

(19) C2 (11) 82650 (13) UA

(98) а/с 925, м. Харків, 61082, Україна

(85) 2004-04-12

(74) Шляховецький Олександр Михайлович, (UA)

(45) [2008-05-12]

(43) [2004-06-15]

(24) 2008-05-12

(22) 2002-09-12

(12) null

(21) 2004031860

(46) 2008-05-12

(86) 2002-09-12 PCT/GB02/04158

(30) 01307757.3 2001-09-12 EP

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮДСЬКОГО ХОРИОНІЧНОГО ГОНАДОТРОПІНУ ПРИ РЕГУЛЬОВАНІЙ ГІПЕРСТИМУЛЯЦІЇ ЯЄЧНИКІВ И СПОЛЬЗОВАНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА (HCG) ИЛИ ЕГО АНАЛОГА ПРИ РЕГУЛИРУЕМОЙ ГИПЕРСТИМУЛЯЦИИ ЯИЧНИКОВ USE OF HCG OR ITS ANALOGUE FOR CONTROLLED OVARY HYPERSTIMULATION

(56) FILICORI M ET AL: "LUTEINIZING HORMONE ACTIVITY SUPPLEMENTATION ENHANCES FOLLICLE-STIMULATING HORMONE EFFICACY AND IMOVULATION INDUCTION OUTCOME" JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, NEW YORK, NY, US, vol. 84, no. 8, August 1999 9-08), pages 2659-2663, XP001055466 3 BLUMENFELD Z AND RAUCH M: "Early pregnancy wastage: the role of repetitive human chorionic gonadotropin supplementation during the first 8 weeks of gestation" FERTILITY AND STERILITY, vol. 58, no. 1, 1992, pages 19-23, XP001077818 3 THOMPSON KA ET AL.: "Gonadotropin requirements of the developing follicle" FERTILITY AND STERILITY, vol. 63, no. 2, 1995, pages 273-276, XP001064790 3 WO 01/54715 A, 02.08.2001 2 WO00/50066 A, 31.08.2000 2 WO00/67778 A, 16.11.2000 2

(71)

(72) FR Менезо Ив FR Менезо Ив FR MENEZO YVES

(73) CH МЕРК СЕРОНО СА CH МЕРК СЕРОНО СА CH MERK SERONO SA

Изобретение касается использования ингибитора ароматазы – производного триазола – для производства лекарственного средства для индуцирования или усиления овуляции у пациентки, страдающей овуляторной бесплодностью, бесплодностью невыясненного происхождения или другими типами овуляторного бесплодия, который вводят в организм пациентки в один из дней 1-5 менструального цикла в виде разовой дозы, по крайней мере, одного такого ингибитора ароматазы, которая приводит к снижению уровней эстрадиола в сыворотке крови. Также раскрыто использование такого лекарственного средства в комбинации с фолликулостимулирующим гормоном для лечения пациентки от бесплодия.

Винахід стосується застосування людського хоріонічного гонадотропіну (hCG) або його аналога для виготовлення лікарського засобу для застосування у поєднанні із регульованою гіперстимуляцією яєчників (СОН) у пацієнтів-людей, яка передбачає застосування FSH або його аналога, для сприяння імплантації та/або зменшення частоти викиднів, причому введення згаданого лікарського засобу передбачається перед овуляцією або запуском механізму овуляції і з дозою 25-1000 МОд hCG на добу.

The invention provides a protocol leading to improved embryo implantation rates and/or decreased miscarriage rates in which hCG, or a bio-analogue, is administered during the follicular phase.

1. Застосування людського хоріонічного гонадотропіну (hCG) або його аналога для виготовлення лікарського засобу для застосування у поєднанні із регульованою гіперстимуляцією яєчників (СОН) у пацієнтів-людей, яка передбачає застосування FSH або його аналога, для сприяння імплантації та/або зменшення частоти викиднів, причому введення згаданого лікарського засобу передбачається починати не пізніше восьмого дня після початку лікування гормоном FSH і з дозою 25-1000 МОд hCG на добу.

2. Застосування за п. 1, причому введення згаданого лікарського засобу передбачається починати з третього по восьмий день після початку лікування гормоном FSH.

3. Застосування за п. 1 або 2, причому введення згаданого лікарського засобу передбачається починати на сьомий або восьмий день після початку лікування гормоном FSH.

4. Застосування за будь-яким із пп. 1-3, причому введення згаданого лікарського засобу передбачається із дозою 50-100 МОд hCG на добу.

5. Застосування за будь-яким із пп. 1-4, причому введення згаданого лікарського засобу передбачається здійснювати разовою ударною дозою.

6. Застосування за п. 5, причому передбачається введення разової ударної дози на сьомий або восьмий день після початку лікування гормоном FSH, і ударна доза містить 100-500 МОд hCG.

7. Застосування за будь-яким із пп. 1-6, причому введення згаданого лікарського засобу передбачається здійснювати щодоби, до індукування овуляції.

8. Застосування за будь-яким із пп. 1-7, причому передбачається здійснення СОН у поєднанні із заплідненням *in vitro* або заплідненням *in vivo*.

9. Застосування за будь-яким із пп. 1-8, причому згадані пацієнти страждають на низькі рівні ендогенного LH.

10. Застосування за будь-яким із пп. 1-9, причому згадані пацієнти є такими, що попередньо зазнали невдачі із настанням або збереженням вагітності при застосуванні лише FSH.

11. Застосування за будь-яким із пп. 1-10, причому hCG є рекомбінантним hCG.

12. Застосування за будь-яким із пп. 1-10, причому hCG є сечовим hCG.

13. Застосування за будь-яким із пп. 1-10, причому застосовується аналог hCG, і ним є одноланцюговий hCG.

14. Застосування людського хоріонічного гонадотропіну (hCG) або його аналога для виготовлення лікарського засобу для стимулювання імплантації та/або зменшення частоти викиднів ембріонів у пацієнта-людини, причому введення згаданого лікарського засобу передбачається перед овуляцією або запуском механізму овуляції і з дозою 25-1000 МОд hCG на добу.

