

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к способам улучшения женской плодовитости путем индуцирования овуляции введением ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4).

Предпосылки к созданию изобретения

Овуляция представляет собой процесс, во время которого яйцеклетка или яйцеклетки высвобождаются из яичников. Время овуляции во время менструального цикла является самым важным фактором для оплодотворения. Хорошо известно, что фолликулы приобретают способность овулировать после роста и созревания, которые стимулируются гонадотропинами гипофиза.

Фолликулостимулирующий гормон (FSH) является главным гормоном, ответственным за рост фолликулов, а лютеинизирующий гормон (LH) стимулирует овуляцию. Данный координированный процесс стимулированного гонадотропинами созревания фолликула гарантирует доставку полноценных яйцеклеток при овуляции. Адекватно подготовленная яйцеклетка затем становится доступной для оплодотворения спермой в течение часов после овуляции.

Овуляция представляет собой тонко отрегулированный по времени процесс, который управляетяется стимуляцией яичника гипофизарными гонадотропинами, и модифицируется ростом и биохимическим (например, стероидогенным, секрецией ингибина и т.п.) ответом фолликулов на стимуляцию гонадотропинами. Во время нормального менструального цикла у женщин содержание указанных гормонов изменяется циклически. Менструальный цикл функционально может быть разделен на три фазы: фолликулярную, овуляторную и желтого тела. Фолликулярный период начинается к концу фазы желтого тела предыдущего цикла, не закончившегося зачатием, перед или одновременно с началом менструации. Цикл начинается с переходящего повышения содержания FSH в крови, который стимулирует развитие группы фолликулов в яичнике. Размер фолликулов, начавший свой рост, составляет около 5 мм в диаметре. В течение естественного менструального цикла обычно во время фолликулярной фазы появляется один большой или доминантный фолликул, и он растет до созревания. У человека размер фолликула, который считается готовым к овуляции, составляет около 15 мм или более в диаметре.

Вторым ключевым событием, которое наблюдается в яичнике во время фолликулярной фазы, является то, что зернистые клетки внутри фолликулов яичника приобретают рецепторы для LH и усиленно реагируют на LH. Секреция эстрadiола и эстрона яичником сначала возрастает медленно, параллельно с возрастающим диаметром фолликула и чувствительностью фолликула к LH. Относительно повышенные уровни эстрогена и ингибина вызывают ингибирование секреции рилизинг-гормона гонадотропина (GnRH) гипоталамусом и секреции гонадотропинов гипофизом. Выработка эстрогенов достигает максимума за день до пика LH, и нейроэндокринным ответом на повышение эстрогена и постепенно повышающиеся концентрации прогестерона является предовуляторное высвобождение гонадотропинов, которое обсуждается ниже.

Во время овуляторной фазы наблюдается изменение нейроэндокринного ответа на эстроген и прогестерон. В данной точке цикла повышенный эстроген вызывает предовуляторный выброс содержания сывороточных FSH и LH, благодаря положительной обратной связи с гипоталамусом эстроген теперь стимулирует выброс уровней GnRH и, впоследствии, высвобождение FSH и LH из гипофиза. Указанный выброс гонадотропинов индуцирует завершение созревания фолликулов и вызывает разрыв доминантного граафова пузырька и высвобождение яйцеклетки приблизительно через 16-24 ч после пика LH. Во время периода, следующего за предовуляторным выбросом, уровни сывороточного эстрadiола временно падают, а уровни прогестерона в плазме крови начинают расти.

После овуляции постовуляторные овариальные фолликулярные клетки под влиянием LH лютеинизируются с образованием желтого тела - фаза желтого тела. Диагностическими маркерами фазы желтого тела менструального цикла являются выраженное повышение секреции прогестерона желтым телом и трансформация матки, которая наблюдается в ответ на прогестерон. В связи с выработкой прогестерона желтым телом наблюдается менее выраженное повышение сывороточных уровней эстрогена. По мере повышения прогестерона и эстрогенов LH и FSH падают в течение большей части фазы желтого тела. К концу фазы желтого тела, если в данном менструальном цикле зачатия не произошло, желтое тело регрессирует, а сывороточные уровни FSH начинают повышаться, чтобы инициировать рост фолликулов для следующего цикла.

FSH и LH отличаются друг от друга способностью стимулировать развитие фолликулов или овуляцию, соответственно. Известно, что оба агента стимулируют повышение внутриклеточных концентраций цАМФ. Влияние агентов, которые имитируют цАМФ, таких как форсколин или стабильные аналоги цАМФ, как было показано *in vitro*, напоминают влияние FSH на зернистые клетки из незрелых фолликулов и влияние LH на клетки из зрелых фолликулов. Хотя было высказано предположение об альтернативных внутриклеточных путях FSH и LH, в настоящее время принята теория о том, что цАМФ стимулируется в ответ на оба гонадотропина. Если и когда подъемы уровней цАМФ связаны с развитием и созреванием фолликулов, индукция овуляции зависит от типов клеток и присутствия или отсутствия соответствующих рецепторов. Действительно, было показано, что у мышей с дефицитом особой фосфодиэстеразы наблюдается нарушение овуляции и пониженная чувствительность зернистых клеток к гонадотропинам.

Способы лечения бесплодия, которые в настоящее время применяются в клинической практике, включают некоторые из регуляторных событий, описанных выше. Одним агентом, который стимулирует рост фолликулов и используется для лечения отсутствия овуляции, является кломифен. Кломифен представляет собой нестероидный антиэстроген, который конкурирует с эстрогенами за их сайты связывания. Полагают, что кломифен связывается с рецепторами эстрогенов в гипоталамусе и гипофизе и блокирует отрицательную обратную связь, осуществляемую эстрогенами яичников. Результатом является повышение выработки гонадотропинов (FSH и LH) во время ранней части фолликулярной фазы. Эффектом кломифена является повышение сывороточного содержания эндогенного FSH и улучшение роста и созревания фолликулов. Впоследствии эндогенный LH или экзогенный LH/CG индуцирует овуляцию у данных пациентов.

Помимо кломифена, женщин лечат с помощью схем индуцирования овуляции, которые включают коммерческие препараты человеческих гонадотропинов, включая фолликулостимулирующий гормон (FSH) и лютеинизирующий гормон (LH) или хорионический гонадотропин (CG), которые впервые были получены выделением из мочи беременных женщин и, позднее, с использованием рекомбинантной технологии. Обычно данное лечение является весьма эффективным в отношении стимулирования образования фолликулов и выработки стероидных гормонов. Осложнения данного лечения происходят в результате того факта, что указанные препараты и схемы могут избыточно стимулировать рост и созревание фолликулов. У некоторой части пациентов может наблюдаться гиперстимуляция яичников, которая может приводить к множественной овуляции и, как следствие, многоплодным родам. Гиперстимуляция яичников не только может угрожать жизни матери, но также обычно приводит к рождению детей с пониженной массой тела, которым впоследствии требуется интенсивная терапия. Полагают, что главные осложнения, приписываемые индуцированной гонадотропинами гиперстимуляции и многоплодным беременностям, возможно, происходят вследствие пролонгированных эффектов hCG. Помимо этого, применение гонадотропинов в схемах индуцирования овуляции может вызывать реакции в месте инъекции, как местные, так и системные. Таким образом, разработка схем индуцирования овуляции с использованием пероральных активных агентов, обладающих более мягкой гонадотропин-подобной активностью, как альтернативы схемам лечения, в которых используются мощные препараты для инъекций, может обеспечить значительные преимущества. Что более важно, было бы большим преимуществом, если можно было бы разработать схемы индуцирования овуляции, которые обеспечивают менее выраженную гиперстимуляцию яичников и, как следствие, представляют меньшую опасность для матери и обеспечивают рождение более здоровых детей.

Сущность изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к применению ингибитора PDE4, выбранного из цис-4-циан-4-(3-(цикlopентилокси)-4-метиксифенил)циклогексан-1-карбоновой кислоты, 3-(цикlopентилокси)-N-(3,5-дихлорпиридин-4-ил)-4-метоксибензамида, гидрохлорида 2-(4-(6,7-диэтокси-2,3-бис(гидроксиметил)нафтилин-1-ил)пиридин-2-ил)-4-(3-пиридинил)фталазин-1(2Н)-она и 7-бензиламин-6-хлор-2-пиперазин-4-пирролидиноптеридина, для производства лекарственного средства для индуцирования овуляции у пациента.

В втором аспекте настоящее изобретение относится к применению ингибитора PDE4, для индуцирования овуляции у пациента.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к применению ингибитора PDE4, для производства лекарственного средства для индуцирования овуляции у пациента, при использовании схемы, в которой созревание фолликулов индуцируют кломифеном или ингибитором ароматазы, предпочтительно, ингибитором ароматазы, выбранным из препаратов YM-511, летрозола, фадрозола и анастрозола, более предпочтительно выбранным из препаратов летрозола и анастрозола, перед индуцированием овуляции.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к применению ингибитора PDE4, для индуцирования овуляции у пациента, при использовании схемы, в которой созревание фолликулов индуцируют кломифеном или ингибитором ароматазы, предпочтительно ингибитором ароматазы, выбранным из препаратов YM-511, летрозола, фадrozola и анастрозола, более предпочтительно выбранным из препаратов летрозола и анастрозола, перед индуцированием овуляции.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к набору для применения для индуцирования овуляции, включающему индуцирующую овуляцию дозу ингибитора PDE4, и инструкции по его применению для индуцирования овуляции.

