

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 158542 B

(33) Patentansøgning nr.: 5439/88

(2) Indleveringsdag 29 sep 1988

(3) Løbedag: 29 jan 1988

(41) Alm. tilgængelig: 30 sep 1988

(44) Fremlagt: 05 jun 1990

(36) International ansøgning nr.: PCT/DK88/00012

(86) International indleveringsdag: 29 jan 1988

(85) Videreførelsesdag: 30 sep 1988

(50) Prioritet: 30 jan 1987 DK 499/87

(51) Int.Cl.⁵

A 61 K 37/38

A 61 K 37/36

(71) Ansøger: *Nordisk Gentofte A/S; Niels Steensensvej 1; 2820 Gentofte, DK

(72) Opfinder: Howard S. *Jacobs; GB

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) **Middel til behandling af infertilitet hos højere pattedyr eller mennesker**

(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer. Endocrinology, vol 118, no. 4 (1986)
1401-1409 Römpfs Chemie Lexikon, 8.
udg. (1981) 1532

(57) Sammendrag:

5 4 3 9 - 8 2

En kombination af gonadotrophiner og væksthormon er egnet til behandling af infertilitet hos højere pattedyr og mennesker, idet sandsynligheden for graviditet derved øges. Ved behandlingen kan gonadotrophiner og væksthormon injiceres hver for sig, eller der kan anvendes et kombinationspræparat indeholdende begge aktive stoffer.

DK 158542 B

Den foreliggende opfindelse angår et middel til behandling af infertilitet hos højere pattedyr eller mennesker.

5 Højere pattedyr og mennesker af hunkøn fødes med et stort antal ægcelleanlæg. For kvinders vedkommende drejer det sig om ca. 200.000 ægceller i hvert ovarium. Efter fødslen går mange ægceller til grunde inden kønsmodningen, og der dannes ikke nye.

10 Æganlæggene ligger omgivet af en ring af epitelceller, såkaldte granulosaaceller. Ægcellen med de omgivende granulosaaceller kaldes folliklen.

15 Ovariefunktionen hos højere pattedyr og mennesker reguleres af pituitære kønshormoner, kaldet gonadotropiner. Disse omfatter det follikelstimulerende hormon (FSH), som bevirker follikelmodningen, og det luteiniserende hormon (LH), der forårsager ovulation eller ægløsning.

20 Ved hver menstruations begyndelse påvirkes ovarierne af FSH-hormonet, hvorved et antal follikler vokser, idet der dannes flere lag granulosaaceller, og folliklen omgives tillige af celler dannet ud fra det omgivende bindevæv, de såkaldte thecaceller.

25 Efterhånden tager én follikel føringen, og de andre går tilbage i udvikling. Modningen af denne ene follikel tager normalt 10-12 dage. Under hele follikelmodningen tillægger mængden af thecaceller også, og da det er i disse celler, østrogen dannes, vil en stigende udskillelse af østrogener være et resultat af og dermed et mål for follikelmodningen.

30 Omtrent midt i menstruationscyclus brister den modne follikel under påvirkning af hypofysens LH, og ægget stødes ud, ovulation. Ægget passerer derved ud i bughulen og opfanges af den ene æggeleder, hvorigennem ægget føres til

livmoderen.

Folliklen, som har udstødt ægget, omdannes til et nyt hormonproducerende organ, corpus luteum. I løbet af de følgende dage når corpus luteum sin fulde udvikling og
5 begynder at producere progesteron tillige med østrogen. Da progesteron kun produceres i corpus luteum, er påvisning af progesteron bevis for, at der er sket en ægløsning og dannet et corpus luteum.

10 Corpus luteum har en begrænset levetid på en halv snes dage. Herefter holder det meget hurtigt op med at fungere, og blodets indhold af østrogen og progesteron falder pludseligt. Dette fald medfører henfald af slimhinden
15 i livmoderen, og menstruation indtræder som regel 13-14 dage efter ovulationen.

Hypofysens produktion og frigørelse af FSH og LH styres dels fra hypothalamus (en del af hjernen beliggende lige
20 over hypofysen) ved frigørelse af det såkaldte gonadotropine releasing hormone (GnRH) og dels via en feed-back mekanisme betinget af østrogenproduktion i ovarierne.