15. Застосування за п. 14, причому введення згаданого лікарського засобу передбачається здійснювати на сьомий або восьмий день після менструації у вигляді разової ударної дози.

16. Застосування за п. 14, причому введення згаданого лікарського засобу передбачається здійснювати щодобово, починаючи на сьомий або восьмий день після менструації і продовжуючи до відбуття овуляції.

17. Застосування за будь-яким із пп. 14-16, причому hCG відповідає визначенню, наведеному у будь-якому з пп. 11-13.

18. Застосування за будь-яким із пп. 1-13, причому застосовують аналог FSH, яким є FSH-СТР, інгібітор ароматази або кломіфену цитрат.

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

Лікування безпліддя із застосуванням допоміжних методик репродукції (ART), наприклад, *in vitro* запліднення (IVF) або IVF у поєднанні з інтрацитоплазматичним введенням сперми (IVF/ICSI) та трансплантацією ембріонів (ET), потребує здійснення регульованої гіперстимуляції яєчника (COH) для збільшення кількості жіночих гамет [1]. Стандартні режими [2] COH включають фазу регуляції за типом негативного зворотного зв'язку, впродовж якої секреція ендogenous лютеїнізуючого гормону (LH) пригнічується шляхом введення агоніста гонадотропін-вивільнюючого гормону (GnRH) з подальшою стимулювальною фазою, під час якої розвиток фолікулів (фолікулогенез) індукується щоденним введенням фолікулоstimулювального гормону (FSH), як правило, у дозі приблизно 150МОд на добу. Застосовуватись можуть також інші молекули, які мають активність FSH. За альтернативним варіантом стимулювання розпочинають після спонтанної або індукованої менструації із запобіганням явища викиду LH шляхом введення антагоніста GnRH, як правило, із започаткуванням приблизно на 6 день або 7 день введення FSH. У разі процедур суперовуляції для ART, бажаною метою є розвиток численних фолікулів. У разі утворення щонайменше 3 фолікулів >16мм (одного 18мм), вводять одноразову ударну дозу hCG (людського хоріонічного гонадотропіну) (5-10000МОд) для запуску механізму овуляції. Виділення ооцитів здійснюють через 36-38год після ін'єкції hCG.

Головною причиною застосування агоністів або антагоністів GnRH у цьому контексті є запобігання несвоєчасного викиду LH, який може викликати передчасну овуляцію та лютеїнізацію фолікулів [3]. Режими застосування агоністів GnRH стають загальноприйнятною нормою у клінічній практиці. Було встановлено, що тривалі режими (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 GnRH є відносно новим у клініці, сподіваються, однак, що це забезпечить одержання подібних же благотворних результатів із додатковою перевагою, яка полягає у коротшій схемі лікування.

Наслідком тривалого введення агоністів GnRH або антагоністів GnRH є глибоке пригнічення ендogenous LH. 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.

Декілька груп досліджували роль хоріонічного гонадотропіну (CG) у процесі індукції овуляції та ART. 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 та інші досліджували роль низьких доз hCG, як заміника LH, при регульованій гіперстимуляції яєчників [5]. Введення hCG (50МОд hCG на добу) розпочинали одночасно із введенням FSH і 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, що піддавалась обробці hCG, були зменшені.

Мессіні (Messinis) та інші повідомляють про індукцію овуляції у ановуляторних жінок (група WHO I) із застосуванням режиму з введенням добових доз hMG (людський клімактеричний гонадотропін) (по 75МОд FSH та LH) впродовж стимулювальної фази та одноразових або численних доз hCG впродовж лютеальної фази. Було встановлено, що частота настання вагітності значно зростала у пацієнтів, що одержували численні дози hCG впродовж лютеальної фази, порівнянно із контрольною групою, яка одержувала лише разову дозу hCG, що індукувала/запускала механізм овуляції [6].

Відповідний розвиток фолікулів є, звичайно, суттєвим фактором для успішного застосування способів ART. Спостерігаються, однак, деякі випадки, коли овуляція і запліднення відбуваються, але невідповідна імплантація ембріона запобігає настанню вагітності. У інших випадках, мимовільний аборт (викидень) відбувається впродовж першого триместру. Обидві ці проблеми можуть пов'язуватись зі станом ендометрія, який є дуже чутливим до гормональних рівнів. Таким чином, можна бачити, що навіть після того, як фолікул розвинувся, відбулась овуляція та запліднення, немає гарантії успішного настання вагітності і часто виникають проблеми з імплантацією та раннім викиднем.

У деяких пацієнтів, як видається, можна подолати тенденцію до абортів або невдалого імплантування, однак, це потребує здійснення повторних циклів ART із подальшими негативними психологічними та фізіологічними наслідками для пацієнта. У інших пацієнтів ці проблеми є по суті постійним каменем спотикання для настання вагітності.

Таким чином, вкрай бажаними є способи підвищення показників імплантації та зниження частоти ранніх викиднів, зокрема, у поєднанні з COH.

Метою цього винаходу є надання поліпшеного способу введення гонадотропінів для COH, який забезпечує поліпшені показники імплантації та зниження частоти викиднів.

Додатковою метою цього винаходу є надання способу підвищення частоти настання вагітності, наприклад, шляхом поліпшення показників імплантації та/або зниження частоти викиднів у пацієнтів, які не піддаються COH, наприклад, у пацієнтів з природним овуляторним циклом або у пацієнтів, що піддаються індукції овуляції.

За першим аспектом, цей винахід пропонує застосування людського хоріонічного гонадотропіну (hCG) або його аналога для виготовлення лікарського засобу для стимулювання імплантації та/або зменшення частоти викиднів ембріонів у пацієнта-людини, де згаданий лікарський засіб вводять перед овуляцією або запуском механізму овуляції.