В шестом аспекте настоящее изобретение относится к набору для применения для индуцирования овуляции и/или вспомогательных репродуктивных технологий (ART), включающему достаточные суточные дозы FSH и/или соединения, обладающего действием FSH, предпочтительно кломифена или ингибитора ароматазы, более предпочтительно ингибитора ароматазы, выбранного из препаратов YM-511, летрозола, фадrozола и анастрозола, для обеспечения созревания фолликулов, и индуцирующую овуляцию дозу ингибитора PDE4, и инструкции по применению набора для индуцирования овуляции или ART.

В седьмом аспекте настоящее изобретение относится к применению ингибитора PDE4, для индуци-

рования овуляции у пациента, при использовании схемы, в которой для индуцирования овуляции вводят также hCG или LH, и hCG или LH вводят в уменьшенных дозах по сравнению с количеством hCG или LH, которое обычно требуется для индуцирования овуляции у того же самого пациента.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способам улучшения женской плодовитости, включающим введение женской особи ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4). В другом аспекте настоящее изобретение относится к специальному введению ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) индуцирования овуляции доминантного зрелого фолликула перед фазой желтого тела овуляционного цикла.

Несмотря на то, что имеются сообщения о влиянии ингибиторов PDE на выработку стероидов зернистыми клетками *in vitro*, стимулированную LH, настоящее изобретение описывает два новых открытия. Первое, ингибиторы PDE не могут усиливать рост фолликулов, стимулированный FSH, *in vivo*, несмотря на признанную роль цАМФ в клеточных путях как FSH, так и LH. Более того, представлены данные, свидетельствующие о том, что ингибиторы PDE действительно усиливают стимулированный гонадотропинами стероидогенез *in vitro*, что является дополнительным примером новой активности ингибитора PDE в отношении LH-зависимой овуляции. Второе, ингибиторы PDE повышали частоту овуляций *in vivo* в отсутствие добавленного LH или hCC. С учетом пероральной активности ингибиторов PDE, указанное второе открытие обеспечивает основу для первой потенциальной схемы индуцирования овуляции, не включающей в себя инъекции, поскольку ингибиторы PDE можно использовать в сочетании с существующими схемами, как описано ниже.

Настоящее изобретение относится также к стимуляции развития фолликулов перед введением ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4), которая включает введение агента, который повышает концентрации FSH во время фолликулярной фазы овуляционного цикла реципиента. Цель настоящего изобретения в повышении FSH относится только к развитию и созреванию фолликулов, а не к индуцированию овуляции. Предпочтительные агенты включают сам FSH, кломифен, селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов, ингибиторы ароматаз и селективные модуляторы нейроэндокринной регуляции выработки FSH.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к совместному введению ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) с LH или хорионическим гонадотропином (CG) перед фазой желтого тела овуляционного цикла женской особи. Совместное введение может осуществляться последовательно или одновременно, а также одним и тем же или различными способами доставки (например, парентерально и/или перорально). Помимо этого, настоящее изобретение относится к применению более низких концентраций LH или CG, которые вводят особи, чем концентрации, которые используют в существующих в настоящее время схемах индуцирования овуляции и, следовательно, к менее вероятной гиперстимуляции яичников.

Помимо этого, настоящее изобретение относится к применению ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) в качестве терапевтического агента при замещении или усилении влияния hCG или LH на сбор яйцеклеток при оплодотворении *in vitro*.

Таким образом, настоящее изобретение относится к применению ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) в качестве низкомолекулярного лекарственного средства, которое вводят перорально, а не с помощью инъекции, пути, который требуется для введения белков или способа введения в существующих в настоящее время схемах индуцирования овуляции. Пероральное введение помогает избежать острых и системных побочных эффектов, связанных с указанными инъекциями. Прежде всего, низкомолекулярное лекарственное средство является эффективным для индуцирования овуляций и может вводиться в отдельности или с LH или CG или без них, и, альтернативно, с более низкими концентрациями LH или CG, чем те, которые используются в настоящее время, и, таким образом, уменьшает частоту возникновения гиперстимуляции яичников и связанных с ней рисков. Таким образом, можно предотвратить многоплодные роды и осложнения, угрожающие жизни матери. Помимо этого, настоящее изобретение относится к возможности более ранней диагностики беременности, чем при существующих в настоящее время схемах индуцирования овуляции, включающих использование CG.

Способы лечения по настоящему изобретению будут пригодны для лечения бесплодия у человека, а также и у других млекопитающих (таких как лошади и домашний скот, например, крупный рогатый скот, овцы, коровы и т.п.), и у других видов, таких как рыбы и птицы (т.е. домашняя птица).

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой схематическое представление распространенной схемы индуцирования овуляции у человека;

фиг. 2 - столбчатый график влияния ингибиторов фосфодиэстеразы *in vitro* (т.е. соединения 1 и соединения 2) на повышения внутриклеточных уровней цАМФ в зернистых клетках;

фиг. 3 - столбчатый график влияния ингибитора фосфодиэстеразы (т.е. соединения 1) на созревание фолликулов у крыс *in vivo*;

фиг. 4 - столбчатый график влияния ингибитора фосфодиэстеразы (т.е. соединения 1) на овуляцию с CG у крыс *in vivo*;

фиг. 5 представляет собой столбчатый график влияния ингибитора фосфодиэстеразы (т.е. соединения 1) на овуляцию с CG и без него у крыс *in vivo*;

фиг. 6 - столбчатый график влияния ингибитора фосфодиэстеразы (т.е. соединения 2) на овуляцию с CG и без него у крыс *in vivo*;

фиг. 7 - столбчатый график влияния ингибитора фосфодиэстеразы (т.е. соединения 2) на овуляцию после перорального и подкожного введения;

фиг. 8 - столбчатый график влияния ингибитора PDE соединения 3 на овуляцию *in vivo* после перорального и подкожного введения;

фиг. 9 - столбчатый график влияния ингибитора PDE соединения 4 на овуляцию в присутствии или отсутствие субэффективной дозы hCG *in vivo*;

фиг. 10 - столбчатый график влияния ингибитора PDE соединения 2 на овуляцию и плодовитость.

I. Определения

Обычно следующие слова или фразы имеют указанное значение, когда используются в описании, примерах и формуле изобретения.

«Введение» относится к доставке терапевтического агента женской особи. В контексте настоящего изобретения указанное значение будет включать доставку неполипептидного модулятора уровней цАМФ и/или агента, который повышает концентрации FSH. Данный термин более полно описан в разделе, озаглавленном «Фармацевтические композиции», в составе настоящего документа.

«Овуляция» для целей настоящего документа относится к процессу, при котором яйцеклетка или яйцеклетки высвобождаются из яичников. По мере приближения середины цикла происходит резкое повышение эстрогена, с последующим выбросом LH и, в меньшей степени, выбросом FSH. Это побуждает доминантный фолликул к овуляции. Овуляция заключается в быстром увеличении фолликула с последующим выпячиванием фолликула на поверхности коркового вещества яичника. В конечном итоге разрыв фолликула приводит к выталкиванию комплекса яйцеклетка-cumulus. Остаток доминантного фолликула затем преобразовывается и превращается в желтое тело.

«Ановуляция» относится к отсутствию овуляции.

«Неполипептидный модулятор уровней цАМФ» относится к соединениям, которые полностью не составлены из аминокислот, вне зависимости от гликозилирования, и повышают, прямо или опосредованно, внутриклеточные уровни цАМФ. Указанные соединения могут повышать уровни цАМФ путем стимуляции синтеза цАМФ или путем ингибирования его деградации, или и того, и другого. Примеры модуляторов, которые повышают синтез цАМФ, включают активаторы аденилатциклазы, такой как форсколин. Примеры модуляторов, которые уменьшают деградацию цАМФ, включают ингибиторы фосфодиэстераз, такие как теофиллин.

«Женская особь» означает индивидуум женского пола того вида, которому вводят агенты в соответствии с настоящим изобретением. Человек, другие млекопитающие и другие виды, такие как рыба и домашняя птица, также включены в настоящее определение.

«Ингибитор фосфодиэстеразы» относится к химическим соединениям, которые блокируют или ингибируют фосфодиэстеразы (PDE), чье действие заключается в инактивации их мишени - циклических нуклеотидов (т.е. цАМФ и цГМФ) путем гидролитического расщепления 3'-фосфодиэфирной связи, следствие чего является пассивное накапливание конкретных циклических нуклеотидов. Ингибиторы могут быть неселективными для всех изоформ фосфодиэстеразы или селективными для конкретных изоформ. См. соединения, описанные в настоящем документе.

«Изоформы фосфодиэстеразы» относится к семейству изоферментов или изоформ, ответственных за метаболизм или деградацию внутриклеточных вторичных мессенджеров, цАМФ и цГМФ. Специфичные изоформы могут иметь высокоизбирательные клеточные и субклеточные локализации. Примеры изоформ фосфодиэстеразы включают PDE3 и PDE4.

«Фолликулярная фаза» относится к первой части менструального цикла и характеризуется прогрессирующим повышением циркулирующих уровней эстрадиола и ингибина В развивающимся граафовым пузырьком.

