® (SmithKline Beecham) und Cilomilast (SmithKline Beecham).

[0070] In einer Ausführungsform sieht die Erfindung die Verwendung dieses ersten Aspekts vor, um die Ovulation auszulösen, nachdem das follikuläre Wachstum und die follikuläre Reifung mit FSH, Letrozol (Novartis), Anastrozol (AstraZeneca) oder Fadrozole (Novartis) induziert wurde. In einem Regime für unterstützte reproduktive Technologien (ART) bei dem es erwünscht ist, mehrere Oozyten für die In-Vitro-Fertilisation zu erhalten, wird Patienten ein Aromatasehemmer (z. B. 2.5–5 mg/Tag Letrozol oder Anastrozol) von etwa Tag 3 an bis etwa Tag 7, oder von etwa Tag 3 bis etwa Tag 8 des Menstruationszyklus, zusammen mit 50–225, bevorzugt 50–150 IU FSH/Tag, beginnen mit etwa Tag 3 bis Tag 7 des Menstruationszyklus verabreicht, wobei die FSH-Gabe fortgesetzt wird, bis es zumindest zwei führende Follikel gibt, welche einen mittleren Durchmesser aufweisen der größer ist als 16 mm oder etwa 16 mm groß ist. An diesem Punkt wird der PDE-Hemmer, wie in den Ansprüchen definiert, in einer Dosierung verabreicht, die ausreicht, um die Ovulation auszulösen.

[0071] Optional kann der Aromatasehemmer als alleiniger das Follikelwachstum stimulierende Wirkstoff verwendet werden (d. h. in Abwesenheit von FSH), indem eine höhere Dosis des Aromatasehemmers verwendet wird, (z. B. 2–10 mg/Tag Letrozol oder Anastrozol) und/oder indem die Verabreichung verlängert wurde (z. B. Tage 3 bis 8, 3 bis 9, oder 3 bis 10). Wenn durch Sonographie die follikuläre Reife als ausreichende erachtet wird, wird eine die Ovulation auslösende Dosis des PDE-Hemmers, wie in den Ansprüchen definiert, verabreicht. Diese Regime erlaubt es, mehrere Oozyten einzusammeln, während Injektionen vermieden werden, da alle verwendeten Wirkstoffe oral verfügbar sind.

[0072] Bei der Induktion der Ovulation ist es wünschenswert, die Freisetzung von nur einem Ovum zu bewirken. Dies kann erfindungsgemäß erzielt werden, indem FSH verwendet wird, um Follikelwachstum und -reifung zu stimulieren, und darauf folgend der in den Ansprüchen definierte PDE-Hemmer verabreicht wird, um die Ovulation auszulösen. Im Schutzbereich der Erfindung sind auch Ovulationsinduktions-Regime enthalten, bei welchen das Follikel-

wachstum und die Follikelreifung mit einem Substitut für FSH induziert wird, beispielsweise einem Aromatasehemmer, wie in den Ansprüchen definiert.

[0073] In einem bevorzugten Regime für die Ovulationsinduktion wird einem Patienten von etwa Tag 3 an bis etwa Tag 7, oder von etwa Tag 5 bis etwa Tag 9 des Menstruationszyklus eine Dosis eines Aromatasehemmers (z. B. 2.5–5 mg/Tag Letrozol oder Anastrozol) verabreicht (in Abwesenheit von FSH). Optional kann etwa bei Tag 3 oder Tag 4 des Menstruationszyklus eine Einzeldosis eines Aromatasehemmers verabreicht werden (z. B. 5–30 mg Letrozol oder Anastrozol, bevorzugt 10 oder 20 mg). Die Ovulation wird mit einer die Ovulation auslösenden Dosis des PDE-Hemmers, wie in den Ansprüchen definiert, ausgelöst. Dieses Regime sieht ein Ovulationsinduktions-Protokoll vor, welches ohne Injektionen auskommt.

VI. Pharmazeutische Zusammensetzungen.

[0074] Der nichtpolypeptid cAMP-Niveaumodulator, wie in den Ansprüchen definiert, und Wirkstoffe, welche die FSH-Konzentrationen in einem weiblichen Wirt erhöhen, wie in den Ansprüchen der Erfindung definiert (hierin auch als „aktive Verbindungen“ bezeichnet), können in pharmazeutische Zusammensetzungen eingebunden sein, die für eine Verabreichung geeignet sind. Solche Zusammensetzungen beinhalten typischer Weise die aktiven Verbindungen und einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Wie hierin verwendet soll der Ausdruck „pharmazeutisch verträglicher Träger“ irgendwelche und alle Lösungsmittel, Dispersionsmittel, Beschichtungen, antibakterielle und antifungale Wirkstoffe, isotonische und die Absorption verzögernde Wirkstoffe beinhalten, die mit einer pharmazeutischen Verabreichung vereinbar sind. Geeignete Träger sind in der jüngsten Ausgabe von „Remington's Pharmaceutical Sciences“, einem Standardwerk in dem Fachgebiet, beschrieben. Zu bevorzugten Beispielen solcher Träger oder Verdünnungsmittel zählen Wasser, Salzlösung, Ringer-Lösung, Dextroselösung, und 5% humanes Serumalbumin. Liposome und nichtwässrige Trägerstoffe, wie etwa Fettöle können auch verwendet werden. Die Verwendung solcher Medien und Wirkstoffe für pharmazeutische Wirkstoffe ist dem Fachmann wohlbekannt. Insofern wird die Verwendung aller herkömmlichen Medien in den Verbindungen in Betracht gezogen, ausgenommen, sie sind mit dem Wirkstoff unvereinbar. Es können auch Zusatz-Wirkstoffe in die Zusammensetzungen aufgenommen sein.