За другим аспектом, цей винахід пропонує застосування людського хоріонічного гонадотропіну (hCG) або його аналога для стимулювання імплантації та/або зменшення частоти викиднів ембріонів у пацієнта-людини, де згаданий hCG або його аналог вводять перед овуляцією або запуском механізму овуляції.

За третім аспектом, цей винахід пропонує застосування людського хоріонічного гонадотропіну (hCG) або його аналога для виготовлення лікарського засобу для застосування у поєднанні із регульованою

гіперстимуляцією яєчників (COH) у пацієнтів-людей із застосуванням FSH або його аналога для сприяння імплантуванню та/або зменшенню частоти викиднів, де згаданий лікарський засіб повинен вводитись із започаткуванням не пізніше десятого дня після започаткування введення FSH.

За четвертим аспектом, цей винахід пропонує застосування людського хоріонічного гонадотропіну (hCG) або його аналога у поєднанні із регульованою гіперстимуляцією яєчників (COH) у пацієнтів-людей із застосуванням FSH або його аналога для сприяння імплантуванню та/або зменшенню частоти викиднів, де hCG або його аналог повинен вводитись із започаткуванням не пізніше десятого дня після започаткування введення FSH.

За п'ятим аспектом, цей винахід пропонує фармацевтичну композицію для застосування з метою сприяння імплантуванню ембріона та/або зменшенню частоти викиднів, факультативно та за варіантом, якому віддають перевагу, у поєднанні із COH, доза якої містить 25-1000МОд hCG або його аналога.

Додатковий аспект цього винаходу пропонує hCG або його аналог для застосування у поєднанні із регульованою гіперстимуляцією яєчників (COH) у пацієнтів-людей із застосуванням FSH або його аналога для сприяння імплантуванню та/або зменшенню частоти викиднів, де hCG або його аналог чи LH або його аналог повинен вводитись із започаткуванням не пізніше десятого дня після започаткування введення FSH.

За альтернативним варіантом втілення, цей винахід пропонує hCG або його аналог для стимулювання імплантації та/або зменшення частоти викиднів у пацієнта-людини, де згадані hCG чи його аналог повинні вводитись перед овуляцією або запуском механізму овуляції.

За ще іншим додатковим аспектом, цей винахід пропонує спосіб стимулювання імплантації та/або зменшення частоти викиднів у пацієнта, де згаданий спосіб застосовують у поєднанні із регульованою гіперстимуляцією яєчників із застосуванням FSH або його аналога, де згаданий спосіб включає введення пацієнту hCG або його аналога, де згадане введення розпочинається не пізніше десятого дня після започаткування введення FSH.

Цей винахід пропонує також спосіб стимулювання імплантації та/або зменшення частоти викиднів у пацієнта, де згаданий спосіб включає введення пацієнту hCG або його аналога, де згадані hCG чи його аналог вводяться перед овуляцією або запуском механізму овуляції.

За додатковим аспектом, цей винахід пропонує набір для застосування при COH, який містить 12 або більше, за варіантом, якому віддають перевагу, 14 або більше добових доз FSH, за варіантом, якому віддають перевагу, приблизно 75-200МОд на добу, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, приблизно 150МОд FSH на добу, та від 4 до 8, від 5 до 8 або від 6 до 8 добових доз hCG, наприклад 4, 5, 6, 7 або 8 добових доз hCG, за варіантом, якому віддають перевагу, приблизно 25-1000МОд hCG на добу, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, приблизно 50-100МОд hCG на добу.

За додатковим аспектом, цей винахід пропонує набір для стимулювання імплантації ембріона та/або зниження частоти викиднів, де згаданий набір має в своєму складі від 4 до 8, від 5 до 8 або від 6 до 8 добових доз hCG, наприклад 4, 5, 6, 7 або 8 добових доз hCG, які дорівнюють приблизно 25-1000МОд hCG на добу, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, приблизно 50-100МОд hCG на добу. Такі набори можуть застосовуватись або можуть не застосовуватись у поєднанні з COH.

За варіантом, якому віддають перевагу, набори та фармацевтичні композиції за цим винаходом призначаються для застосування у способах та варіантах застосування за цим винаходом.

Людський хоріонічний гонадотропін (hCG) являє собою гетеродимерний глікозилований пептидний гормон, який продукується плацентою під час вагітності. Він з'являється у сироватці невдовзі після запліднення, і його дія полягає у збереженні жовтого тіла після зменшення секреції LH, підтримці постійної секреції естрогенів та прогестерону і запобіганні менструації. Оскільки у значних рівнях він є присутнім лише у вагітних жінок, гадають, що значної ролі у природному овуляторному циклі він не відіграє. Відомо, що рецептори hCG існують у гонадах, матці, маточних трубах, плаценті та у клітинах ендометрія і біометрії [7]. hCG має найдовший період напіввиведення серед гонадотропінів [8].

Винахідники несподівано відкрили, що введення hCG або його аналога у низьких дозах під час стимулювальної фази циклів ART має благотворний вплив на частоту настання вагітності, наприклад, шляхом сприяння або підвищення частоти імплантації та/або зменшення частоти викиднів. Згаданий вираз "низькі дози" означає дози менші за дози, що традиційно застосовуються на конкретному пацієнті для запуску механізму дозрівання фолікула, тобто кінцевого визрівання фолікула безпосередньо перед овуляцією ("доза запуску механізму дозрівання фолікула (або овуляції)"). Доза запуску механізму дозрівання фолікула/овуляції hCG (як правило, у межах 5000-10000МОд hCG) буде змінюватись у залежності від пацієнта.