«Перед фазой желтого тела» относится к периоду менструального цикла перед сменой управляемой эстрогенами фолликулярной фазы на управляемую прогестероном фазу желтого тела. Перед фазой желтого тела уровни эстрогенов обычно превышают или равны 150 пг/мл/фолликул для фолликула диаметром 16 мм, а размер фолликулов обычно составляет не менее 14 мм в диаметре. Указанные критерии не являются абсолютными и у различных пациентов будут различаться. В контексте настоящего изобретения и с точки зрения момента времени введения неполипептидного модулятора уровней цАМФ, неполипептидный модулятор уровней цАМФ можно вводить женской особи в момент времени существующей схемы индуцирования овуляции, в который указанной особи обычно вводят hCG или LH.

«Овуляционный цикл» или «менструальный цикл» относится к ряду циклических событий в течение специфичного для каждого вида периода времени, включающим рост и развитие фолликулов, рекрутмент, селекцию, доминирование, овуляцию и образование и прекращение существования желтого тела. Функционально цикл можно разделить на три фазы: фолликулярную, овуляторную и фазу желтого тела. Данный цикл может также называться менструальным циклом.

«Индуцирование овуляции» относится к процессу, при котором полипептид (полипептиды) и/или синтетическое химическое вещество используют для того, чтобы вызвать овуляцию у женских особей, у которых иначе овуляции не происходит, в результате чего происходит разрыв фолликула и овуляция способных к оплодотворению яйцеклеток. Индуцирование овуляции не включает в себя предшествующие события во время овуляционного цикла созревания и развития фолликулов.

«Гиперстимуляция яичников» относится к фармакологическому вмешательству в овуляционный или ановуляционный менструальный цикл. Она влечет за собой созревание множества фолликулов, что приводит к одновременному доминированию многочисленных фолликулов и доступности множества способных к оплодотворению яйцеклеток.

«Фолликул» относится к пузырьку, заполненному жидкостью, который окружает яйцеклетку; указанный пузырек содержит также зернистые клетки.

«Развитие фолликула» относится к прогрессирующему росту и развитию овариальных фолликулов, особенно во время фолликулярной фазы овуляционного цикла, и приводит к рекрутменту и доминированию фолликула, которому предстоит овулировать.

«Фолликулостимулирующий гормон (FSH) и изоформы» относится к гормону, высвобождаемому гипофизом, который стимулирует рост овариальных фолликулов, и изоформам FSH, как описано, например, в патенте США № 5087615, включенном в настоящий документ в качестве ссылки.

«Селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов» относятся к химическим соединениям или полипептидам, которые действуют как антагонист эстрогеновых рецепторов на уровне гипоталамуса и гипофиза, и как агонист на уровне матки. Примеры указанных модуляторов могут включать тамоксилен, ралоксилен, торемилен, кломифен и дролоксилен. См. статью в Endocrinology, 1999 за декабрь: 138(12): 5476-5484, включенную в настоящий документ в качестве ссылки.

«Ингибиторы ароматазы» относится к химическим соединениям или полипептидам, которые блокируют или ингибируют активность ароматазы, которая представляет собой фермент, который превращает андрогены в эстрогены. Примеры ингибиторов ароматазы включают летрозол, анастрозол и ворозол. Источники: 1) Journal of Endocrinology, 2000 февраль: 164(2): 225-238 и 2) Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1997 апрель: 61(3-6): 157-166, включены в настоящий документ в качестве ссылки.

«Родственные стероидогенные ферменты» относятся к любому ферменту, который участвует в катализе биохимических реакций, ведущих к синтезу эстрогена и прогестерона, включая 3-(3-гидрокистероид-дегидрогеназу, а ингибиторы указанного фермента включают даидзин, генистеин, биоханин А и формононетин. Источник, Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1997, апрель: 58(1): 95-101, включен в настоящий документ в качестве ссылки.

«Кломифен» относится к 2-[4-(2-хлор-1,2-дифенилэтенил)фенокси]-N,N-диэтилэтанамину и его солям.

«Лютенизирующий гормон» относится к гормону, высвобождаемому гипофизом, который служит двойной цели: вызывает высвобождение яйца из доминантного фолликула и стимулирует секрецию прогестерона желтым телом.

«Уменьшенные концентрации» относится к более низким концентрациям введенного агента по сравнению со стандартными уровнями введенных агентов. В контексте настоящего изобретения вводят более низкие концентрации LH или CG, чем те, которые вводят в существующих схемах индуцирования овуляции.

«Существующие схемы индуцирования овуляции» относится к современным способам индуцирования овуляции, включающим применение кломифена, гонадотропинов (т.е., FSH, LH и CG) или комбинации указанных агентов для стимулирования фолликулогенеза и индуцирования овуляции у ановуляторных женских особей. Схемы варьируют с точки зрения времени введения, частоты введения и концентрации вводимых агентов. Данное определение включает модификации современных схем, которые все еще требуют введения hCG или LH в некоторый момент времени в течение схемы индуцирования овуляции. Следующие трактаты по женскому бесплодию, стимулированному фолликулогенезу и индуцированию овуляции включены в настоящий документ в качестве ссылки: Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology, тома 1 и 2; издатели: E.Y. Adashi, J.A. Rock и Z. Rosenwaks; Lippincott-Raven Publishers, Филадельфия, 1996, и Female Infertility Therapy Current Practice; издатели: Z. Shoham, C.M. Howies и H.S. Jacobs; Martin Dunitz Ltd., Лондон, 1999.

«Хорионический гонадотропин» относится к гликопротеиновому гормону, который биологически и иммунологически подобен гипофизарному LH. При нормальной беременности CG вырабатывается плацентой и может использоваться в качестве диагностического маркера беременности по повышенным уровням в концентрате сыворотки. Акроним hCG относится к человеческому хорионическому гонадотропину.

«Агент, который повышает концентрацию FSH» относится к любой композиции вещества, белка или синтетического химического соединения, которая, будучи введенной женской особи, повышает уровни концентрации FSH в сыворотке, как прямо, так и опосредованно, путем введения самого FSH или агента, который стимулирует его эндогенную выработку или ингибирует его эндогенную деградацию.

Определение данной фразы и агента включает соединения, которые могут не повышать концентрации FSH, но обладают биологической функцией и активностью фолликулостимулирующего гормона.

II. Принципы индуцирования овуляции

Проблемы неадекватных или неподходящих уровней гонадотропинов признаны причинами овуляторной дисфункции с 1960 г. Клиническая эффективность различных использовавшихся препаратов гонадотропинов была пропорциональна количеству введенного FSH. Первоначальные данные предполагали, что экзогенный LH не требуется для адекватного фолликулогенеза во время индуцирования овуляции. Однако, стало очевидным, что у женщин, которым вводили только экзогенный FSH, не вырабатывался адекватный фолликулярный эстрадиол для индуцирования овуляции. Присутствие по меньшей мере некоторого количества экзогенного или эндогенного LH для индуцирования овуляции у человека оказалось важным. Фиг. 1 иллюстрирует схематическое представление распространенной схемы индуцирования овуляции. Препарат FSH дают в дозе 75 МЕ в день в течение первых 7 дней. В конце 7-дневного периода осуществляют ультразвуковое исследование для оценки диаметра фолликулов, и определяют уровень эстрадиола в сыворотке. Если диаметр фолликула меньше 12 мм, дозу FSH удваивают, и осуществляют повторное ультразвуковое исследование еще через 5-7 дней. Пациенты, имеющие фолликулы диаметром ≥ 15 мм, получают овуляторную болюсную дозу hCG.

III. Распространенная схема индуцирования овуляции

Индуцирование овуляции является в такой же степени искусством, как и наукой. Несмотря на замечательный внушительный ряд протоколов лечения, ни один из подходов или конкретных методов не является абсолютно корректным. Определенные принципы, однако, действительно приняты и обеспечивают основу для безопасного и эффективного лечения. Однако следует отметить, что критерии, перечисленные ниже, для индуцирования овуляции приводятся только в качестве примеров и могут значительно изменяться клиникой, пациентом и целью лечения.

Первый цикл обычно включает введение FSH ежедневно, начиная с 4-7 дня после прекращения кровотечения. Рост и реакцию фолликулов отслеживают с помощью уровней эстрогенов и ультразвукового исследования. Адекватная стимуляция фолликулов обычно достигается к 7-14 дню непрерывного введения FSH. Лечение FSH в течение периода времени менее 8 дней связано с повышенной частотой спонтанных выкидыши среди беременных пациенток.

После достижения достаточного развития фолликулов (два 16-18-мм фолликула в сочетании с прогрессирующим повышением сывороточного эстрогена до 500-1000 пг/мл), вводят hCG (5000 или 10000 МЕ). Момент времени для введения hCG является важным, так как главные осложнения, присущие индуцированной гонадотропинами гиперстимуляции и многоплодные беременности, возможно, являются результатом пролонгированных эффектов hCG. Несмотря на то, что полупериод существования hCG составляет приблизительно 8 ч, его можно обнаружить в крови пациентов в течение 7-10 дней после инъекции и неверно диагностировать как беременность, наступившую в результате успешного лечения. После введения hCG партнерам рекомендуют иметь половое сношение в ближайшую ночь и еще один раз или два раза в течение последующих 48 ч.