Afgivelse og virkning af GnRH modificeres ved en såkaldt
25 "negativ feed-back mekanisme", idet der i takt med follikelmodningen sker en øget østrogenproduktion og dermed en forøgelse af blodets koncentration af østrogen. Den forhøjede østrogenkoncentration virker hæmmende (dvs. har en negativ effekt) på frigørelse af GnRH, hvilket igen
30 medfører nedsat sekretion af FSH og LH fra hypofysen. Tilsvarende bevirker lave østrogenkoncentrationer, at GnRH-sekretionen ikke hæmmes, og afgivelsen af GnRH fra hypothalamus vil stimulere frigørelsen af FSH og LH fra hypofysen.

Blandt årsagerne til infertilitet hos kvinder kan nævnes:

- 1) Unormal ovariefunktion (uregelmæssig cyclus etc.).
- 5 2) Nedsat hypothalamus-hypofysefunktion, dvs. hypofyseinsufficiens, som fører til ovulatorisk svigt (sekundær ovariesvigt).
- 10 3) Obstruktion (tilstoppelse, forsnævring etc.) af æggelederne (tuba).
- 15 4) Endometriosis (tilstedeværelse af membranmateriale af den type, som beklæder livmoderen andre steder i bækkenhulrummet).

15 Det er kendt at behandle infertilitet, som skyldes hypofyseinsufficiens, med injektioner af gonadotropiner, f.eks. FSH alene eller human menopausal gonadotropin (hMG), der består af en blanding af FSH og LH. Ved manglende 20 ægløsning gives i reglen først daglige injektioner med præparater, som har FSH-effekt, såsom menotropin, indtil et præovulatorisk østrogenniveau i urin eller plasma kan påvises. Derefter gives en eller to injektioner med choriogonadotropin, som har LH-effekt, hvilket 25 fører til ægløsning og dannelsen og funktionen af et corpus luteum.

30 Anvendelsen af ovennævnte gonadotropinpræparater er ikke nogen sikker behandlingsmetode for infertilitet, idet en stor procentdel behandlede kvinder ikke opnår graviditet. Endvidere er der en betydelig risiko forbundet med 35 handlingerne, fordi en virkning kun opnås med store doser, så der let sker en overstimulation, der kan føre til store ovariecyster, væske- eller blodansamlinger i bughulen og væskeansamling i brysthulen. Der er tillige risiko for flerfold graviditet (tvillinger, trillinger, firlinger etc.).

Det er kendt, at insulin og flere af vækstfaktorerne kan modificere nogle virkninger af gonadotropiner og granulosa-celler (reference 1). Ved disse undersøgelser blev granulosa-celler fra rotter og svin dyrket med FSH i serumfrie medier i nærvær af insulin, insulinlignende vækstfaktor-1 (IGF-1), transformerende vækstfaktor-beta (TGF-beta og epidermal vækstfaktor (EGF). Disse forsøg viste, at insulin og IGF-1 forøgede og EGF inhiberede disse virkninger af FSH. TGF-beta har vist sig at forøge granulosa-celle-aromatase-aktivitet (reference 2).

Ved en anden forsøgsserie (reference 3) er det vist, at behandling af ikke-kønsmodne rotter med væksthormon forøger den gonadotropinstimulerende differentiering af dyrkede ovarie-granulosaceller. Heraf kan dog ikke sluttes, at gonadotropin og væksthormon sammen afhjælper infertilitet hos højere pattedyr eller mennesker, der er kønsmodne.

Den foreliggende opfindelse er baseret på den overraskende opdagelse, at væksthormoner har en synergistisk virkning på gonadotropin til stimulering af ovarie-funktionen hos udvoksede kønsmodne individer og derved afhjælper infertilitet.

Midlet ifølge opfindelsen er således ejendommeligt ved, at det består af eller indeholder gonadotropin FSH og LH og væksthormon i blanding eller som adskilte komponenter.

Som følge af den synergistiske virkning er det muligt at opnå et mere sikkert resultat, dvs. antallet af infertile kvinder, som bliver gravide efter en behandling, er procentvis forhøjet. Endvidere kan den nødvendige dosis af gonadotropiner nedsættes væsentligt, således at faren for overdosering elimineres eller reduceres stærkt.