Як видно з обговорення вищенаведених стандартних режимів COH, на введення цієї "високої дози" або дози запуску механізму овуляції hCG у цій галузі часто посилаються як на стадію запуску механізму кінцевого дозрівання фолікула, стадію дозрівання ооцита або стадію стимулювання овуляції. Така стадія стимулювання овуляції або запуску механізму овуляції чи стадія дозрівання ооцита, що включає введення високої дози hCG, здійснюється, однак, лише після досягнення відповідного розвитку фолікула впродовж стимулювальної фази режиму COH, тобто фази, що включає введення FSH або його аналога для індукування фолікулогенезу. Головна різниця між способами та варіантами застосування цього винаходу і відомими режимами полягає у тому, що hCG вводять під час стимулювальної фази, тобто перед досягненням фолікулом відповідного рівня розвитку та перед відбуттям овуляції або запуском механізму овуляції, і він вводиться у дозах, нижчих за ті, що індукують дозрівання ооцитів та стимулювання овуляції, тобто у дозах, нижчих за дозу запуску механізму овуляції. Такі режими забезпечують одержання вражаючих переваг з точки зору імплантації та викиднів. Так, за цим винаходом, низькі дози hCG вводяться у поєднанні із режимами COH впродовж стимулювальної фази перед досягненням фолікулами відповідного рівня розвитку та перед введенням кінцевої високої дози hCG для запуску механізму овуляції з метою запуску механізму дозрівання ооцитів та овуляції.

За аспектами цього винаходу, коли пацієнти не піддаються COH, низькі дози hCG також вводяться впродовж фази фолікулогенезу та перед досягненням фолікулами відповідного рівня розвитку. Знову ж таки, ці дози hCG є меншими за дозу запуску механізму овуляції. Як зазначено вище, такі пацієнти можуть мати природний овуляторний цикл і у цьому разі потреби у можливому введенні дози hCG, що запускає

механізм овуляції, не виникне. Однак деякі пацієнти, що не піддаються СОН, які можуть лікуватись шляхом введення низьких доз hCG у відповідності до способів за цим винаходом, можуть не мати природного овуляторного циклу (наприклад, пацієнти, що піддаються O1), і у цьому разі введення дози hCG, що запускає механізм овуляції, може здійснюватись після того як, за припущенням, фолікули досягли відповідного рівня розвитку.

У разі застосування hCG за аспектами цього винаходу, опис яких наведено, доза повинна бути у межах 25-4000МОд hCG на добу, за варіантом, якому віддають перевагу, 25-1000МОд hCG на добу, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, 30-1000МОд або 30-500МОд hCG на добу та за варіантом, якому віддають особливу перевагу, 50-100МОд, або 75-125МОд, або 75-100МОд hCG на добу, або від 75МОд чи 100МОд до 500МОд, або від 75МОд чи 100МОд до 1000МОд на добу. Такі дози є меншими від дози запуску механізму овуляції і, як описано вище, на них у цьому описі також посилаються, як на "низькі дози" hCG. У разі застосування аналога hCG, вводиться повинен еквівалент цих доз hCG.

Як вказувалось вище, пропонуються також фармацевтичні композиції або набори, які можуть включати такі дози hCG для застосування у способах та варіантах застосування за цим винаходом.

За аспектами цього винаходу, у разі застосування hCG (або його аналога) у поєднанні з СОН із застосуванням FSH або його аналога, введення hCG (або аналога) повинно розпочинатись не пізніше десятого дня після започаткування введення FSH, за варіантом, якому віддається більша перевага, не пізніше дев'ятого дня після започаткування введення FSH. Введення hCG, за варіантом, якому віддається перевага, повинно розпочинатись через щонайменше 3 дні після започаткування введення FSH, наприклад, між третім та десятим днями після започаткування введення FSH, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, через щонайменше 5 днів або 6 днів після започаткування введення FSH. За варіантом, якому віддають особливу перевагу, введення hCG повинно започатковуватись на або приблизно на сьомий або восьмий день після започаткування введення FSH. Таким чином, hCG вводять впродовж фолікулярної фази, і часові точки, за варіантом, якому віддається перевагу, для введення hCG припадають на або приблизно на середину фолікулярної стадії циклу, тобто введення hCG розпочинають щонайменше через 5, 6, 7 або 8 днів після започаткування введення FSH.

Введення hCG за цим винаходом може здійснюватись разовою ударною дозою. У цьому разі воно, за варіантом, якому віддається перевага, повинно відбуватись на або приблизно на сьомий або восьмий день після започаткування введення FSH, і доза, за варіантом, якому віддається перевага, повинна становити 100-1000МОд hCG, за варіантом, якому віддається більша перевага, 100-500МОд hCG або 150-600МОд hCG, та за варіантом, якому віддається особлива перевага, приблизно 250МОд hCG. Перевага введення разовою ударною дозою полягає у зручності як для лікаря, так і для пацієнта.

За альтернативним варіантом, введення hCG за цим винаходом може здійснюватись на щоденній основі до запуску механізму дозрівання фолікулів або індукування/запуску механізму овуляції за допомогою стандартної ударної дози hCG. Для щоденного введення доза повинна бути у межах 25-4000МОд hCG на добу, за варіантом, якому віддається перевага, 25-1000МОд hCG на добу, за варіантом, якому віддається більша перевага, 30-1000МОд або 30-500МОд hCG на добу, та за варіантом, якому віддається особлива перевага, 50-100МОд або 75-125МОд hCG на добу, або 75-100МОд, або від 75МОд чи 100МОд до 500МОд, або від 75МОд чи 100МОд до 1000МОд hCG на добу. Було встановлено, що особливо ефективною є схема щоденного приймання лікарського засобу, яка розпочинається на 7 день після започаткування введення FSH і у якій застосовують 50-100МОд hCG на добу. Можна також вводити hCG з меншою частотою, наприклад, через два, три або чотири дні, за варіантом, якому віддається перевага, через два дні, до запуску механізму овуляції. У таких схемах можуть застосовуватись дози, вказані вище, хоча перевага віддається дозі у 50-200МОд hCG.

З вищенаведеного обговорення стає зрозумілим, що введення hCG (або LH), що застосовується за цим винаходом, розпочинають перед відбуттям овуляції або до того, як запускається механізм овуляції, наприклад, за допомогою дози hCG, що запускає механізм овуляції, і продовжують доти, доки не відбудеться овуляція або доки не запусниться механізм овуляції. Під час здійснення усіх режимів за цим винаходом, введення hCG може, у разі потреби, продовжуватись після овуляції, якщо гадають, що це може бути благотворним для пацієнта.