Фундаментальным правилом, касающимся введения гонадотропинов, является то, что каждый цикл лечения должен быть индивидуализирован, должным образом мониторироваться и корректироваться. Мониторинг необходим не только для повышения частоты наступления овуляции и беременности, но также для снижения риска тяжелой гиперстимуляции яичников и его потенциальных последствий и многоплодных беременностей.

Это достигается частыми определениями уровней эстрадиола в плазме/сыворотке и исследованием яичников с помощью ультразвука. Уровни эстрадиола обычно коррелируют с количеством растущих фолликулов, но не обязательно с количеством зрелых фолликулов. Если полагаться на уровни эстрадиола как маркер зрелости фолликулов, то можно ошибочно предположить зрелость фолликулов при наличии многочисленных фолликулов малого размера, что приводит к преждевременному введению hCG. Поскольку рост фолликулов прямо коррелирует с созреванием яйцеклетки, ультразвуковая оценка среднего диаметра фолликулов может быть лучшим индикатором при оценке зрелости и времени для введения hCG. Уровни эстрогенов следует, таким образом, использовать для оценки раннего развития фолликулов в качестве индикатора ответа на гонадотропины, а ультразвук следует использовать для оценки количества и размеров созревающих фолликулов.

Целью большинства способов лечения является достижение максимальной вероятности одноплодной беременности, при одновременном уменьшении риска синдрома гиперстимуляции. Уровни эстрадиола между 1000 и 1500 пг/мл представляются оптимальными, но истинные уровни могут варьировать в зависимости от используемых лабораторных методик и опыта врача. Риск гиперстимуляции возрастает с более высокими уровнями эстрадиола. Обычно, когда сывороточный эстрадиол превышает 2000 пг/мл, hCG следует вводить с большой осторожностью или не вводить, чтобы позволить фолликулам регрессировать. При гипогонадотропном гипогонадизме риск тяжелой гиперстимуляции при величинах более 2400 пг/мл составляет 5% в циклах, закончившихся беременностью, и 1% в циклах, не закончившихся беременностью. Кроме того, поскольку гиперстимуляция имеет тенденцию коррелировать с количеством имеющихся фолликулов, решение не давать hCG может также основываться на ультразвуковом выявле-

нии 10 или более развивающихся фолликулов.

Следующие трактаты по женскому бесплодию, стимулированному фолликулогенезу и индуцированию овуляции включены в настоящий документ в качестве ссылки: Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology, тома 1 и 2; издатели: E.Y. Adashi, J.A. Rock и Z. Rosenwaks; Lippincott-Raven Publishers, Филадельфия, 1996, и Female Infertility Therapy Current Practice; издатели: Z. Shoham, C.M. Howies и H.S. Jacobs; Martin Dunitz Ltd., Лондон, 1999.

IV. Способы по настоящему изобретению

Настоящее изобретение относится к способу индуцирования овуляции, который включает введение ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) в схеме индуцирования овуляции, при которой ингибитор вводят для усиления или замены введения hCG (или LH), который обычно вводят перед фазой желтого тела индуцированного или естественного овуляционного цикла. Ингибитор можно вводить в отдельности или совместно, как последовательно, так и одновременно, с hCG (или LH), а также различными способами доставки (например, парентерально или перорально).

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к совместному введению, как последовательно, так и одновременно, ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) с LH или CG перед фазой желтого тела овуляционного цикла женской особи. Кроме того, поскольку полагают, что главные осложнения, присущие индуцированной гонадотропинами гиперстимуляции, и последующие многоплодные беременности, возможно, являются результатом пролонгированных эффектов hCG, настоящее изобретение относится к более низким концентрациям LH или CG, введенным реципиенту, чем концентрации, которые используются в существующих схемах индуцирования овуляции, и, соответственно, к снижению вероятности гиперстимуляции яичников и устранению неблагоприятных эффектов, связанных с указанным состоянием: многоплодных родов, рождения детей с пониженной массой и осложнений для здоровья матери.

Следует отметить, что введение ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) не оказывает терапевтического влияния на созревание и развитие фолликулов во время овуляционного цикла.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способам индуцирования овуляции у женской особи, включающим введение ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) женской особи. Ингибиторы изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) повышают внутриклеточные уровни цАМФ. Модуляторы цАМФ могут повышать уровни цАМФ путем стимуляции синтеза цАМФ или путем ингибирования его деградации, или и того, и другого. Примеры модуляторов, которые повышают синтез цАМФ, включают активаторы аденилатциклазы, такой как форсколин. Примеры модуляторов, которые уменьшают деградацию цАМФ, включают ингибиторы фосфодиэстераз, такие как теофиллин. Предпочтительные неполипептидные модуляторы уровней цАМФ включают ингибиторы фосфодиэстераз, особенно ингибиторы изоформ фосфодиэстеразы 4.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к специальному введению ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) перед фазой желтого тела овуляционного цикла женской особи. Как усилитель или замена hCG в схеме индуцирования овуляции, при которой hCG обычно вводят ближе к концу фолликулярной фазы, но перед фазой желтого тела овуляционного цикла.

Предпочтительным моментом времени для введения ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) является время перед фазой желтого тела овуляционного цикла реципиента.

Настоящее изобретение относится также к стимуляции развития фолликулов перед введением ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4), которая включает введение агента, который повышает концентрации фолликулостимулирующего гормона (FSH) во время фолликулярной фазы овуляционного цикла реципиента.

Предпочтительные агенты включают сам FSH, кломифен, селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов, ингибиторы ароматаз и агенты, которые не являются FSH, но обладают биологической функцией и активностью FSH. Таким образом, введение агентов, описанных в настоящем документе, в предписанное время относительно роста и созревания фолликула, как заявлено, улучшает процесс овуляции и последующее оплодотворение, которое должно иметь место, если оно желательно.

Следует отметить, что когда ингибитор изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) вводят в отдельности, а не совместно с hCG, настоящее изобретение относится к возможности более ранней диагностики беременности, чем при существующих в настоящее время схемах индуцирования овуляции, включающих использование CG.

V. Ингибиторы фосфодиэстеразы

В качестве ингибиторов фосфодиэстеразы в способах по настоящему изобретению используют любой из цис-4-циан-4-(3-(цикlopентилокси)-4-метоксифенил)циклогексан-1-карбоновой кислоты, 3-(цикlopентилокси)-N-(3,5-дихлорпиридин-4-ил)-4-метоксибензамида, гидрохлорида 2-(4-(6,7-диэтокси-2,3-бис(гидроксиметил)нафталин-1-ил)пиридин-2-ил)-4-(3-пиридинил)фталазин-1(2Н)-она и 7-бензиламин-6-хлор-2-пиперазин-4-пирролидиноптеридина.

В одном варианте осуществления настоящего изобретение относится к применению ингибитора PDE4 для индуцирования овуляции после того как рост и созревание фолликулов были индуцированы с использованием FSH. Также в объем настоящего изобретения входит применение ингибитора PDE4 для

индуцирования овуляции после того как рост и созревание фолликулов были индуцированы с использованием соединения или препарата, обладающего активностью FSH. Особенно предпочтительной заменой или вспомогательным агентом для лечения с использованием FSH является ингибитор ароматазы, например, YM-511 (Yamanouchi), летрозол (Novartis), анастрозол (AstraZeneca) или фадрозол (Novartis). В предпочтительной схеме вспомогательных репродуктивных технологий (ART), для которой желательно получение многочисленных яйцеклеток для оплодотворения *in vitro*, пациентам вводят ингибитор ароматазы (например, в дозе приблизительно 2,5-5 мг в день препарата летрозол или анастрозол) приблизительно от 3 до 7 дня, или приблизительно от 3 до 8 дня менструального цикла, вместе с приблизительно 50-225, предпочтительно 50-150 ME FSH в день, начиная приблизительно с 3 по 7 день менструального цикла, и продолжая введение FSH до тех пор, пока не появятся по меньшей мере два ведущих фолликула со средним диаметром, превышающим или равным приблизительно 16 мм. В указанный момент вводят ингибитор PDE4 в дозе, достаточной для того, чтобы вызвать овуляцию.

Альтернативно, ингибитор ароматазы можно использовать в качестве единственного агента, стимулирующего рост фолликулов (т.е. в отсутствие FSH), используя более высокую дозу ингибитора ароматазы (например, 2-10 мг в день летрозола или анастрозола) и/или пролонгируя введение (например, дни с 3 по 8, с 3 по 9 или с 3 по 10). Когда созревание фолликулов будет признано достаточным по результатам ультразвукового исследования, вводят ингибитор PDE4 в дозе, вызывающей овуляцию. Данная схема позволяет собрать множество яйцеклеток, избегая инъекций, поскольку все используемые агенты доступны в форме для перорального введения.

При индуцировании овуляции желательно вызывать высвобождение только одной яйцеклетки. Этого можно добиться, согласно настоящему изобретению, используя FSH для стимуляции роста и созревания фолликулов, с последующим введением ингибитора PDE4 для того, чтобы вызвать овуляцию. В объем настоящего изобретения также входят схемы индуцирования овуляции, в которых рост и созревание фолликулов индуцируют с заменой FSH, например, ингибитором ароматазы.