[0075] Eine pharmazeutische Zusammensetzung der Erfindung wird so formuliert, dass sie mit ihrer vorgesehenen Verabreichungsrouten vereinbar ist. Zu Beispielen von Verabreichungsrouten zählen parenterale, (z. B., intravenöse, intradermale, subkutane),

orale, inhalatorische, transdermale (topische), transmucosale, und rektale Verabreichung. Lösungen oder Suspensionen, die für eine parenterale, intradermale, oder subkutane Anwendung verwendet werden, können die folgenden Bestandteile aufweisen: ein steriles Verdünnungsmittel, wie etwa Wasser, für die Injektion, Salzlösung, Fettöle, Polyethylenglycole, Glycerin, Propylenglycol oder andere synthetische Lösungsmittel; Antibakterielle Wirkstoffe, wie etwa Benzylalkohol oder Methylparabene; Antioxidantien, wie etwa Ascorbinsäure oder Natriumbisulfit; Chelatbildner, wie etwa Ethylendiamintetraessigsäure; Puffer, wie etwa Acetate, Citrate oder Phosphate, und Wirkstoffe zum Einstellen der Tonizität, wie etwa Natriumchlorid oder Dextrose. Der pH-Wert kann mit Säuren oder Basen eingestellt werden, wie etwa Salzsäure oder Natriumhydroxid. Das parenterale Präparat kann in Ampullen, Einwegspritzen oder in Mehrwegampullen aus Glas oder Plastik eingeschlossen sein.

[0076] Zu pharmazeutischen Zusammensetzungen, die für eine Injektions-Verwendung geeignet sind, zählen sterile wässrige Lösungen (wenn wasserlöslich) oder Dispersionen und sterile Pulver für die Ad-hoc-Zubereitung von sterilen injizierbaren Lösungen oder Dispersionen. Für die intravenöse Verabreichung zählen zu geeigneten Trägerstoffen physiologische Salzlösung, bacteriostatisches Wasser, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) oder phosphatgepufferte Salzlösung (PBS). In allen Fällen muss die Zusammensetzung steril sein, und sie sollte in dem Ausmaß flüssig sein, dass sie leicht für die Verwendung mit Spritzen geeignet ist. Sie muss unter Herstellungs- und Lagerbedingungen stabil sein, und muss gegen die kontaminierende Wirkung von Mikroorganismen, wie etwa Bakterien und Pilzen geschützt sein. Der Trägerstoff kann ein Lösungsmittel oder ein Dispersionsmedium sein, welches beispielsweise Wasser, Ethanol, Polyol (zum Beispiel, Glycerin, Propylenglycol, und flüssiges Polyethylenglycol, und dergleichen), und geeignete Mischungen davon enthält. Die passende Fluidität kann beispielsweise durch die Verwendung einer Beschichtung, wie etwa Lecithin, durch die Aufrechterhaltung der erforderlichen Partikelgröße im Falle von Dispersionen und durch die Verwendung oberflächenaktiver Stoffe aufrechterhalten werden. Die Verhinderung der Wirkung von Mikroorganismen kann durch verschiedene antibakterielle und antifungale Wirkstoffe erzielt werden, beispielsweise Parabene, Chlorobutanol, Phenol, Ascorbinsäure, Thimerosal. In vielen Fällen wird es bevorzugt sein, isotonische Wirkstoffe, zum Beispiel Zucker, Polyalkohole, wie etwa Mannitol, Sorbitol, Natriumchlorid, in die Zusammensetzung miteinzubeziehen. Eine verlängerte Absorption der injizierbaren Zusammensetzungen kann bewerkstelligt werden, indem die Zusammensetzung einen Wirkstoff enthält, welcher die Absorption verzögert, zum Beispiel Aluminiummonostearat und Gelatin.