Часова точка, у якій механізм овуляції може бути запущеним шляхом введення "дозы запуску механізму овуляції/дозрівання фолікула" hCG, буде добре відомою фахівцю у режимах ART і може бути відповідним чином визначеною. Взагалі, механізм овуляції запускають тоді, коли рівень розвитку фолікула вважають адекватним для режиму того типу, який застосовується. Рівень розвитку фолікула, як правило, визначають шляхом вимірювання розміру фолікулів (наприклад, за допомогою ультразвуку) та сироваткового рівня естрадіолу (E_2) пацієнта. Якщо застосовується режим СОН, тоді, оскільки метою цих способів є розвиток численних фолікулів для одержання підвищеної кількості зрілих фолікулів/ооцитів, які, як правило, запліднюють *in vitro* і знову імплантують пацієнту, часова точка запуску механізму овуляції, ймовірно, буде дещо іншою, аніж у разі застосування режиму індукції овуляції, метою якого є продукування одного, або щонайбільше двох зрілих фолікулів, овуляція яких відбувається та які запліднюють *in vivo*. Наприклад, у варіантах втілення, які включають режими СОН, механізм овуляції може запускатись 5000-10000МОд hCG, наприклад, 10000МОд hCG, коли виявляють щонайменше два фолікули діаметром >18 мм та досягається сироватковий рівень естрадіолу у 300пг/мл. Альтернативно, за варіантами втілення, які включають режими СОН, механізм овуляції може бути запущеним тоді, коли середній діаметр найбільшого фолікула досягає рівня щонайменше 18мм, існує щонайменше два інші фолікули середнього діаметра ≥ 16 мм (наприклад, існує щонайменше 3 фолікули ≥ 16 мм і один із них ≥ 18 мм) і рівень естрадіолу (E_2) знаходиться у межах прийнятного діапазону для кількості існуючих фолікулів (приблизно 150пг/мл/зрілий фолікул). Для O1 (індукція овуляції), доза hCG запуску механізму овуляції може вводитись у разі існування щонайменше одного фолікула ≥ 17 мм (і вона може не вводитись у разі існування більше трьох фолікулів ≥ 15 мм).

hCG має порівняно довгий період напіввиведення з організму. З цієї причини, у разі введення численних доз, слід звертати увагу на те, щоб накопичення не привело до виникнення небажано високих рівнів. Перевага віддається тому, щоб сироваткові рівні hCG значно не перевищували 50МОд/л, за

варіантом, якому віддається перевага, не перевищували 25МОд/л і за варіантом, якому віддається найбільша перевага, не перевищували приблизно 10МОд/л перед введенням ударної дози, що індукує овуляцію. Якщо рівні hCG значно перевищують зазначений рівень, наслідком, ймовірно, буде передчасна лютеїнізація. Фармакокінетика внутрішньом'язових та підшкірних ін'єкцій ударної дози hCG повідомлялась Маннертс (Mannaerts) та іншими [9].

За аспектами цього винаходу, де FSH (або аналог) застосовують у поєднанні зі способами або режимами СОН, відповідні дози та схеми введення будуть очевидними для фахівця у цій галузі і можуть застосовуватись будь-яка відповідна доза та схема введення. Наприклад, FSH може вводиться щоденно у дозі, що дорівнює або приблизно дорівнює від 75МОд до 250МОд або від 75МОд до 200МОд на добу, за варіантом, якому віддається перевага, у дозі, що дорівнює або приблизно дорівнює від 150МОд до 200МОд на добу, за варіантом, якому віддається найбільша перевага, у дозі, що дорівнює або приблизно дорівнює 150МОд на добу. У деяких пацієнтів, що демонструють знижену реакцію на FSH, бажаним може бути застосування доз до 600МОд на добу. Типовою схемою є така: пацієнт розпочинає зі 150МОд FSH на добу. Через 3-4 дні здійснюють ультразвукове обстеження для оцінки фолікулів, що розвиваються. У разі відповідного рівня розвитку фолікулів, доза 150МОд FSH на добу може залишатись незмінною. У разі невідповідного розвитку фолікулів, доза може підвищуватись до 225МОд, 300МОд, 375МОд, 450МОд, 525МОд або 600МОд FSH на добу. За варіантом, якому віддається перевага, введення FSH продовжують до введення дози hCG, що запускає механізм овуляції. У ідеальному випадку, сукупна доза FSH не повинна перевищувати 6000МОд на цикл.

Згадані терміни "поліпшені показники", "стимулювати", "сприяти", "підвищена частота" тощо, які застосовують у цьому описі у зв'язку із впливом на імплантацію або вагітність, означають будь-яке визначене поліпшення або підвищення частоти випадків імплантації або настання вагітності у окремого пацієнта або групи пацієнтів, що лікувались за цим винаходом, наприклад, у разі порівняння з рівнем або частотою випадків імплантації або настання вагітності у одного або декількох пацієнтів, які лікуванню не піддавались, або у разі порівняння з рівнем або частотою випадків імплантації або настання вагітності у того самого пацієнта, що спостерігались у більш ранній часовій точці (наприклад, порівняння з "вихідним" рівнем). Наприклад, у варіантах втілення, де hCG застосовують у поєднанні з СОН, доречним порівнянням є порівняння пацієнтів, яких лікували у відповідності до цих варіантів втілення, з групами пацієнтів, які піддавались традиційній СОН або тим самим пацієнтом, що піддавався традиційній СОН. За варіантом, якому віддається перевага, поліпшення або зростання буде статистично значущим, за варіантом, якому віддається перевага, зі значенням ймовірності $<0,05$. Способи визначення статистичної значущості результатів є добре відомими і задокументованими у цій галузі, і може застосовуватись будь-який відповідний спосіб.