В предпочтительной схеме индуцирования овуляции пациенту вводят дозу ингибитора ароматазы (например, 2,5-5 мг в день летрозола или анастрозола) приблизительно от 3 до 7 дня, или приблизительно от 5 до 9 дня менструального цикла (в отсутствии FSH). Альтернативно, можно давать однократную дозу ингибитора ароматазы (например, 5-30 мг летрозола или анастрозола, предпочтительно, 10 или 20 мг) приблизительно на 3 или 4 день менструального цикла. Овуляцию вызывают введением ингибитора PDE4 в дозе, достаточной для того, чтобы вызвать овуляцию. Данная схема обеспечивает протокол индуцирования овуляции, который не требует инъекций.

VI. Фармацевтические композиции

Ингибиторы изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) и агенты, которые повышают концентрации FSH у женской особи (также называемые в настоящем документе «активными соединениями»), по настоящему изобретению, а также их производные, фрагменты, аналоги и гомологи можно включать в фармацевтические композиции, удобные для введения. Указанные композиции обычно включают активные соединения и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие всасывание агенты и т.п., совместимые с фармацевтическим введением. Подходящие носители описаны в последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартном справочном руководстве в данной области, который включен в настоящий документе в качестве ссылки. Предпочтительные примеры данных носителей или разбавителей включают, без ограничения, воду, физиологический раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% человеческий сывороточный альбумин. Можно использовать также липосомы и неводные носители, такие как жирные масла. Применение указанных сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно специалистам. Если любая обычная среда или агент являются совместимыми с активным соединением, предполагается их применение в композициях. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в композиции.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению изготавливают таким образом, чтобы она была совместима с предполагаемым путем ее введения. Примеры путей введения включают парентеральное (например, внутривенное, внутрикожное, подкожное), пероральное, ингаляционное, чрескожное (местное), ректальное введение и введение через слизистые оболочки. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутрикожного или подкожного применения могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауссная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для коррекции тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH можно корректировать кислотами или основаниями, такими как хлористоводородная кислота или гидроксид натрия. Препарат для парентерального введения можно помещать в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы, содержащие множество доз, изготовленные из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, подходящие для введения путем инъекции, включают стерильные водные растворы (если вещества растворимы в воде) или дисперсии и стерильные порошки для получения стерильных растворов или дисперсий для инъекции непосредственно перед использованием. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) или физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и представлять собой жидкость в такой степени, чтобы ее можно было набрать в шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть предохранена от контактирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Должную текучесть можно поддерживать, например, использованием покрытия, такого как лецитин, поддержанием требующегося размера частиц в случае дисперсии и использованием поверхностно-активных агентов. Предотвращения действия микроорганизмов можно достигать с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимерозала и т.п. Во многих случаях в композиции будет предпочтительным включение изотонических агентов, например сахаров, полиспиртов, таких как маннит, сорбит, хлорида натрия. Пролонгированного всасывания композиций для инъекций можно добиться включением в композицию агента, который задерживает всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций можно изготавливать путем введения активного соединения в требуемое количество в подходящий растворитель, с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, если это требуется, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии изготавливают введением активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требующиеся другие ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для изготовления стерильных растворов для инъекций способами изготовления являются вакуумная сушка и лиофильная сушка, с помощью которых получают порошок активного ингредиента плюс любого дополнительного желательного ингредиента из их раствора, предварительно стерилизованного фильтрованием.

Композиции для перорального введения обычно включают инертный разбавитель или съедобный носитель. Их можно помешать в желатиновые капсулы или прессовать в таблетки. Для цели перорально-го терапевтического введения активное соединение можно объединять с наполнителями и использовать в форме таблеток, пастилок или капсул. Композиции для перорального введения также можно изготавливать с использованием жидкого носителя для применения в качестве полоскания для ротовой полости, когда соединение в жидком носителе набирают в рот и полощут и выплевывают или проглатывают. В качестве части композиции можно включать фармацевтически совместимые связывающие агенты и/или вспомогательные материалы. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и т.п. могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединений похожей природы: связывающий агент, такой как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; наполнитель, такой как крахмал или лактоза; разрыхляющий агент, такой как альгиновая кислота, Primogel или кукурузный крахмал; смазывающий агент, такой как стеарат магния или Sterotes; агент, обеспечивающий скольжение, такой как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или корригент, такой как мята перечная, метилсалцилат или апельсиновый корригент.

Для введения ингаляцией соединения доставляются в форме аэрозоля из контейнера или диспенсера под давлением, который содержит подходящий пропеллент, например газ, такой как диоксид углерода, или небулайзера.

Системное введение можно также осуществлять через слизистые оболочки или через кожу. Для введения через слизистые оболочки или через кожу в композиции используют агенты, способствующие проникновению через соответствующий барьер. Данные агенты, способствующие проникновению, в целом известны специалистам и включают, например, агенты для проникновения через слизистые оболочки, детергенты, желчные соли и производные фузидиновой кислоты. Введение через слизистые оболочки можно осуществлять с использованием назальных спреев или суппозиториев. Для чрескожного введения активные соединения изготавливают в форме мазей, гелей или кремов, что обычно известно специалистам.

Предпочтительным путем для введения ингибиторов фосфодиэстеразы, а также кломифена, селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов, ингибиторов ароматазы и ингибиторов стероидогенных ферментов является пероральное введение. Указанные активные соединения можно также вводить подкожно путем инъекции, внутривенно или трансвагинально (для местного введения). Предпочтительным путем для введения FSH, LH или hCG является подкожная инъекция, но можно использовать также внутривенный путь.

Соединения можно также изготавливать в форме суппозиториев (например, с использованием обычных основ для суппозиториев, таких как масло какао и другие глицериды) или удерживающих клизм для ректальной или вагинальной доставки.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения активные соединения изготавливают с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из организма, например, в форме композиции с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортрафиры и полимолочная кислота. Способы изготовления указанных композиций будут очевидны для специалистов. Материалы можно также приобретать коммерческим путем у Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc.

Соединения по настоящему изобретению можно применять, как в отдельности, так и в комбинации с одним или более терапевтических агентов, как обсуждалось выше, в качестве фармацевтической композиции в смеси с обычным наполнителем, т.е. фармацевтически органическими или неорганическими веществами-носителями, подходящими для перорального, парентерального, энтерального или местного применения, которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с активными соединениями и не являются вредными для реципиента. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, без ограничения, воду, солевые растворы, спирт, растительные масла, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, парфюмерное масло, моноглицериды и диглицериды жирных кислот, сложные эфиры petroethral жирных кислот, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т.п. Фармацевтические препараты можно стерилизовать и, если это желательно, смешивать со вспомогательными агентами, например, смазывающими агентами, консервантами, стабилизаторами, увлажняющими агентами, эмульгаторами, солями для коррекции осмотического давления, буферами, красителями, корригентами и/или ароматическими веществами и т.п., которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с активными соединениями.

Особенно выгодно изготавливать композиции для перорального или парентерального введения в форме дозированных лекарственных форм для облегчения введения и стандартизации дозировок. Лекарственная форма в виде дозированных единиц, в том смысле, в котором данный термин используется в настоящем документе, относится к физически дискретным единицам, удобным в качестве стандартных доз для субъекта, которого лечат; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанного для получения желательного терапевтического эффекта, в сочетании с требующимся фармацевтическим носителем. Свойства дозированных лекарственных форм по настоящему изобретению диктуются и прямо зависят от собственных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, которого нужно добиться, а также от ограничений, присущих процессу изготовления композиций с данным активным соединением, для лечения отдельных лиц.

Специалисты оценят тот факт, что истинные предпочтительные количества активного соединения, используемые в данной терапии, будут варьировать в соответствии с конкретным используемым соединением, конкретными используемыми композициями, способом введения, конкретным местом введения и т.п. Оптимальную частоту введений для данной схемы введения легко подберет специалист, используя стандартные тесты для определения дозировок, осуществляемых с учетом описанных ранее инструкций. См. также Remington's Pharmaceutical Sciences. Обычно подходящая эффективная доза одного или более соединений по настоящему изобретению, особенно при использовании более эффективного соединения (соединений) по настоящему изобретению, будет находиться в пределах от 0,01 до 100 мг на килограмм массы тела реципиента в день, предпочтительно в пределах от 0,01 до 20 мг на килограмм массы тела реципиента в день, более предпочтительно в пределах от 0,05 до 4 мг на килограмм массы тела реципиента в день. Желательную дозу удобно вводить один раз в день, или несколько субдоз, например 2-4 субдозы, вводят с подходящими интервалами в течение дня, или используют другую подходящую схему введения. Указанные субдозы можно вводить в виде дозированных лекарственных форм, например, содержащих от 0,05 до 10 мг соединения (соединений) по настоящему изобретению на дозированную единицу.

Фармацевтические композиции можно помещать в контейнер, упаковку или диспенсер вместе с инструкциями по введению.

Следующие неограничивающие примеры иллюстрируют настоящее изобретение.

VII. Примеры

Была разработана модель овуляции *in vivo*, в которой FSH вводили неполовозрелым крысам дважды в день 2 или 3 дня для индуцирования созревания фолликулов, с последующей однократной овуляторной дозой hCG. Однократную инъекцию неполипептидных модуляторов уровней цАМФ (например, соединения 1, соединения 2 и т.п.) вводили совместно с субовуляторной дозой hCG или инъектировали в отдельности, что приводило к индуцированию овуляции. Данные результаты согласуются с моделью, в которой повышенные уровни цАМФ усиливают или заменяют hCG, но не FSH. Роль FSH в любой схеме индуцирования овуляции заключается в стимуляции развития и созревания фолликулов, а не в индуцировании овуляции.

