



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 321663

(13) B1

(51) Int Cl.

A61K 45/00 (2006.01)
A61K 31/167 (2006.01)
A61P 15/08 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19993921	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.02.09 PCT/US98/02267
(22)	Inng.dag	1999.08.13	(85)	Videreføringsdag	1999.08.13
(24)	Løpedag	1998.02.09	(30)	Prioritet	1997.02.15, US, 800737
(41)	Alm.tilgj	1999.08.13			
(45)	Meddelt	2006.06.19			
(73)	Innehaver	Edelstam Inc , 15537 Village Park Court, Lake Oswego, OR 97034, US Greta Edelstam, Saltsjö-Duvnäs, SE			
(72)	Oppfinner	Greta Edelstam, Saltsjö-Duvnäs, SE			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS , Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Anvendelse av et lidokain for fremstilling av et preparat for å redusere fagocytose av spermatozoer.			
(56)	Anførte publikasjoner	FR 2704147 I. M. Oda et al., Journal of Submicroscopic cytology, vol. 14, 1982, s. 313-322 P. Jha et al., American Journal of Reproductive Immunology, vol. 36, 1996, s. 235-237 S. J. Bennett et al., Journal of Assisted Reproduction and Genetics, vol. 9, 1992, s. 271-273			
(57)	Sammendrag				

Anvendelse av et lokalt anestetikum for fremstilling av et medikament for anvendelse mot infertilitet eller for økt fertilitet. Oppfinnelsen angår også et farmasøytisk preparat omfattende en farmasøytisk effektiv dose av et lokalt anestetikum sammen med en farmasøytisk akseptabel eksipiens. Den angår også en fremgangsmåte for økt fertilitet hos en kvinne med det farmasøytiske preparat.

Teknisk område

Foreliggende oppfinnelse angår anvendelse av et lidokain for fremstilling av et preparat for å redusere fagocytose av spermatozoer for å øke fertilitet. Den angår
5 også anvendelse av en farmasøytisk effektiv konsentrasjon av lidokain sammen med en farmasøytisk akseptabel eksipiens ved fremstilling av et medikament for å redusere fagocytose av spermatozoer for å øke en kvinnes fertilitet i forhold til kvinnens nåværende fertilitet.

10

Oppfinnelsen bakgrunn

Infertilitet eller subfertilitet kan være et problem for mennesker rammet av dette. En vanlig behandling av infertile kvinner er IVF (*in vitro* fertilisering)-behandling.

15 Grunnlaget for IVF-behandlingen er som følger:

Stimulering av ovulasjon: daglige hormoninjeksjoner, ultralydundersøkelse og blodprøver.

Oocyttuttak: ultralydrettledet ovariepunksjon utført vaginalt under lokal anestesi.

20 Preparering av spermatozoer: "swim-up, swim-down"-spermieutvelgelse eller andre fremgangsmåter for å utvelge den optimale populasjon med den beste progressive motilitet.

In vitro fertilisering: inkubering av oocytter og den utvalgte populasjon av spermatozoer i en celleinkubator.

25 Direkte mikroskopisk inspeksjon av celledeling og utvelgelse av den mest vitale blastocytt.

Embryooverføring: 2-3 blastocytter med den beste vitalitet avleveres i livmorhulen for forhåpentlig implan- tasjon i endometriet. IVF-behandling er en kostbar metode som

30 for noen par initierer kompliserte psykologiske bieffekter. Den tekniske og kunstige måte å prøve å bli gravid på har ulempene for paret med å gå igjennom behandling som på en skadelig måte kan påvirke forholdet. Etter all den besværlige behandling er det bare en graviditetsfrekvens på 25 til 30 %, 35 hvilket medfører at de som ikke lykkes sitter igjen med et ødelagt forhold og fortsatt ingen barn. Kostnadene med IVF-behandling er ca. 20 000 - 25 000 SEK per menstruasjonssyklus.

På tross av mange tidligere studier er årsakene til

infertilitet under endometriose ikke klarlagt, ei heller
mangel på forbedret fertilitetsfrekvens etter behandling.
Spesielt er forholdet uklart mellom mild endometriose og sub-
fertilitet i fravær av adhesjon til bekkenet (Mahmood, TA,
5 Templeton A. Patophysiology of mild endometriosis: review of
literature. Human Reproduction 1990; 5:765-784).