Згадані терміни "зменшений", "зменшення" тощо, які застосовують у цьому описі у зв'язку із впливом на викидень, означають будь-яке вимірне зменшення частоти випадків викиднів у окремого пацієнта або групи пацієнтів, що лікувались за цим винаходом, наприклад, у разі порівняння з частотою випадків викиднів у одного або декількох пацієнтів, які лікуванню не піддавались, або у разі порівняння з рівнем або частотою випадків викиднів у того самого пацієнта, що спостерігались у більш ранній часовій точці (наприклад, порівняння з "вихідним" рівнем). Наприклад, у варіантах втілення, де hCG застосовують у поєднанні з СОН, доречним порівнянням є порівняння пацієнтів, яких лікували у відповідності до цих варіантів втілення, з групами пацієнтів, які піддавались традиційній СОН або тим самим пацієнтом, що піддавався традиційній СОН. За варіантом, якому віддається перевага, зменшення буде статистично значущим, за варіантом, якому віддається більша перевага, зі значенням ймовірності $<0,05$. За варіантом, якому віддається найбільша перевага, наслідком варіантів застосування та способів, які описані у відповідності до цього винаходу, буде запобігання викиднів. Таким чином, запобігання викиднів також охоплюється цими термінами.

Застосування hCG за цим винаходом може бути придатним для будь-якого пацієнта, безпліддя якого, як гадають, може пояснюватись раннім викиднем або невдалою імплантацією, незалежно від того, чи одержує згаданий пацієнт інші екзогенні гонадотропіни.

Викидень визначається як зганняння плоду до того, як він стає спроможним до незалежного виживання. Згадане словосполучення "ранній викидень" означає викидні, які трапились у перший місяць розвитку плода. Способи та варіанти застосування за цим винаходом є особливо придатними для зниження рівня ранніх викиднів.

hCG за цим винаходом застосовують у поєднанні з СОН і, як правило, у поєднанні зі способами запліднення *in vitro*. Можливо, однак, що hCG, який застосовують у поєднанні з СОН відповідно до наведеного опису, можуть також застосовуватись у поєднанні із заплідненням *in vivo*.

На додаток до цього hCG за цим винаходом може також застосовуватись у поєднанні із заплідненням *in vivo* у пацієнтів, які не піддаються СОН, наприклад, у разі режимів, що включають як природну овуляцію, так і режими індукування овуляції, наприклад, за допомогою антиестрогенів або інгібіторів ароматази (тобто режими, які не включають введення екзогенних гонадотропінів). У разі застосування на пацієнтах, що не одержують інших екзогенних гонадотропінів, введення hCG слід розпочинати до того, як у будь-якому даному циклі відбудеться овуляція, за варіантом, якому віддається перевага, на або приблизно на шостий, сьомий або восьмий день після менструації. Може бути введена разова ударна доза (наприклад, у дозах, опис яких було наведено вище для введення разової ударної дози та, зокрема, 100-500МОд hCG) або введення може здійснюватись на щоденній основі (наприклад, у дозах, опис яких було наведено вище для щоденного введення та, зокрема, у дозі 50-100МОд hCG) або через день (наприклад, у дозах, опис яких було наведено вище і, зокрема, у дозі 50-200МОд hCG) доти, доки овуляція не відбудеться природним чином або, у разі потреби, шляхом запуску механізму овуляції за допомогою введення дози hCG для запуску механізму овуляції, як описувалось вище.

За варіантами втілення цього винаходу, де hCG застосовують на пацієнтах, які не піддаються СОН, такі пацієнти можуть, за альтернативним варіантом, піддаватись ОІ із застосуванням екзогенних гонадотропінів (наприклад, екзогенного FSH). Відповідні дози hCG (або LH) для цього застосування відповідають наведеним у цьому описі. Механізм овуляції запускають у відповідний час за допомогою високої дози hCG,

як описувалось вище.

Таким чином, як вказувалось вище, буде зрозуміло, що разом із тим, що застосування hCG за цим винаходом надає переваги у поєднанні з режимами COH із застосуванням FSH, hCG може також застосовуватись для поліпшення показників імплантації та/або зменшення частоти викиднів ембріонів у пацієнтів-людей, які не піддаються режиму COH, але пробують поліпшити свої шанси на успішну вагітність. Такі пацієнти (або їхні партнери), як правило, зіткнулись із певними проблемами, пов'язаними з плідністю, наприклад, вони мають певний ступінь безпліддя або недостатність репродуктивної функції. За альтернативним варіантом, або на додаток до цього, ці пацієнти можуть не мати явно виражених проблем із плідністю з точки зору овуляції та запліднення, але їхнє безпліддя може виражатись схильністю до раннього викидня та/або нездатністю до імплантації. Жінки старшого віку, наприклад, жінки у віці за 35 років, із підтвердженими проблемами з імплантацією або підвищеними рівнями викиднів, також є добрими кандидатами для цього лікування.

У таких пацієнтів овуляція може відбуватись природним чином або індукуватись за схемою індукування овуляції, а не за режимом COH, наприклад, за схемами OI, що включають інгібітори ароматази тощо (які стимулюють секрецію ендogenous FSH) або введення екзогенного FSH, як обговорювалось вище. Такі схеми OI є стандартними і добре описаними у цій галузі.

У таких варіантах застосування, що не включають режими COH, час введення hCG підраховують, як правило, з дня початку менструації, хоча у схемах OI із застосуванням FSH час введення може підраховуватись із дня започаткування введення FSH. Відповідні часові точки після менструації або після започаткування введення FSH обговорювались вище. Як обговорювалось вище, hCG (або LH) починають вводити перед овуляцією (яка може бути природною овуляцією або запускатись дозами hCG, призначеними для запуску механізму овуляції), впродовж фолікулярної фази і, за варіантом, якому віддається перевага, на середині фолікулярної фази циклу, наприклад, через 5-8 днів після менструації, наприклад, через 6 днів, 7 днів або 8 днів після менструації, або щонайменше через 5 днів або 6 днів після початку введення FSH, наприклад, через 5 днів, 6 днів, 7 днів або 8 днів після початку введення FSH. Таким чином, зрозуміло, що незважаючи на те, що схеми лікування у таких пацієнтів відрізняються від схем лікування пацієнтів, що піддаються COH із застосуванням FSH, часова точка введення hCG, якій віддається перевага, є однаковою, тобто вона припадає на або приблизно на середину фолікулярної фази циклу.