Соединения примеров 1-9 идентифицированы следующим образом:

Соединение 1 представляет собой цис-4-циан-4-(3-(цикlopентилокси)-4-метоксифенил)циклогексан-1-карбоновую кислоту; соединение 2 представляет собой 3-(цикlopентилокси)-N-(3,5-дихлорпиридин-4-ил)-4-метоксибензамид; соединение 3 представляет собой

гидрохлорид 2-(4-(6,7-диэтокси-2,3-бис(гидроксиметил)нафталин-1-ил)пиридин-2-ил)-4-(3-пиридили)фталазин-1(2Н)-она, и соединение 4 представляет собой 7-бензиламин-6-хлор-2-пиперазин-4-пирролидиноптеридин.

Пример 1. Влияние соединения 1 и соединения 2 на уровень цАМФ зернистых клеток яичников крыс, по отдельности и с гонадотропинами *in vitro*.

Яичники удаляли у неполовозрелых, в возрасте 25 дней, с удаленным гипофизом, получавших ди-этилстильбестрол крыс Sprague-Dawley. Яичники повторно пунктировали иглами калибра 27 для высвобождения зернистых клеток из фолликулов. Клетки промывали и ресусцинировали в среде McCoys 5A + 0,1% BSA + 2 мкМ андростенедион. Жизнеспособные клетки в количестве 100000 помещали в 6-лучевые планшеты для тканевых культур в объеме 1,0 мл (соединение 1 и соединение 2 в концентрации 25 микромоль, в отдельности или в сочетании с малой, 0,1 пМ дозой гонадотропина). Планшеты инкубировали в термостате при 37°C, 100% влажности, 5,0% CO₂ в течении 48 ч. Кондиционированные среды анализировали с помощью специфичного в отношении цАМФ RIA. Результаты выражены как среднее плюс или минус стандартные отклонения. Как видно на фиг. 2, соединения 1 и 2 вызывают достоверное повышение уровней цАМФ в присутствии субэффективных концентраций гонадотропина.

Пример 2. Влияние ингибитора PDE, соединения 1, на созревание фолликулов *in vivo*.

Зрелые овариальные фолликулы, генерированные у неполовозрелых самок крыс воздействием субоптимальной дозы FSH (1,08 МЕ на инъекцию для каждой крысы; дважды в день в течение 3 дней) с совместным введением соединения 1 (0,1, 1, 10 и 50 мг/кг на инъекцию: дважды в день в течение 3 дней) или без него. Однократную инъекцию овуляторной дозы hCG (20 МЕ) вводили с последней инъекцией FSH. Ингибиторы PDE давали в сочетании с субоптимальными дозами FSH. Все инъекции осуществляли подкожным путем. Овуляцию определяли через 18 ч после введения hCG путем подсчета яйцеклеток в яйцеводе. Результаты выражены как среднее плюс или минус стандартные отклонения. Как видно на фиг. 3, данные представляют среднее количество яйцеклеток в яйцеводах всех крыс в каждой группе и частоту овулирующих крыс. Как отмечено также на фиг. 3, ингибитор PDE (соединение 1) ингибировал (а не стимулировал) овуляцию при введении в дозе 50 мг/кг. Результаты показывают, что возрастающие дозы ингибитора PDE не могут усиливать способность субоптимальной дозы FSH подготавливать фолликулы к овуляции.

Пример 3. Влияние ингибитора PDE соединения 1 на овуляцию в присутствии субэффективной дозы hCG *in vivo*.

Зрелые овариальные фолликулы, генерированные у неполовозрелых самок крыс воздействием эффективной дозы FSH (2,16 МЕ на инъекцию для каждой крысы; дважды в день в течение 2 дней) побуждали к овуляции однократной инъекцией hCG. hCG вводили в субэффективной дозе (3 МЕ) с однократной инъекцией соединения 1 (50, 10 и 1 мг/кг) во время последней инъекции FSH. Овуляцию определяли через 18 ч после введения hCG путем подсчета яйцеклеток в яйцеводе. Как видно на фиг. 4, однократная инъекция соединения 1 совместно с субовуляторной дозой hCG приводила к индуцированию овуляции. Все инъекции осуществляли подкожным путем. Результаты выражены как среднее плюс или минус стандартные отклонения. Эти данные показывают, что неполипептидный модулятор уровней цАМФ, в данном случае ингибитор PDE, усиливает стимулированную hCG овуляцию при введении субоптимальной дозы hCG. Эффекты соединения 1, известного ингибитора PDE, представлены.

Пример 4. Влияние ингибитора PDE соединения 1 на овуляцию в присутствии или отсутствие субэффективной дозы hCG *in vivo*.

После индуцированного FSH созревания фолликулов (2,16 МЕ на инъекцию для каждой крысы; дважды в день в течение 2 дней) соединение 1 инъецировали с субэффективной дозой hCG или без нее. Овуляцию определяли через 18 ч после введения hCG/соединения 1 путем подсчета яйцеклеток в яйцеводе. Данные представляют среднее количество яйцеклеток в яйцеводах всех крыс в каждой группе и частоту овулирующих крыс. Как видно на фиг. 5, однократная инъекция соединения 1, введенная отдельно, без субовуляторной дозы hCG, приводила к индуцированию овуляции у крыс, предварительно получавших FSH. Результаты выражены как среднее плюс или минус стандартные отклонения. Эти данные показывают, что неполипептидный модулятор уровней цАМФ, в данном случае ингибитор PDE, соединение 1, способен индуцировать овуляцию в отсутствие любого инъецированного hCG. Ранее проводившиеся эксперименты, а также эксперименты, представленные в настоящем документе, показали, что фолликулы, полученные с указанными дозами FSH, не овулируют спонтанно, а требуют последующего введения hCG.

Пример 5. Влияние ингибитора PDE соединения 2 на овуляцию в присутствии или отсутствии субэффективной дозы hCG *in vivo*.

После индуцированного FSH созревания фолликулов (2,16 МЕ на инъекцию для каждой крысы; дважды в день в течение 2 дней) соединение 2 инъецировали с субэффективной дозой hCG или без нее. Овуляцию определяли через 18 ч после введения hCG/соединения 2 путем подсчета яйцеклеток в яйцеводе. Данные представляют среднее количество яйцеклеток в яйцеводах всех крыс в каждой группе и частоту овулирующих крыс. Как видно на фиг. 6, однократная инъекция соединения 2, введенная отдельно, без субовуляторной дозы hCG, приводила к индуцированию овуляции у крыс, предварительно

получавших FSH. Эти данные показывают, что неполипептидный модулятор уровней цАМФ, в данном случае ингибитор PDE, соединение 2, способен индуцировать овуляцию в отсутствие любого инъецированного hCG.

Пример 6. Влияние ингибитора PDE соединения 2 на овуляцию *in vivo* после перорального и подкожного введения.

После индуцированного FSH созревания фолликулов (2,16 МЕ на инъекцию для каждой крысы; дважды в день в течение 2 дней) соединение 2 инъецировали подкожно (*subcutis*) или вводили с помощью желудочного зонда. Овуляцию определяли через 18 ч после введения соединения 2 путем подсчета яйцеклеток в яйцеводе. Данные представляют среднее количество яйцеклеток в яйцеводах всех крыс в каждой группе и частоту овулирующих крыс. Результаты выражены как среднее плюс или минус стандартные отклонения. Как видно на фиг. 7, введение соединения 2 подкожным или пероральным путем приводило к индуцированию овуляции у крыс, предварительно получавших FSH. Эти данные показывают, что неполипептидный модулятор уровней цАМФ, в данном случае ингибитор PDE, соединение 2, способен индуцировать овуляцию при пероральном введении.

Пример 7. Влияние ингибитора PDE соединения 3 на овуляцию *in vivo* после перорального и подкожного введения.

После индуцированного FSH созревания фолликулов (2,16 МЕ на инъекцию для каждой крысы; дважды в день в течение 2 дней) соединение 3 инъецировали подкожно (*subcutis*) или вводили в помощь желудочного зонда. Овуляцию определяли через 18 ч после введения соединения 3 путем подсчета яйцеклеток в яйцеводе. Данные представляют среднее количество яйцеклеток в яйцеводах всех крыс в каждой группе и частоту овулирующих крыс. Результаты выражены как среднее плюс или минус стандартные отклонения. Как видно на фиг. 8, введение соединения 3 подкожным или пероральным путем приводило к индуцированию овуляции у крыс, предварительно получавших FSH. Эти данные показывают, что неполипептидный модулятор уровней цАМФ, в данном случае ингибитор PDE, соединение 3, способен индуцировать овуляцию при пероральном введении.

Пример 8. Влияние ингибитора PDE соединения 4 на овуляцию *in vivo* в присутствии или отсутствие субэфективной дозы hCG.