[0077] Sterile injizierbare Lösungen können bereitgestellt werden, indem die Wirksubstanz in der erforderlichen Menge, nach Erfordernis mit oder ohne einer Zusammensetzung der oben aufgezählten Inhaltsstoffe, in ein passendes Lösungsmittel eingebracht wird, gefolgt von einer Sterifiltration. Im Allgemeinen werden Dispersionen zubereitet, indem die Wirksubstanz in einen sterilen Trägerstoff eingebracht wird, welcher als Basis ein Dispersionsmedium und die erforderlichen anderen Inhaltsstoffe, die aus den oben aufgezählten ausgewählt sind, enthält. Im Falle steriler Pulver für die Zubereitung der sterilen injizierbaren Lösungen, sind die Verfahren zur Herstellung des Vakuumtrocknen und Gefriertrocknen, wodurch ein Pulver der aktiven Inhaltsstoffe plus den zusätzlich gewünschten Inhaltsstoffen aus einer zuvor sterilfiltrierten Lösung davon erhalten wird.

[0078] Orale Zusammensetzungen enthalten im Allgemeinen ein inertes Verdünnungsmittel oder einen essbaren Trägerstoff. Sie können in Gelatinkapseln eingeschlossen oder in Tabletten gepresst sein. Zum Zwecke der oralen therapeutischen Verabreichung kann die Wirksubstanz mit Hilfsstoffen eingegliedert sein, und in Form von Tabletten, Pastillen oder Kapseln verwendet werden. Orale Zusammensetzungen können auch unter Verwendung eines flüssigen Trägerstoffes zur Verwendung als Mundwasser zubereitet sein, wobei die Zusammensetzung in dem flüssigen Trägerstoff oral angewendet wird, und gespült/gegurgelt und dann ausgespiesen oder geschluckt wird. Pharmazeutisch verträgliche Bindemittel und/oder Hilfsstoffe können als Teil der Zusammensetzung enthalten sein. Die Tabletten, Pillen, Kapseln und Pastillen können irgendwelche der folgenden Inhaltsstoffe, oder Verbindungen mit ähnlichen Eigenschaften aufweisen: ein Bindemittel, wie etwa mikrokristalline Cellulose, Tragantgummi oder Gelatine; einen Hilfsstoff, wie etwa Stärke oder Laktose, ein Sprengmittel, wie etwa Algisäure, Primogel, oder Maisstärke; ein Schmiermittel, wie etwa Magnesiumstearat oder Sterotes; ein Gleitmittel, wie etwa colloidal Siliziumdioxid; ein Süßstoff, wie etwa Saccharose oder Saccharin; oder ein Geschmacksstoff, wie etwa Pfefferminz, Methylsalicylat, oder Orangenaroma.

[0079] Für eine Verabreichung per Inhalation werden die Verbindungen in Form eines Aerosolsprays von einem Druckbehälter oder einer Abgabeeinheit, welche(r) ein geeignetes Treibmittel enthält, z. B. ein Gas, wie etwa Kohlendioxid, oder einem Zerstäuber abgegeben.

[0080] Eine systemische Verabreichung kann auch mit transmucosalen oder transdermalen Mitteln durchgeführt werden. Für eine transmucosale oder transdermale Verabreichung, werden zu der zu durchdringenden Barriere passende Durchdringungsmittel in der Formulierung verwendet. Solche

Durchdringungsmittel sind im Fachgebiet allgemein bekannt, und für eine transmucosale Verabreichung zählen dazu beispielsweise Detergentien, Gallensalze und Fusidinsäurederivate. Eine transmucosale Verabreichung kann durch Verwendung von Nasensprays oder Zäpfchen erzielt werden. Für eine transdermale Verabreichung werden die Verbindungen in Salben, Pasten, Gels oder Cremen formuliert, wie im Fachgebiet allgemein bekannt ist.

[0081] Die bevorzugte Verabreichungsrouten für nichtpolypeptidische cAMP-Niveau-Modulatoren, wie in den Ansprüchen definiert, als auch für Clomiphen, Selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren, Aromatasehemmer und Hemmer von steroidogenen Enzymen, wie in den Ansprüchen definiert, ist eine orale Verabreichung. Diese Wirkstoffe können auch subkutan durch Injektion, intravenös oder trans-vaginal (für eine lokale Verabreichung) verabreicht werden. Die bevorzugte Verabreichungsrouten von FSH, LH oder hCG ist eine subkutane Injektion, es ist jedoch auch eine intravenöse Verabreichung möglich.

[0082] Die Verbindungen können auch in Form von Suppositorien hergestellt werden (z. B. mit herkömmlichen Zäpfchen-Grundstoffen, wie etwa Kakaobutter und anderen Glyceriden), oder als rektal oder vaginal verabreichte Bleibeklistiere.

[0083] Die aktiven Verbindungen können mit Trägerstoffen hergestellt sein, welche die Verbindung gegen eine schnelle Ausscheidung aus dem Körper schützen, wie etwa Formulierungen für eine gesteuerte Freisetzung, einschließlich Implantaten und Mikroinkapselungs-Freisetzungssystemen. Es können biologisch abbaubare, biokompatible Polymere, wie etwa Ethylenvinylacetat, Polyanhydride, Polyglycolidsäure, Kollagen, Polyorthoester, und Polylactidsäure verwendet werden. Dem Fachmann werden Verfahren zur Herstellung solcher Formulierungen bekannt sein. Die Materialien können auch kommerziell von Alza Corporation und Nova Pharmaceuticals, Inc. bezogen werden.