Behandlingen kan udføres på infertile avlsdyr, såsom køer, svin, får og mink. Endvidere kan infertile kvinder behandles med det omhandlede middel, så ovariefunktionen normaliseres, og chancen for graviditet øges betydeligt.

5

Behandlingen kan udføres med separate injektioner af henholdsvis gonadotropiner og humant væksthormon fordelt i afpassede tidsintervaller. Den normale behandling med gonadotropiner består i daglige injektioner med et gonadotropin-præparat. Ved at supplere denne med injektion hver anden dag af humant væksthormon øges effekten betydeligt. Desuden kan man, ved en foretrukken udførelsesform for midlet ifølge opfindelsen, anvende et blandingopræparat af gonadotropin og væksthormon, idet dosistørrelsen af de enkelte komponenter afpasses individuelt. Mængden af gonadotropin holdes på et lavere niveau, så overdosering undgås, samtidig med at der opnås en optimal effekt.

20

Til gennemførelse af behandlingen benyttes hensigtsmæssigt et middel eller injektionspræparat, som indeholder gonadotropin og humant væksthormon i blanding eller som adskilte i komponenter i optimal eller individuelt afpassede mængder, fordelt i et fysiologisk acceptabelt bæremedium.

25

Det anvendte væksthormon bør være det for individet artsspecifikke væksthormon. Til kvinder benyttes derfor således humant væksthormon, hGH, der kan være biosyntetisk fremstillet.

30

Infertilitet blandt ægtepar anslås til at have en årlig hyppighed på 1,2 par for hver 1000 i befolkningen (reference 4). Af disse par er ca. 20% af infertilitetsproblemerne forårsaget af unormal gonadotropin-sekretion, som fører til ovulatorisk svigt (hypogonadotropisk hypogonadisme, sekundær ovarie-svigt).

35

Indikationen for den kombinerede behandling med gonadotropin og hGH er hypogonadotropisk hypogonadisme, resistent over for behandling med syntetiske lægemidler, der stimulerer ægløsning (såsom "Clomiphene"®), og hvor høje
5 doser af gonadotropiner er nødvendige for at udvikle modning af follikler og æg.

For patienter med normal gonadotropin-sekretion, men unormale ovarier (primær ovarie-svigt) forventes den
10 kombinerede behandling med gonadotropin og hGH ikke at medføre ægløsning. Derfor er primær ovarie-svigt ikke en indikation for denne type behandling.

Behandling med gonadotropininfertilitet og hGH kan udføres in vivo, hvor formålet er at opnå modning af en enkelt follikel og et æg (oocyte), idet den efterfølgende befrugtning af dette æg typisk finder sted på naturlig måde, dvs. i æggelejerne. Den ovennævnte behandling kan
15 også anvendes til befrugtning in vitro, hvor formålet er at opnå så mange modne follikler og æg som muligt. Dernæst bliver de bedst udseende æg udtaget (aspireret) fra patientens ovarier, og efterfølgende befrugtning af ægget finder sted i laboratoriet. Herefter placeres det befrugtede æg i patientens livmoder, hvor udviklingen af
20 ægget fortsætter.

Effekten af behandlingen med gonadotropin og hGH for hypogonadotropisk hypogonadisme illustreres i det efterfølgende ved hjælp af fire eksempler. De i alle fire tilfælde benyttede præparater var følgende:
30

Human menopausal gonadotropin (hMG) indeholdende menotropin svarende til 75 IU FSH og 75 IU LH pr. ampul.

35 Human chorionisk gonadotropin (hCG) indeholdende 5000 IU chorionisk gonadotropin pr. ampul.

Biosyntetisk human væksthormon (B-hGH) indeholdende 20 IU hCG pr. ampul.