После индуцированного FSH созревания фолликулов (2,16 МЕ на инъекцию для каждой крысы; дважды в день в течение 2 дней) соединение 4 инъецировали с субэфективной дозой hCG или без нее. Овуляцию определяли через 18 ч после введения hCG/соединения 4 путем подсчета яйцеклеток в яйцеводе. Данные представляют среднее количество яйцеклеток в яйцеводах всех крыс в каждой группе и частоту овулирующих крыс. Как видно на фиг. 9, однократная инъекция соединения 4, введенная с субовуляторной дозой hCG, приводила к индуцированию овуляции у крыс, предварительно получавших FSH. Соединение 4, введенное отдельно, индуцировало малое количество овуляций или не индуцировало их вовсе. Результаты выражены как среднее плюс или минус стандартные отклонения. Эти данные показывают, что неполипептидный модулятор уровней цАМФ, в данном случае ингибитор PDE, соединение 4, которого не достаточно для индуцирования овуляции при использовании его в отдельности, способен индуцировать овуляцию в присутствии субэфективной дозы hCG.

Пример 9. Влияние ингибитора PDE соединения 2 на овуляцию и плодовитость.

Созревание фолликулов индуцировали у неполовозрелых самок крыс с использованием FSH (4,33 МЕ на инъекцию для каждой крысы; дважды в день в течение 2 дней) и гонадотропина из сыворотки жеребой кобылы (PMSG) (1,5 МЕ на инъекцию для каждой крысы; дважды в день в течение 2 дней). Как было установлено ранее, данная комбинация индуцирует созревание фолликулов и стимулирует брачное поведение, в то же время сохраняя низкую частоту спонтанных овуляций в отсутствие дополнительной инъекции hCG. Крысам, индуцированным FSH и PMSG, затем вводили соединение 2 (12 крыс) или носитель (12 крыс) путем подкожной инъекции. В одной группе крыс (по 6 крыс на один вид воздействия) овуляцию определяли через 18 ч после введения соединения 2 или носителя путем подсчета яйцеклеток в яйцеводе. Для оценки плодовитости крыс из другой группы (по 6 крыс на один вид воздействия) индивидуально помещали на ночь в клетку с одним взрослым самцом, плодовитость которого была ранее доказана. На следующий день самцов крыс удаляли, а самок содержали в клетках вместе группой до дня родов. Записывали количество живых доношенных крысят, наблюдавшихся во время родов. Как видно на фиг. 10, однократная инъекция соединения 2 приводила к индуцированию овуляции у крыс, предварительно получавших FSH/PMSG. Помимо этого, у крыс, получавших соединение № 2, наблюдалось увеличенное количество живых детеныш на момент времени родов. Результаты по овуляции и живым детенышам выражены как среднее плюс или минус стандартные отклонения. Эти данные показывают, что неполипептидный модулятор уровней цАМФ, в данном случае ингибитор PDE, соединение 2, индуцирует овуляцию яйцеклеток, способных к оплодотворению *in vivo*.

Настоящее изобретение не ограничивается объемом конкретных вариантов его осуществления, описанных в настоящем документе. На самом деле, различные модификации настоящего изобретения, помимо тех, которые описаны в настоящем документе, будут очевидны для специалистов из приведенного выше описания и прилагаемых фигур. Указанные модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения. Полное содержание литературных источников, патентов и опубликованных патентных зая-

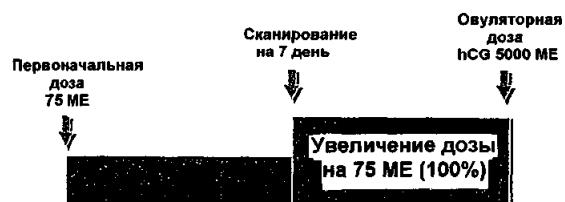
вок, пропущенных в настоящей заявке, включены в настоящий документ в качестве ссылок.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

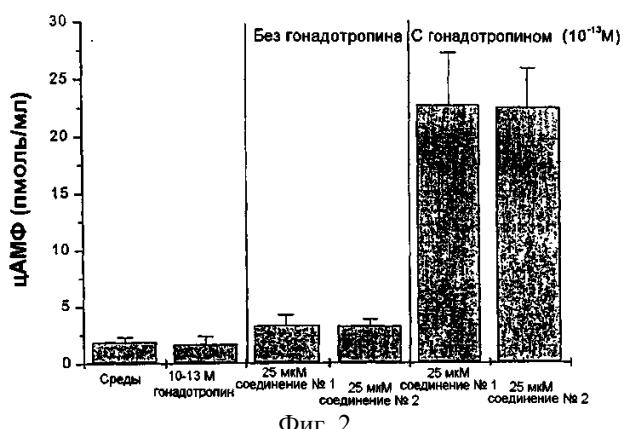
- Способ индуцирования овуляции у женской особи, предусматривающий введение ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4), выбранного из группы, состоящей из цис-4-циан-4-(3-(цикlopентилокси)-4-метоксифенил)цилогексан-1-карбоновой кислоты, 3-(цикlopентилокси)-N-(3,5-дихлорпиридин-4-ил)-4-метоксибензамида, гидрохлорида 2-(4-(6,7-диэтокси-2,3-бис(гидроксиметил)нафтиалин-1-ил)пиридин-2-ил)-4-(3-пиридилил)фталазин-1(2Н)-она и 7-бензиламин-6-хлор-2-пиперазин-4-пирролидиноптерицина.
 - Способ по п.1, при котором указанный ингибитор изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) вводят указанной женской особи перед фазой желтого тела овуляционного цикла женской особи.
 - Способ комбинированного лечения для стимуляции развития фолликулов и индуцирования овуляции у женской особи, предусматривающий введение агента, который повышает концентрации фолликулостимулирующего гормона у указанной женской особи во время фолликулярной фазы овуляционного цикла женской особи, и введение ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4), выбранного из группы, состоящей из цис-4-циан-4-(3-(цикlopентилокси)-4-метоксифенил)цилогексан-1-карбоновой кислоты, 3-(цикlopентилокси)-N-(3,5-дихлорпиридин-4-ил)-4-метоксибензамида, гидрохлорида 2-(4-(6,7-диэтокси-2,3-бис(гидроксиметил)нафтиалин-1-ил)пиридин-2-ил)-4-(3-пиридилил)фталазин-1(2Н)-она и 7-бензиламин-6-хлор-2-пиперазин-4-пирролидиноптерицина.
 - Способ по п.3, при котором указанный агент представляет собой фолликулостимулирующий гормон.
 - Способ по п.3, при котором указанный агент представляет собой кломифен.
 - Способ по п.3, при котором указанный агент представляет собой селективный модулятор эстрогеновых рецепторов.
 - Способ по п.3, при котором указанный агент представляет собой ингибитор ароматазы.
 - Способ по п.3, при котором указанный агент представляет собой ингибитор родственных стероидогенных ферментов, что приводит к уменьшению общей выработки эстрогенов.
 - Способ по п.3, при котором лютеинизирующий гормон также вводят указанной женской особи для индуцирования овуляции перед фазой желтого тела овуляционного цикла женской особи.
 - Способ по п.3, при котором лютеинизирующий гормон также вводят в уменьшенных по сравнению с существующими схемами концентрациях указанной женской особи для индуцирования овуляции перед фазой желтого тела овуляционного цикла женской особи.
 - Способ по п.3, при котором хорионический гонадотропин также вводят указанной женской особи для индуцирования овуляции перед фазой желтого тела овуляционного цикла женской особи.
 - Способ по п.3, при котором хорионический гонадотропин также вводят в уменьшенных по сравнению с существующими схемами концентрациях указанной женской особи для индуцирования овуляции перед фазой желтого тела овуляционного цикла женской особи.
 - Способ индуцирования овуляции у женской особи, предусматривающий введение ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) указанной женской особи в момент времени существующей схемы индуцирования овуляции, в который указанной женской особи вводят hCG или LH, при котором ингибитор изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) выбран из группы, состоящей из цис-4-циан-4-(3-(цикlopентилокси)-4-метоксифенил)цилогексан-1-карбоновой кислоты, 3-(цикlopентилокси)-N-(3,5-дихлорпиридин-4-ил)-4-метоксибензамида, гидрохлорида 2-(4-(6,7-диэтокси-2,3-бис(гидроксиметил)нафтиалин-1-ил)пиридин-2-ил)-4-(3-пиридилил)фталазин-1(2Н)-она и 7-бензиламин-6-хлор-2-пиперазин-4-пирролидиноптерицина.
 - Способ по п.13, при котором ингибитор изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) вводят совместно с hCG или LH.
 - Способ по п.13, при котором вводят только ингибитор изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4), а не совместно с hCG или LH.
 - Применение ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) в фармацевтической композиции для лечения ановуляционного нарушения, где ингибитор изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) выбран из группы, состоящей из цис-4-циан-4-(3-(цикlopентилокси)-4-метоксифенил)цилогексан-1-карбоновой кислоты, 3-(цикlopентилокси)-N-(3,5-дихлорпиридин-4-ил)-4-метоксибензамида, гидрохлорида 2-(4-(6,7-диэтокси-2,3-бис(гидроксиметил)нафтиалин-1-ил)пиридин-2-ил)-4-(3-пиридилил)фталазин-1(2Н)-она и 7-бензиламин-6-хлор-2-пиперазин-4-пирролидиноптерицина.
 - Применение ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) для изготовления лекарственно-го средства для применения при лечении ановуляционного нарушения, где ингибитор изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4) выбран из группы, состоящей из цис-4-циан-4-(3-(цикlopентилокси)-4-метоксифенил)цилогексан-1-карбоновой кислоты, 3-(цикlopентилокси)-N-(3,5-дихлорпиридин-4-ил)-4-метоксибензамида, гидрохлорида 2-(4-(6,7-диэтокси-2,3-бис(гидроксиметил)нафтиалин-1-ил)пиридин-2-ил)-4-(3-пиридилил)фталазин-1(2Н)-она и 7-бензиламин-6-хлор-2-пиперазин-4-пирролидиноптерицина.