[0084] Verbindungen der Erfindung können, wie oben erörtert, entweder alleine oder in Kombination mit einem oder mehreren anderen therapeutischen Wirkstoffen als eine pharmazeutische Zusammensetzung in einer Mischung mit herkömmlichen Hilfsstoffen verwendet werden, d. h. pharmazeutisch verträgliche organische oder anorganische Trägerstoffe, die für eine orale, parenterale, enterale oder topische Anwendung geeignet sind, die mit den aktiven Zusammensetzungen nicht schädigend reagieren, und die für ihren Empfänger nicht schädlich sind. Zu geeigneten pharmazeutisch verträglichen Trägern zählen Wasser, Salzlösungen, Alkohol, Pflanzenöle, Polyethylenglycole, Gelatin, Laktose, Amylose, Magnesiumstearat, Talkum, Kieselsäure, viskoses Paraffin, Duftöl, Fettsäure-Monoglyceride und -diglyceride,

petroetherische Fettsäureester, Hydroxymethylcellulose, Polyvinylpyrrolidon, etc. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können sterilisiert, und wenn gewünscht mit Hilfsstoffen, die mit den aktiven Zusammensetzungen nicht schädigend reagieren, vermischt werden, z. B. Schmierstoffen, Konservierungsmitteln, Stabilisatoren, Benetzungsmitteln, Emulgatoren, Salzen zur Beeinflussung des osmotischen Drucks, Puffer, Farbstoffen, Geschmacks- und/oder Aromastoffen.

[0085] Für die Einfachheit der Verabreichung und eine Einheitlichkeit der Dosierung ist es besonders vorteilhaft, orale und parenterale Zusammensetzungen in einer Dosierungseinheitsform zu formulieren. Dosierungseinheitsform bedeutet, wie hierin verwendet, physikalisch getrennte Einheiten, die sich als einheitliche Dosierungen für das zu behandelnde Subjekt eignen; Jede Einheit enthält eine vorbestimmte Menge des Wirkstoffs, die berechnet ist, um in Verbindung mit dem erforderlichen pharmazeutischen Träger den erwünschten therapeutischen Effekt zu erzeugen. Genauen Vorgaben für die Dosierungseinheitsformen der Erfindung werden von den einzigartigen Charakteristiken des Wirkstoffs, von dem bestimmten therapeutischen Effekt, der erzielt werden soll, und von den Einschränkungen, die in der Technik der Zubereitung solcher aktiven Zusammensetzung für die Behandlung von Individuen liegen, bestimmt und sind direkt davon abhängig.

[0086] Es wird zu erkennen sein, dass die tatsächlich bevorzugten Mengen der aktiven Zusammensetzungen, die in einer bestimmten Therapie verwendet wird, gemäß den spezifischen Verbindungen, die verwendet werden, den jeweiligen formulierten Zusammensetzungen, der Anwendungsform, der bestimmten Verabreichungsstelle, etc. variieren wird. Optimale Verabreichungsraten für ein vorgegebenes Verabreichungsprotokoll können von Fachleuten unter Verwendung herkömmlicher Dosierungsbestimmungstests, die gemäß den obigen Richtlinien durchgeführt werden, leicht ermittelt werden. Siehe auch „Remington's Pharmaceutical Sciences". Im Allgemeinen wird eine geeignete wirksame Dosis von einer oder mehreren Verbindungen der Erfindung, insbesondere wenn die wirksamere(n) Verbindung(en) der Erfindung verwendet wird (werden), im Bereich von 0,01 bis 100 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers pro Tag liegen, vorzugsweise im Bereich von 0,01 bis 20 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers pro Tag, noch bevorzugter im Bereich von 0,05 bis 4 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers pro Tag. Die gewünschte Dosis wird entsprechend einmal täglich, oder in mehreren Teildosierungen verabreicht, z. B. werden 2 bis 4 Teildosierungen mit passenden Intervallen über den Tag, oder nach einem anderen angemessenen Zeitplan verabreicht. Solche Teildosierungen können als Dosierungsein-

heitsformen verabreicht werden, z. B. indem sie von 0,05 bis 10 Milligramm der Verbindung(en) der Erfindung pro Dosierungseinheit enthalten.

[0087] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können zusammen mit den Anweisungen für die Verabreichung in einem Behälter, einer Packung oder einem Spender enthalten sein. Die folgenden Beispiele dienen der Verdeutlichung der Erfindung und/oder dem Vergleich.