EKSEMPEL 1

5

In vivo befrugtning

Patientens navn: JN

Alder 35 år

10 Medicinsk forhistorie: Menarche (første blødning) i en alder af 15 år. Regelmæssige menstruationer i 2 år, men sekundær amenorrhea (fravær af menstruationsblødninger) efter en alder af 17 år. Reagerede ikke over for Clomiphene og fik derefter behandling med hMG og hCG i
15 tolv cykler, hvorefter hun 5 år efter blev gravid og fødte. I de sidste 2 år blev hun behandlet med hMG med op til 80 ampuller hMG pr. cyclus uden reaktion (meget lavt østrogenniveau og ingen udvikling af follikler).

20 Første behandlingscyclus (uden B-hGH).

Daglige injektioner af stigende dosisstørrelser af hMG i 35 dage (ialt 60 ampuller) efterfulgt af injektion af 10.000 IU hCG til induktion af ægløsning. Ingen tilfreds-
25 stillende follikulær udvikling.

Anden behandlingscyclus: (med B-hGH)

30 Daglige injektioner med stigende doser af hMG i 21 dage (ialt 28 ampuller) efterfulgt af injektion af 10.000 IU hCG. I samme periode modtog patienten injektioner af B-hGH: 20 IU indgivet tre gange pr. uge (ialt 180 IU B-hGH). Otte veldefinerede follikler blev dannet.

35 Tredje behandlingscyclus: (med B-hGH). Behandlings-regime som ovenfor angivet. Ialt 23 ampuller hMG injiceret i løbet af 18 dage efterfulgt af 10.000 IU hCG. B-hGH: 150 IU

ialt. Dannelse af 9 veldefinerede follikler.

EKSEMPEL 2

5 In vivo befrugtning

Navn: P R

Alder 39 år

10 Medicinsk forhistorie: Primær amenorrhoea. Ingen reaktion
over for Clomiphene. Ingen reaktion over for LHRH (lutei-
niserende hormon frigivende hormon). Fik behandling med
hMG og hCG i ca. 1 år og behøvede 70-75 ampuller hMG pr.
cyclus.

15 Første behandlingscyclus: (uden B-hGH).

Under 29 dages injektion med ialt 70 ampuller hMG (efter-
fulgt af 10.000 IU hCG) til inducering af dannelse af
follikler.

20 Anden behandlingscyclus: (med B-hGH).
Varighed af behandling: 19 dage.

hMG: 35 ampuller

hCG: 10.000 IU.

25 B-hGH 120 IU

Resultater: Dannelse af 6 follikler.

Tredje behandlingscyclus: (med B-hGH)

Varighed af behandlingen: 12 dage

30 hMG: 29 ampuller

hCG: 10.000 IU

B-hGH: 100 IU

Resultat: Dannelse af 8 follikler.

35

EKSEMPEL 3In vitro befrugtning

- 5 Navn: LLC
Alder: 39 år
Medicinsk forhistorie: Menarche i en alder af 11. Uregel-
mæssig cyclus. For 20 år siden opstod spontan graviditet
og fødsel. De sidste få år fik hun clomiphene, gonadotro-
10 piner alene med LHRH-præparater og flere in vitro be-
frugtningsforsøg. Der var vanskeligheder ved at få gode
æg fra denne patient, og hun behøvede op til 160 ampuller
hMG for at få maksimalt 2 æg.
- 15 Marts 1987 behandlet med 33 ampuller hMG i 11 dage og 100
IU B-hGH. Dannelse af 10 æg, af hvilke 3 blev befrugtet.

EKSEMPEL 420 In vitro befrugtning

- Navn: SH.
Alder 38 år
Medicinsk forhistorie: I 1982 ektopisk graviditet (udvik-
25 ling af foster udenfor livmoderen), som blev behandlet
med operation af den højre æggeleder (salpingethomi). I
1983 kirurgi ved den venstre æggeleder. Diagnose 2 år
senere: Massiv pelvisk adhæsion. De sidste 2 års behand-
ling med Clomiphene og hMG og flere forsøg med befrugt-
30 ning in vitro.

- November 1986 behandlet med 20 ampuller hMG og buserelin
(=gonadotropin-frigivende hormon) samt B-hGH, hvilket re-
sulterede i dannelse af 3 æg, hvoraf 2 blev befrugtet. Et
35 af de befrugtede æg blev med held implanteret i livmode-
ren, således at patienten blev gravid.