18. Способ получения яйцеклеток для оплодотворения *in vitro*, предусматривающий введение ингибитора изоформы фосфодиэстеразы 4 (PDE4), выбранного из группы, состоящей из цис-4-циан-4-(3-(цикlopентилокси)-4-метоксифенил)циклогексан-1-карбоновой кислоты, 3-(цикlopентилокси)-N-(3,5-дихлорпиридин-4-ил)-4-метоксибензамида, гидрохлорида 2-(4-(6,7-дизетокси-2,3-бис(гидроксиметил)нафталин-1-ил)пиридин-2-ил)-4-(3-пиридинил)фталазин-1(2H)-она и 7-бензиламин-6-хлор-2-пиперазин-4-пирролидиноптерицина.

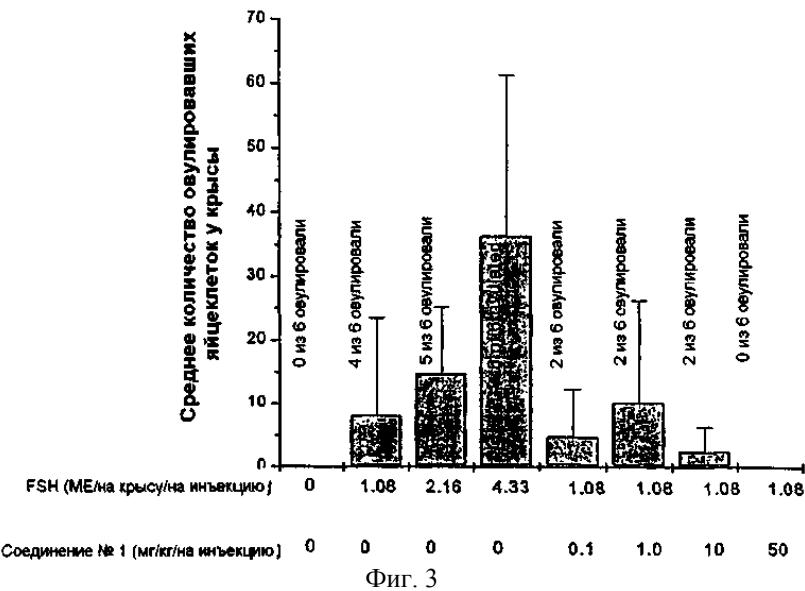
Общепринятая схема



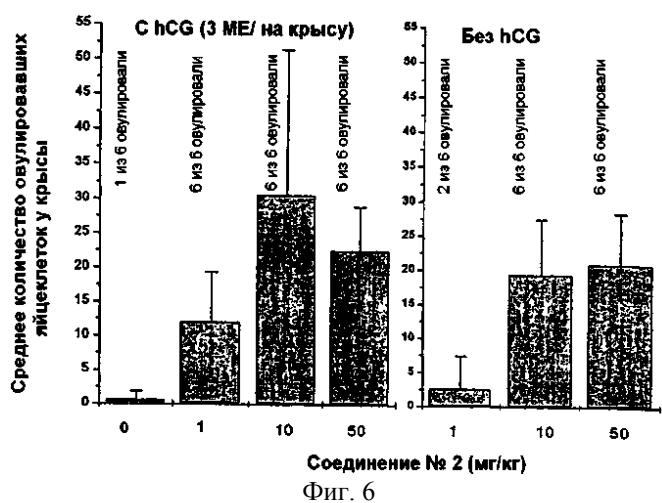
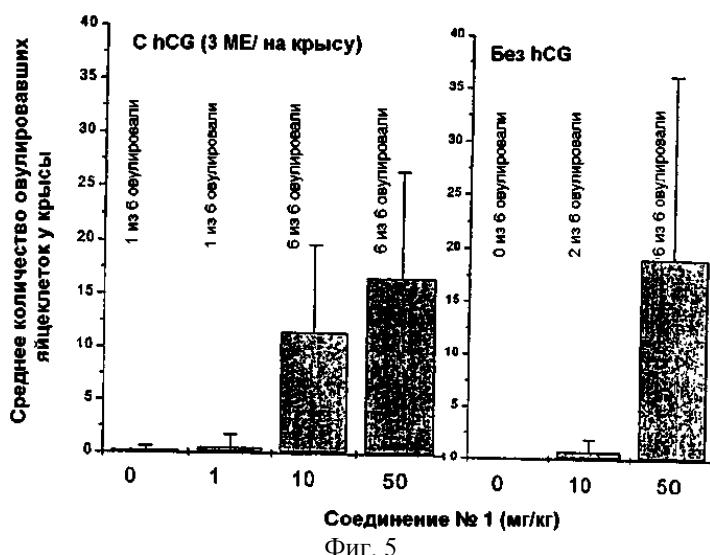
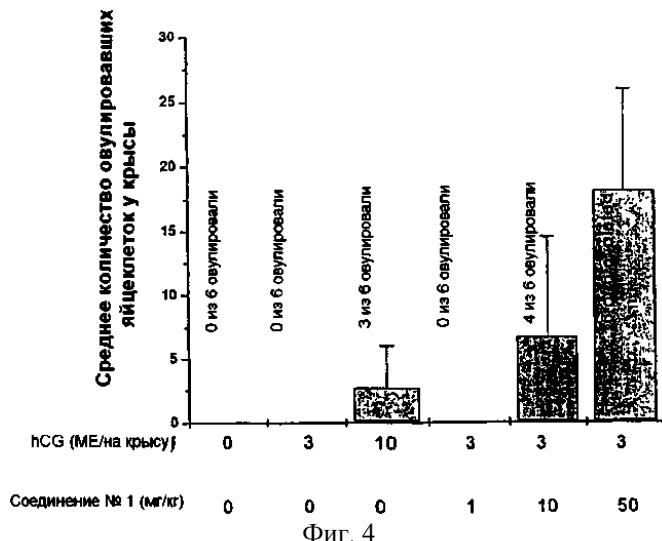
Фиг. 1

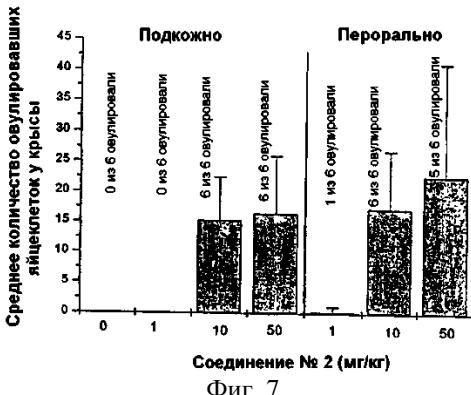


Фиг. 2

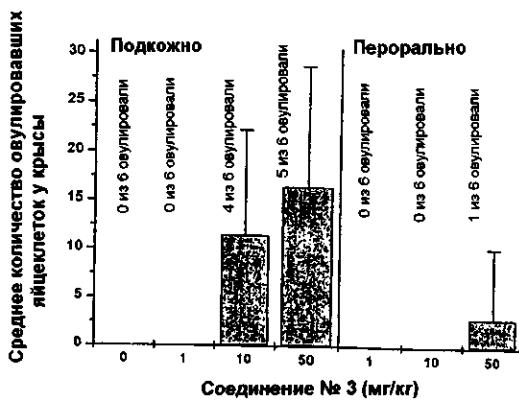


Фиг. 3

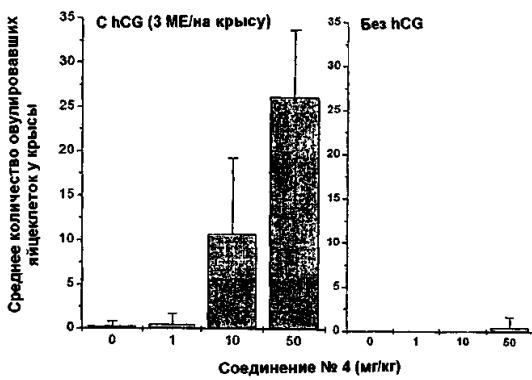




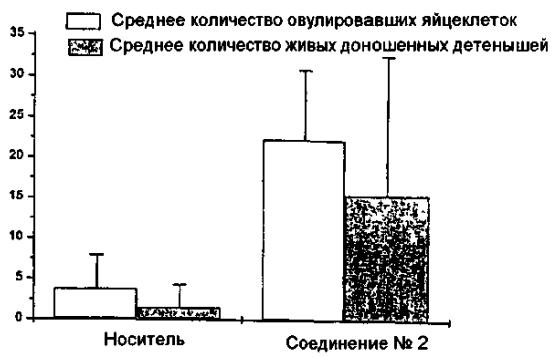
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2