VII. Erläuternde Beispiele:

[0088] Es wurden ein in-vivo-Ovulationsmodell entwickelt, in welchem FSH an unausgereifte Ratten bid × 2 oder 3 Tage verabreicht wurde, um eine follikuläre Reifung zu induzieren, gefolgt von einer einzelnen ovulatorischen Dosis hCG. Eine einzelne Injektion nicht-polypeptider cAMP-Niveaumodulatoren (z. B.: Verbindung 1, Verbindung 2, etc.) welche zusammen mit einer subovulatorischen Dosis von hCG oder alleine verabreicht wurde, führte zu einer Induktion der Ovulation. Diese Ergebnisse sind mit einem Modell konsistent, in welchem erhöhte cAMP-Niveaus hCG steigern oder substituieren, nicht jedoch FSH. Die Rolle des FSH in jedem Ovulationsinduktions-Regime ist es, die follikuläre Entwicklung und Reifung zu fördern, nicht die Ovulationsinduktion.

[0089] Im Folgenden werden die Verbindungen der Beispiele 1 bis 9 ausgewiesen:

Verbindung 1 ist Cis-4-cyano-4-(3-(cyclopentyl-ox)-4-methoxyphenyl)cyclohexan-1-Carboxylsäure; Verbindung 2 ist 3-(Cyclopentyl-ox)-N-(3,5-dichloropyridin-4-yl)-4-methoxybenzamid; Verbindung 3 ist 2-(4-(6,7-Diethoxy-2,3-bis(hydroxymethyl)naphthalen-1-yl)pyridin-2-yl)-4-(3-pyridyl)phthalazin-1(2H)-one-Hydrochlorid; und Verbindung 4 ist 7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidinopiperidin. Die Verbindungen 2, 3 und 4 dienen dem Vergleich. Die Beispiele 5, 6, 7, 8 und 9 sind Vergleichsbeispiele.

Beispiel 1: Auswirkung der Verbindungen 1 und Verbindungen 2 auf die cAMP-Niveaus ovarialer Granulosazellen von Ratten, alleine oder mit Gonadotropinen in vitro.

[0090] Von unausgereiften, 25 Tage alten, mit Diethylstilbesterol behandelten Sprague-Dawley-Ratten, an denen eine Hypophysektomie durchgeführt worden war, wurden die Ovarien entfernt. Die Ovarien wurden wiederholt mit 27 Gauge Nadeln punktiert, um Granulosazellen von den Follikeln herauszulösen. Die Zellen wurden gewaschen und in McCoy's 5A Medium + 0.1% BSA + 2 µM Androstendion resuspendiert. Entwicklungsfähige Zellen in einer Anzahl von 100.000 wurden in einem Volumen von 1,0 ml (mit der Verbindung 1 und Verbindung 2 bei einer Konzentration von 25 Mikromolar, entweder alleine

oder zusammen mit einer niedrigen, 0.1 pM, Dosis Gonadotropin) in 6-Kammer-Zellkulturschalen geladen. Die Platten wurden in einem 37°C Inkubator bei 100% Luftfeuchtigkeit, 5.0% CO₂ für 48 Stunden inkubiert. Die konditionierten Medien wurden in einem für cAMP spezifischen RIA untersucht. Die Ergebnisse werden als Mittelwert plus oder minus den Standardabweichungen ausgedrückt. Wie in [Fig. 2](#) zu sehen ist, verursachen die Verbindungen 1 und 2 bei Vorhandensein von subeffektiven Konzentrationen von Gonadotropin einen erheblichen Anstieg der cAMP-Niveaus.

Beispiel 2: Auswirkung der PDE-Hemmer-Verbindung 1 auf die follikuläre Reifung in vivo.

[0091] Reife ovariale Follikel wurden in unreifen weiblichen Ratten durch Behandlung mit einer suboptimalen Dosis FSH (1.08 IU/Ratte/Injektion; bid × 3 Tage) mit und ohne gemeinsamer Verabreichung von Verbindung 1 (0.1, 1, 10, und 50 mg/kg/Injektion: bid × 3 Tage) erzeugt. Mit der letzten FSH-Injektion wurde eine einzelne Injektion einer ovulatorischen Dosis von hCG (20 IU) verabreicht. Die PDE-Hemmer wurden in Verbindung mit sub-optimalen Dosen von FSH verabreicht. Alle Injektionen wurden subkutan verabreicht. Eine Ovulationsbestimmung wurde 18 Stunden nach der hCG-Verabreichung durchgeführt, indem Oozyten im Eileiter gezählt wurden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert plus oder minus der Standardabweichungen ausgedrückt. Wie in [Fig. 3](#) zu sehen ist, repräsentieren die Daten die durchschnittliche Anzahl von Oozyten in den Eileitern aller Ratten in jeder Gruppe und die Häufigkeit der ovulierenden Ratten. Wie in [Fig. 3](#) ebenfalls festgehalten ist, hemmte ein mit 50 mg/kg verabreichter PDE-Hemmer (Verbindung 1) alle Ovulationen (anstatt sie zu stimulieren). Die Ergebnisse zeigen, dass erhöhte Dosen eines PDE-Hemmers dabei fehlschlagen, die Fähigkeit einer suboptimalen Dosis von FSH zu verstärken, ein Follikel darauf vorzubereiten, zu ovulieren.