Synergistisk effekt af biosyntetisk væksthormon (Norditrophin® og gonadotropin på rotter

Metoder:

5

Forsøgsdyr:

Hunrotter af racen Sprague-Dawley, stamme Clr: CD® (SD) BR blev indkøbt med en alder af 17-19 dage, 30-33 g bruttovægt fra Charles River WIGA GmbH, Sandhoferweg 7, D-8741, Sulzfeldt 1, BRD.

10

Rotterne blev akklimatiseret i 4 dage før anvendelsen ved 22 ± 2 °C, $55 \pm 10\%$ relativ fugtighed, luftudskiftning 10 gange pr. time og lys fra 6.30 til 18.30. Under akklimatiseringsperioden blev rotterne holdt sammen med deres mødre i rektangulære plastbure af typen Orth, 27 x 35 x 16 cm med træbund af typen Hahnflock H 3/4 fra Hahn og Co. Kronsburg, D-2371, Bredenbek, BRD. Dyrene havde fri adgang til altromin-diæt 1324 (fra Chr. Petersen A.S, DK 4100 Ringsted), samt drikkevand.

20

Der blev dannet 6 grupper à 8 rotter (hunner) pr. forsøg. Udtagelsen skete ved, at man fra 8 kuld, hvert bestående af 6 individer (kuldsøstre), udtog 1 kuld søstre ad gangen og tilfældigt fordelte disse med 1 individ på hver af de 6 grupper, indtil 6 grupper à 8 rotter var dannet.

25

Hypofysektomi:

Hypofysektomi blev udført efter akklimatisering, da rotterne var 21-23 dage gamle. Rotterne blev bedøvet med amylenhydrat (10% i 0,9% saltopløsning), 4-5 ml/kg bruttovægt i tilslutning til 4-5 ml/kg Briethal® (10 mg/ml 0,9% saltopløsning) intraperitonealt. Til hypofysektomi blev anvendt et specielt apparat, som er beskrevet af R. Illhardt (reference 5). Efter afskæring af den nederste del af ørene blev rotterne fikseret i apparatet for

35

transaurikulær hypofysektomi. En kanyle blev indført i hypofyseområdet, og hypofysen blev suget ud ved et vakuum på 200-400 mmHg. En bomuldstampon blev placeret i øret efter operationen, og postoperativt blev rotterne
5 behandlet med 2 daglige injektioner (i 2 dage) af Temgesic®.

Rotterne blev vejjet før hypofysektomi og 14 dage derefter (før anvendelsen i forsøgene) og kun dyr med en vægtfor-
10 øgelse mindre end 10 g og et vægttab mindre end 4 g og med godt helbred blev anvendt til forsøget.

Dosering:

15 Grupper på 8 hypofysektomerede rotter blev indgivet doser af Pergonal (Serono Menotropin indeholdende 75 IU FSH og 75 IU LH pr. glas), 0,5 IU, 1,0 IU og 1,5 IU, foruden biosyntetisk humant væksthormon (Norditropin®) eller
20 puffer (Nanormon®) indeholdende 20 g glycin, 2,5 g natriumhydrogencarbonat, 2,0 g mannitol og vand til injektion ialt 1000 ml. Denne puffer blev anvendt som placebo. De 3 doser Pergonal, som blev valgt fra den stejle del af dosis-responskurven for Pergonal, blev
opløst i 0,5 ml rumfang albumin-phosphatpuffer pH = 7,2
25 indeholdende 14 IU choriogonadotropin (28 IU/ml). Doserne blev indgivet ved subkutan injektion 3 gange med 24 timers mellemrum.

Ved et forsøg blev 0,4 mg Norditropin® indgivet i 0,5 ml
30 rumfang subkutan i 3 dage til 3 grupper, som fik de tre Pergonal-doser, og 0,5 ml Nanormon®-puffer blev indgivet på de tre grupper, injiceret med de samme 3 Pergonal-doser. Ved et andet forsøg blev det samme dosis-regime fulgt, bortset fra, at Norditropin®-dosis var på 0,6 mg i
35 0,5 ml. Ca. 24 timer efter sidste injektion blev rotterne aflivet ved cervical dislokation, og ovarierne blev fjernet og umiddelbart derefter vejjet. Den samlede vægt af

begge ovarier blev noteret og anvendt som forssøgsresultat for de individuelle rotter.