Введення hCG за цим винаходом є корисним для тих пацієнтів, що піддаються лікуванню агоністами або антагоністами GnRH. Введення hCG за цим винаходом є особливо корисним у поєднанні з IVF або IVF/ICSI. Наслідком застосування згаданого способу є підвищені показники імплантації та настання вагітності, яка триває довше першого триместру. Наслідком застосування hCG може бути імплантація навіть у пацієнтів, які раніше мали невдачу з IVF унаслідок проблем, не пов'язаних з овуляцією.

Застосування hCG за цим винаходом може бути особливо корисним при лікуванні пацієнтів із низькими рівнями ендogenous LH, наприклад, пацієнтів, що страждають на гіпогеніталізм, обумовлений гіпогонадотропним синдромом.

hCG може застосовуватись за цим винаходом на пацієнтах, яким раніше не вдалось завагітніти або зберегти вагітність із застосуванням лише FSH, наприклад, за стандартними режимами COH або схемами OI.

Прикладами інших придатних груп пацієнтів є пацієнти, що страждають на PCOD (полікістозна хвороба яєчників), мають невідповідну лютеальну фазу та імунологічні фактори, а також пацієнти віком 35 років і більше ("пацієнти старшого віку"). За варіантом, якому віддається перевага, пацієнти є не старшими за 45 років, за варіантом, якому віддається більша перевага, не старшими за 42 роки.

hCG, що застосовується, може походити з будь-якого джерела, за умови, що він не забруднений будь-якими матеріалами (зокрема, іншими гонадотропінами), які будуть суттєво впливати на його дію. Може застосовуватись сечовий hCG, хоча перевага віддається застосуванню рекомбінантного hCG (rhCG), завдяки більш високому ступеню його чистоти.

До аналогів hCG належать усі молекули, які мають такі самі фізіологічні, біохімічні або біологічні ефекти, що і hCG та/або зв'язуються з тими самими рецепторами, що і hCG. Відомо, що лютеїнізуючий гормон (LH) має деякі спільні фізіологічні дії з hCG, але для цілей цього опису LH вважається виключеним з аналогів hCG.

До числа деяких аналогів hCG належить одноланцюговий hCG, C-кінцева ділянка β -субодиниці якого є злитю з N-кінцевою ділянкою α -субодиниці [Сугахара (Sugahara) та інші, PNAS, 92, 1995, 2041-2045]. Інші приклади аналогів розкривають, наприклад, у [європатенті EP 0322226 (Applied Research Systems), WO 92/22568 (University of Medicine&Dentistry of New Jersey), WO 96/05224 (Washington University), WO 90/09800 (Washington University), WO 93/06844 (Washington University), WO 98/43999 (Washington University), WO 99/25849 (Washington University)].

hCG може виявляти за допомогою будь-якого відповідного методу, наприклад, за допомогою радіоімунаналізу, як описано у роботі [Вайтукайтис (Vaitukaitis) та інші [10]], а також за допомогою твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA) [11]. Біоактивність hCG може визначатись за допомогою будь-якого відповідного методу, наприклад, за допомогою біоаналізу на мишачих інтерстиціальних ендокриноцитах [12].

Фахівцю у цій галузі буде зрозуміло, що за варіантами втілення цього винаходу, у яких застосовують FSH, FSH може замінюватись біологічно активним аналогом або сполукою, яка стимулює секрецію ендogenous FSH. До останнього згаданого класу належать інгібітори ароматази та такі антиестрогени, як тамоксифен та кломіфену цитрат (CC). Ці сполуки стимулюють секрецію ендogenous FSH шляхом ліквідації негативного зворотного зв'язку, який має естроген на гіпоталамус (або шляхом антагонізування рецепторів естрогену, як у разі з CC та тамоксифеном, або значним зниженням концентрацій естрогену, як у разі з інгібіторами ароматази).

Форма FSH, якій віддається особлива перевага для застосування у поєднанні із застосуванням hCG за цим винаходом, є відомою як FSH-СТР. Опис цього людського FSH пролонгованої дії наведено у [WO 93/06844]. Він має α -субодиницю FSH дикого типу та β -субодиницю, яка включає β -субодиницю FSH дикого

типу, злиту на карбоксильному кінці з карбоксикінцевим пептидом (СТР) β -субодиниці hCG (залишки 112-118 до положення 145 послідовності нативної hCG β). Аналогами FSH інших типів є, наприклад, однокланцові аналоги FSH, у яких β -субодиниця є злитою з СТР hCG, який, у свою чергу, є злитим з α -субодиницею FSH, як описано у [WO 96/05224] (однокланцовий FSH-СТР).

Відносно hCG, опис якого було наведено вище, FSH, що застосовується у способах за цим винаходом, може бути з будь-якого джерела. Такі джерела є добре відомими фахівцю у галузі індукції овуляції та методик СОН. Може застосовуватись сечовий препарат FSH, наприклад, hMG, що містить діючі речовини FSH та LH у співвідношенні 1:1. Перевага віддається застосуванню рекомбінантного FSH (rFSH), завдяки високому ступеню його чистоти.