Beispiel 3 : Auswirkung der PDE-Hemmer-Verbindung 1 auf die Ovulation, in der Gegenwart einer subeffektiven Dosis hCG in vivo.

[0092] Ausgereifte ovariale Follikel, die in unausgereiften weiblichen Ratten durch Behandlung mit einer wirksamen Dosis FSH (2.16 IU/Ratte/Injektion; bid × 2 Tage) erzeugt wurden, wurden mit einer einzelnen Injektion von hCG zum Ovulieren induziert. hCG wurde in einer subeffektiven Dosis (3 IU) mit oder ohne einer einzelnen Injektion von Verbindung 1 (50, 10 und 1 mg/kg) zur Zeit der letzten FSH-Injektion verabreicht. Die Ovulation wurde 18 Stunden nach der Verabreichung von hCG bestimmt, indem die Anzahl der Ova im Eileiter gezählt wurde. Wie in [Fig. 4](#) zu sehen ist, führte eine einzelne Injektion von Verbindung 1, die gleichzeitig mit einer subovulatorischen

Dosis von hCG verabreicht wurde, zu einer Induktion der Ovulation. Alle Injektionen wurden subkutan durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert plus oder minus der Standardabweichung ausgedrückt. Diese Daten zeigen, dass ein nicht-polypeptider cAMP-Niveau-Modulator, in diesem Fall ein PDE-Hemmer, die hCG-stimulierte Ovulation steigert, wenn eine suboptimale Dosis von hCG verabreicht wird. Es sind die Auswirkungen der Verbindung 1, einem bekannten PDE-Hemmer, dargestellt.

Beispiel 4: Auswirkung der PDE-Hemmer-Verbindung 1 auf die Ovulation in Gegenwart oder Abwesenheit einer subeffektiven Dosis von hCG in vivo.

[0093] Nach einer FSH-induzierten follikulären Reifung (2.16 IU/Ratte/Injektion; bid × 2 Tage) wurde die Verbindung 1 mit und ohne einer sub-effektiven Dosis von hCG injiziert. Die Ovulation wurde 18 Stunden nach der Verabreichung von hCG/Verbindung 1 durch Zählen der Oozyten im Eileiter ermittelt. Die Daten zeigen die durchschnittliche Anzahl von Oozyten im Eileiter aller Ratten in jeder Gruppe, und die Häufigkeit ovulierender Ratten. Wie in [Fig. 5](#) zu sehen ist, führte eine einzelne Injektion von Verbindung 1, die alleine, ohne eine subovulatorische Dosis von hCG verabreicht wurde, zu einer Induktion der Ovulation in FSH-vorbehandelten Ratten. Die Ergebnisse sind als Mittelwert plus oder minus der Standardabweichung ausgedrückt. Diese Daten zeigen, dass ein nicht-polypeptider cAMP-Niveau-Modulator, in diesem Fall ein PDE-Hemmer, Verbindung 1, in der Lage ist, die Ovulation in Abwesenheit jeglichen injizierten hCG zu induzieren. Vorherige Experimente, und die hierin dargestellten, zeigten, dass Follikel, welche mit diesen Dosen von FSH vorbereitet sind, nicht spontan ovulieren, sondern eine nachfolgende Verabreichung von hCG benötigen.

Beispiel 5: Auswirkung der PDE-Hemmer-Verbindung 2 auf die Ovulation in Gegenwart oder Abwesenheit einer subeffektiven Dosis von hCG in vivo.

[0094] Nach einer FSH-induzierten follikulären Reifung (2.16 IU/Ratte/Injektion; bid × 2 Tage) wurde die Verbindung 2 mit und ohne einer sub-effektiven Dosis von hCG injiziert. Die Ovulation wurde 18 Stunden nach der Verabreichung von hCG/Verbindung 2 durch Zählen der Oozyten im Eileiter ermittelt. Die Daten zeigen die durchschnittliche Anzahl von Oozyten im Eileiter aller Ratten in jeder Gruppe, und die Häufigkeit ovulierender Ratten. Die Ergebnisse sind als Mittelwert plus oder minus der Standardabweichung ausgedrückt. Wie in [Fig. 6](#) zu sehen ist, führte eine einzelne Injektion von Verbindung 2, die alleine, ohne eine subovulatorische Dosis von hCG verabreicht wurde, zu einer Induktion der Ovulation in FSH-vorbehandelten Ratten. Diese Daten zeigen, dass ein nicht-polypeptider cAMP-Niveau-Modulator, in diesem Fall ein PDE-Hemmer, Verbindung 2, in der

Lage ist, die Ovulation in Abwesenheit jeglichen injizierten hCG zu induzieren.