Resultater:

5

De opnåede data fremgår af tabel 1-2. Tabellerne viser ovarievægten for de forskellige dosisgrupper, udtrykt ved + S.E.M. Resultaterne af Norditropin[®]-injicerede grupper blev sammenlignet med de tilsvarende med Nanormon[®] puffer injicerede grupper ved en t-prøvemetode.

10

15

De rotter, der blev injiceret med Pergonal + Norditropin[®] havde en væsentlig højere ovarievægt end rotter injiceret med Pergonal + puffer. Norditropin[®] ændrede dosis-responskurven for Pergonal således, at respons indtrådte tidligere. En maksimal vækst af ovarievægten synes at blive nået ved kombination af 1,0-1,5 IU Pergonal + 0,6 mg Norditropin[®] (tabel 2).

20

25

30

35

TABEL 1

Vægt af ovarier fra hypofysektomerede rotter,
injiceret med Pergonal og Norditropin® eller Nanormon® puffer

Doser indgivet i 3 dage	0,5 IU Pergonal + puffer	1,0 IU Pergonal + puffer	1,5 IU Pergonal + puffer	0,5 IU Pergonal + 0,4 mg Norditropin®	1,0 IU Pergonal + 0,4 mg Norditropin®	1,5 IU Pergonal + 0,4 mg Norditropin®
Vægt af ovaries (g), $\bar{x}$ ± S.E.M.	0,017 ± 0,001 N=8	0,27 ± 0,002 N=8	0,029 ± 0,004 N=5	0,022 ± 0,002 N=8	0,033 ± 0,002 N=8	0,038 ± 0,002 N=8

* $p < 0,05$ (student's t-test)

TABEL 2

Doser indgivet i 3 dage	0,5 IU Pergonal + puffer	1,0 IU Pergonal + puffer	1,5 IU Pergonal + puffer	0,5 IU Pergonal + 0,6 mg Norditropin®	1,0 IU Pergonal + 0,6 mg Norditropin®	1,5 IU Pergonal + 0,6 mg Norditropin®
Vægt af ovaries (g), $\bar{x}$ ± S.E.M.	0,019 ± 0,003 N=6	0,024 ± 0,002 N=7	0,033 ± 0,004 N=5	0,024 ± 0,002 N=7	0,044 ± 0,003 N=8	0,044 ± 0,004 N=7

*** $p < 0,001$ (student's t-test)

Referencer

1. Adashi et al.

Insulin-like growth factors as intra-ovarian regulators of granulosa cell growth and function
Endocrine Reviews 6: 400-420 (1985)

5

2. Ying et al.

Inhibin and beta-type transforming growth factor have opposite effects on the follicle stimulating hormone induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells

10

Bioch Biophys Res Commun 136: 969-975 (1986)

3. JIA et al.

Growth Hormone Enhances Follicle-Stimulating Hormone-Induced Differentiation of cultured Rat Granulosa Cells

15

Endocrinology 118: 1401-1409 (1986)

4. Hull M G R et al.

Population study of causes, treatment, and outcome of infertility

20

British Med J 291: 1693-1697 (1985)

5. Illhardt, R.

Erfahrungen mit einer Spezialapparatur zur transaurikularen Hypophysektomie bei Ratten z. med. Labortechn. 12: 303-306 (1971)

25

30

35

P a t e n t k r a v :

- 5 1. Middel til behandling af infertilitet hos højere pat-
tedyr eller mennesker, k e n d e t e g n e t ved, at det
består af eller indeholder gonadotropin FSH og LH og
væksthormon i blanding eller som adskilte komponenter.
- 10 2. Middel ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at
det indeholder individuelt afpassede mængder af
gonadotropin FSH og LH og væksthormon i et fysiologisk
acceptabelt flydende bæremedium.
- 15 3. Middel ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at
det består af en injicerbar væske indeholdende endheds-
doser af gonadotropin FSH og LH og humant væksthormon
hGH.
- 20 4. Middel ifølge ethvert af kravene 1-3, k e n d e -
t e g n e t ved, at det anvendte hGH er biosyntetisk
hGH.

25

30

35