Під час стимулювальної фази при індукуванні овуляції та СОН для IVF, замість FSH застосовували людський клімактеричний гонадотропін (hMG). hMG являє собою відносно сирий гормональний екстракт з сечі постклімактеричних жінок, що містить діючі речовини FSH та LH (співвідношення 1:1). Невласний hMG може містити до 2% активних гормонів і, відповідно, 98% білкового вмісту можуть становити сечові забруднювачі. У разі застосування hMG замість FSH у способах за цим винаходом, доповнення hCG, як описувалось вище, може також виявитись благотворним, наприклад, для сприяння імплантації та/або запобігання або зменшення частоти викиднів. Введення hCG повинно розпочинатись не пізніше десятого дня після початку введення hMG, за варіантом, якому віддається більша перевага, не пізніше дев'ятого дня після початку введення hMG, за варіантом, якому віддається особлива перевага, на або приблизно на сьомий або восьмий день після початку введення hMG. Введення hCG, за варіантом, якому віддається перевага, повинно розпочинатись через 3 дні після започаткування введення hMG. Дози та схеми приймання відповідають наведеним для застосування hCG у поєднанні з FSH. Дозою, якій віддається перевага, є 150МОд hCG на добу, дозою, якій віддається більша перевага, є 50МОд hCG на добу або 100МОд hCG на добу.

Більш докладний опис цього винаходу буде наведено у наведених далі необмежувальних Прикладах.

Приклади

Методика стимулювання

Контрольна група 1: Перший день менструації, пацієнтів піддавали десенсибілізації шляхом щоденних ін'єкцій декапентилу (0,1мг). Через 14 днів здійснили ультразвукографічне обстеження і, за відсутності кіст, розпочали стимуляцію rFSH (від 150МОд до 200МОд на добу). Через 7 днів шляхом ультразвукографічного обстеження перевірили ріст фолікулів і визначили концентрацію E_2 у крові. Пацієнтів обстежували на добовій основі і механізм овуляції запускали 10000МОд hCG після того, як були виявлені два фолікули діаметром ≥ 18 мм і сироваткові рівні E_2 досягай 300пг/мл.

Контрольна група 2: На 7 день у контрольній групі 1, контрольна група 2 одержала hMG (150МОд/добу) на додаток до rFSH.

Експериментальна група: На 7 день у контрольній групі, експериментальна група одержувала 50-100МОд hCG на добовій основі у поєднанні з rFSH, доки не було запущено механізм овуляції, як описано вище.

Ооцити запліднювали in vitro. Через 4год їх промивали і переносили на культуральне середовище (ISM1). Через 20год запліднення перевіряли і ембріони залишалися у тому самому середовищі впродовж 48 год. Після цього їх переносили до другого культурального середовища (ISM2). Потім 2 кращі ембріони трансплантували пацієнту, а останні культивували до досягнення стадії утворення бластоцистів (день 5-6).

Результати

Одержані результати узагальнені у Таблиці 1, Таблиці 2 та Таблиці 3. У Таблиці 1 та Таблиці 2 наведені результати порівняння контрольної групи 1 (лише rFSH) з експериментальною групою (rFSH+hCG). У Таблиці 3 наведені результати порівняння контрольної групи 2 (rFSH+hMG) з експериментальною групою (rFSH+hCG).

Різниця у тривалості стимулювальних періодів не було. Рівні E_2 були підвищені у групі, яка одержувала hCG. Показники трансплантації були однакові у обох групах: 92% з hCG у зіставленні з 86% у контрольній групі, ($p=0,1$).

Утворення бластоцистів із надлишкових ембріонів не відрізнялось між 2 групами (185/411=45% з hCG у зіставленні з 292/627=46,5%, контроль, $p=0,622$). Показники імплантації (24,5% hCG у зіставленні з 14,6%, контроль, $p=0,0134$), а також частота настання вагітності/трансплантацію (37,5% hCG у зіставленні з 23,6%, контроль, $p=0,0246$) були збільшені у групі, яка одержувала hCG (середня кількість 1,9 ембріон на трансплантацію).

Таблиця 1

Низька доза hCG при стимулюванні rFSH

	+hCG	Без hCG
Кількість пацієнтів	96	127
Категорія (вік)	2,2 (32,8 $\pm$ 4,1)	1,5 (32,1 $\pm$ 4,5) ($p=0,1068$)
Трансплантації	89 (92%)	109 (86%)
Стимуляція (дні)	11,7	12,3
Виділено ооцитів	10	9,7
Ембріони (m)	6,2 (62%)	5,4 (56%)
Імплантації	43/175 (24,5%)	30/206 (14,6%) ($p=0,0134$)
Ембріон/трансплантація	1,97	1,89
Вагітності	36/96 (37,5%)	30/127 (23,6%) ($p=0,0246$)
Бластоцисти	185/411 (45%)	292/627 (46,5%) ($p=0,6221$)

Таблиця 2

Низька доза hCG при стимулюванні rFSH

	+hCG	Без hCG	Разом
Вагітності	109	230	339
Ектопії	2	6	8 (2,4%) (p=0,95)
Викидні	8 (7,3%)	36 (15,6%)	44 (13%) (p=0,03)
Загальна кількість викиднів+ектопій	10 (9,17)	42 (18,3)	52 (15,7) (p=0,03)

Таблиця 3

Низька доза hCG при стимулюванні rFSH у зіставленні з hMG

	FSH+hCG	HMG
Вагітності	109	76
Ектопії	2	2
Викидні	8	13 (p=0,049)
Загальна кількість викиднів+ектопій	10	15 (p=0,049)

Посилання

1. Healy et al; Lancet 343 1994; 1539-1544.
2. Наприклад, стандартне обладнання, розкриті 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 M.; J. Clin. Endocrinol. Metab. 84 1999; 2659-2663.
6. Messinis et al; Fertility & Sterility 50 1988; 31-35.
7. Lei et al.; J. CHn. Endocrinol Metab. 75 1992; 651-659.
8. Bennett et al; Pharmacol. Rev. 30 1979; 247-292.
9. Mannaerts et al; Human Reproduction 13 1998; 1461-1464.
10. Vaitukaitis et al; Am. J. Obstet. Gynecol 113 1972; 751; Clin. Chem. 31 1985; 1749.
11. Tyrey et al ; Obstet. Gynecol. CHn. North Am. 15 1988; 457.
12. Robertson W.R.. and Binden S.P. The in vitro bioassay of peptide hormones. In Hutton J.C. and Siddle K. (eds), Peptide Hormones; a Practical Approach. IRL Press, Oxford (1990).