Beispiel 6: Auswirkung der PDE-Hemmer-Verbindung 2 auf die Ovulation in vivo infolge einer oralen und einer subkutanen Verabreichung.

[0095] Nach einer FSH-induzierten follikulären Reifung (2.16 IU/Ratte/Injektion; bid × 2 Tage) wurde die Verbindung 2 entweder subkutan (subkutis) injiziert oder durch orale Sondenfütterung verabreicht. Die Ovulation wurde 18 Stunden nach der Verabreichung von Verbindung 2 durch Zählen der Oozyten im Eileiter ermittelt. Die Daten zeigen die durchschnittliche Anzahl von Oozyten im Eileiter aller Ratten in jeder Gruppe, und die Häufigkeit ovulierender Ratten. Die Ergebnisse sind als Mittelwert plus oder minus der Standardabweichung ausgedrückt. Wie in [Fig. 7](#) zu sehen ist, führte die Verabreichung von Verbindung 2 entweder auf subkutanem oder oralem Weg zu einer Induktion der Ovulation in FSH-vorbehandelten Ratten. Diese Daten zeigen, dass ein nicht-polypeptider cAMP-Niveau-Modulator, in diesem Fall ein PDE-Hemmer, Verbindung 2, in der Lage ist, die Ovulation zu induzieren, wenn er oral verabreicht wird.

Beispiel 7: Auswirkung der PDE-Hemmer-Verbindung 3 auf die Ovulation in vivo infolge einer oralen und subkutanen Verabreichung.

[0096] Nach einer FSH-induzierten follikulären Reifung (2.16 IU/Ratte/Injektion; bid × 2 Tage) wurde die Verbindung 3 entweder subkutan (subkutis) injiziert oder durch orale Sondenfütterung verabreicht. Die Ovulation wurde 18 Stunden nach der Verabreichung von Verbindung 3 durch Zählen der Oozyten im Eileiter ermittelt. Die Daten zeigen die durchschnittliche Anzahl von Oozyten im Eileiter aller Ratten in jeder Gruppe, und die Häufigkeit ovulierender Ratten. Die Ergebnisse sind als Mittelwert plus oder minus der Standardabweichung ausgedrückt. Wie in [Fig. 8](#) zu sehen ist, führte die Verabreichung von Verbindung 3 entweder auf subkutanem oder oralem Weg zu einer Induktion der Ovulation in FSH-vorbehandelten Ratten. Diese Daten zeigen, dass ein nicht-polypeptider cAMP-Niveau-Modulator, in diesem Fall ein PDE-Hemmer, Verbindung 3, in der Lage ist, die Ovulation zu induzieren, wenn er oral verabreicht wird.

Beispiel 8: Auswirkung der PDE-Hemmer-Verbindung 4 auf die Ovulation in Gegenwart oder Abwesenheit einer subeffektiven Dosis von hCG in vivo.

[0097] Nach einer FSH-induzierten follikulären Reifung (2.16 IU/Ratte/Injektion; bid × 2 Tage) wurde die Verbindung 4 mit und ohne einer sub-effektiven Dosis von hCG subkutan injiziert. Die Ovulation wurde 18 Stunden nach der Verabreichung von hCG/Verbindung 4 durch Zählen der Oozyten im Eileiter ermittelt. Die Daten zeigen die durchschnittliche Anzahl von

Oozyten im Eileiter aller Ratten in jeder Gruppe, und die Häufigkeit ovulierender Ratten. Wie in [Fig. 9](#) zu sehen ist, führte eine einzelne Injektion von Verbindung 4, die mit einer subovulatorischen Dosis von hCG verabreicht wurde, zu einer Induktion der Ovulation in FSH-vorbehandelten Ratten. Wenn sie alleine verabreicht wurde, induzierte die Verbindung 4 keine, oder nur eine geringe Ovulation. Die Ergebnisse sind als Mittelwert plus oder minus der Standardabweichung ausgedrückt. Diese Daten zeigen, dass ein nicht-polypeptider cAMP-Niveau-Modulator, in diesem Fall ein PDE-Hemmer, Verbindung 4, der nicht ausreicht, um eine Ovulation alleine zu induzieren, in der Lage ist, die Ovulation in der Gegenwart einer sub-effektiven Dosis von hCG zu induzieren.

Beispiel 9: Auswirkung der PDE-Hemmer-Verbindung 2 auf die Ovulation und die Fruchtbarkeit.

[0098] In unausgereiften Ratten wurde eine folliculäre Reifung mit FSH (4.33 IU/Ratte/Injektion; bid × 2 Tage) und Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) (1.5 IU/Ratte/Injektion; bid × 2 Tage) induziert. Von dieser Kombination wurde zuvor herausgefunden, dass sie eine folliculäre Reifung induziert, und das Paarungsverhalten fördert, während sie, in Abwesenheit einer zusätzlichen Injektion von hCG, eine geringe Rate spontaner Ovulationen aufrechterhält. Mit FSH und PMSG induzierte Ratten wurden dann durch subkutane Verabreichung entweder mit Verbindung 2 (12 Ratten) oder mit Trägerstoff (12 Ratten) behandelt. In einer Kohorte von Ratten (6 Ratten pro Behandlung) wurde 18 Stunden nach der Verabreichung von Verbindung 2 oder des Trägerstoffs die Ovulation durch Zählen der Oozyten im Eileiter ermittelt. Um die Fruchtbarkeit zu untersuchen, wurden die Ratten einer weiteren Kohorte (6 Ratten pro Behandlung) einzeln über Nacht mit je einer einzelnen erwachsenen männlichen Ratte, deren Fruchtbarkeit nachgewiesen war, in einem Käfig platziert. Am nächsten Tag wurden die männlichen Ratten entfernt und die weiblichen wurden bis zum Tag der Geburt pro Gruppe in einem gemeinsamen Käfig gesperrt. Die Anzahl lebender, reifgeborener Jungtiere wurde zum Zeitpunkt der Geburt aufgezeichnet. Wie in [Fig. 10](#) zu sehen ist, führte eine einzelne Injektion von Verbindung 2 zu einer Induktion der Ovulation in mit FSH/PMSG vorbehandelten Ratten. Zusätzlich hatten die mit Verbindung #2 behandelten Ratten zum Zeitpunkt der Geburt eine erhöhte Anzahl lebender Jungtiere. Die Ergebnisse sind sowohl für die Ovulation, als auch für die lebenden Jungtiere als Mittelwert plus oder minus der Standardabweichung ausgedrückt. Diese Daten zeigen, dass ein nicht-polypeptider cAMP-Niveau-Modulator, in diesem Fall ein PDE-Hemmer, Verbindung 2, die Ovulation von Oozyten induziert, welche in der Lage sind, in vivo fertilisiert zu werden.

Patentansprüche

1. Verwendung einer den Phosphodiesterase-Inhibitor cis-4-cyano-4-(3-cyclopentyloxy)-4-methoxyphenyl)cyclohexan-1-Carboxylsäure enthaltenden Zusammensetzung bei der Herstellung eines Medikaments zur Induzierung der Ovulation in einem weiblichen Wirt.

2. Verwendung einer den Phosphodiesterase-Inhibitor cis-4-cyano-4-(3-cyclopentyloxy)-4-methoxyphenyl)cyclohexan-1-Carboxylsäure enthaltenden Zusammensetzung bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Anovulationsleidens.

3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung zusätzlich humanes Choriongonadotropin oder Luteinisierungshormon enthält.

4. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Medikament eine Lösung, eine Tablette oder eine Kapsel ist.

5. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Medikament für die Verabreichung vor der lutealen Phase des Ovulationszyklus des Wirts bestimmt ist.

6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei das Medikament für die Verabreichung als Teil einer kombinierten Behandlung zur Stimulierung der Follikelentwicklung und Ovulation in einem weiblichen Wirt bestimmt ist, welche Verwendung die Verabreichung eines Wirkstoffes aufweist, welcher die Konzentrationen an Follikel stimulierendem Hormon in dem Wirt während der folliculären Phase des Ovulationszyklus des Wirt erhöht, wobei der genannte Wirkstoff ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: Follikel stimulierendem Hormon; Clomiphen; Tamoxifen; Raloxiphen; Toremifen; Droloxifen; Letrozol; Fadrozol; Anastrozol; Vorozol; Daidzein; Genistein; Biochanin A; und Formononetin.

7. Verwendung gemäß Anspruch 5, wobei die Zusammensetzung weiters Luteinisierungshormon enthält.

8. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die Zusammensetzung zusätzlich Choriongonadotropin enthält.

9. Verwendung gemäß Anspruch 7, wobei die Konzentration von Luteinisierungshormon im Vergleich zu bestehenden Verabreichungsschemata reduziert ist.

10. Verwendung gemäß Anspruch 8, wobei die Konzentration von Choriongonadotropin im Vergleich zu bestehenden Verabreichungsschemata reduziert ist.

11. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Medikament für die Verabreichung zu einem Zeitpunkt einer bestehenden Ovulation induzierenden Behandlung bestimmt ist, an welchem Chorion-Gonadotropin oder Luteinisierungshormon an den Wirt verabreicht wird.

12. Verwendung des Phosphodiesterase-Inhibitors cis-4-cyano-4-(3-cyclopentyloxy)-4-methoxyphenyl)cyclohexan-1-Carboxylsäure bei der Herstellung eines Medikaments, wobei das Medikament für die Verabreichung in einem zur Sammlung von Oocyten für die In Vitro Fertilisation dienenden Verfahren bestimmt ist.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Figur 1
Herkömmliches Protokoll



