Økt antall leukocytter er observert i peritoneal-
væsken (PF) hos pasienter med endometrielle peritoneale
implantater og antas å være en pågående steril inflammasjon
10 (Haney AF, Muscato JJ, Weinberg JB: Peritoneal fluid cell
populations in infertility patients. Fertil Steril 1981,
35:696-698; Edelstam GAB, Lundkvist OE, Venge P, Laurent TC:
Hyaluronan and myeloperoxidase in the peritoneal fluid during
genital inflammation 1994, 18:13-21). Det økte antall leuko-
15 cytter inneholder *in vivo* primede makrofager som sekreterer en
makrofagavledet vekstfaktor (MDGF) som kan forklare prolifer-
eringen av endometrievev (Halme J, White C, Kauma S, Esters J,
Haskill S: Peritoneal macrophages from patients with endo-
metriosis release growth factor activity in Vitro. J Clin
20 Endocrin and Metabolism. 1988;66:1044-49). Andre sekretoriske
produkter fra makrofagene, vekstfaktorer slik som TNF og
interferon, har gamettoksisitet og kan også ha en skadelig
innvirkning på fertilitetsprosessen (Halme J: Role of peri-
toneal inflammation in endometriosis -associated infertility.
25 Ann N Y Acad Sci 1991; 622:266-74).

Også den cellefrie peritonealvæske er viktig ved
redusert fruktbarhet, da det er vist at den betydelig
reduserer evnen til å plukke opp egg fra egglederes fimbria
(Suginami H, Yano K, Watanbe K, Matsnura S: A factor
30 inhibiting ovum capture by the oviductal fimbriae present in
endometriosis peritoneal fluid. Fertil Steril 1986; 46:1140-
1146). I peritonealvæsken fra pasienter med endometriose og
uforklarlig infertilitet er en redusert progressiv hastighet
av spermatozoer blitt funnet (Makarand K, Oak M, Chantler EN,
35 Vaughan Williams CA, Elstein M: Sperm survival studies in
peritoneal fluid from infertile women with endometriosis and
unexplained infertility. Clinical reproduction and fertility
1985; 3:297-303.). Enda mer interessant er den økte fagocytose

av spermatozon som er blitt funnet ved *in vitro* inkubering i 24 timer med peritonealvæske fra pasienter med endometriose (Muscato JJ, Haney AF, Weinberg JB: Sperm phagocytosis by human peritoneal macrophages: a possible cause of infertility in endometriosis. Am J Obstet Gynecol 1982; 144: 503-510). I den spesielle studie var det imidlertid flere forskjellige spermiedonorer og involverte immunologiske faktorer kan derfor ikke ekskluderes.

Teknikkens stand beskrives også i FR 2704147, S. J. Bennett et al., J. of Assisted Reprod. and Genetics, bind. 9, 1992, s. 271-273, P. Jha et al., Am. Journal of Reproductive Immunology, bind 36, 1996, s. 235-237 og I. M. Oda et al., Journal of Submicroscopic cytology, bind 14, 1982, s. 313-322.

15 Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse gjelder anvendelse av et lidokain for fremstilling av et preparat for å redusere fagocytose av spermatozoer for å øke fertilitet og anvendelse av en farmasøytisk effektiv konsentrasjon av lidokain sammen med en farmasøytisk akseptabel eksipiens ved fremstilling av et medikament for å redusere fagocytose av spermatozoer for å øke en kvinnes fertilitet i forhold til kvinnens nåværende fertilitet. Det er blitt funnet ved *in vitro* studier at fagocytose av spermatozoer reduseres av lidokain. Det antas at denne effekt av lidokain skyldes stabilisering av celledmembranen ved å forhindre økt Na^+ -permeabilitet og muligens ved å interferere med ATP i cellemembranen. Kostnadene ved denne behandling vil være ca. 10 % av IVF-behandling, f.eks. 2 500 SEK per menstruasjonssyklus. Den er ingen teknisk fertiliseringsprosess som kan medføre psykologiske bieffekter. Denne behandling kan forsøkes hos pasienter med endometriose og/eller lette mekaniske årsaker til infertilitet. Den kan utføres mens det ventes på IVF og påvirker ikke muligheten av en senere vellykket IVF-behandling.

Så langt er ingen behandling av infertilitet med lidokain rapportert i litteraturen. Andre farmasøytiske effekter av lidokain er imidlertid kjent, som f.eks. i EP 507 160, der det beskrives et eksternt preparat for påføring på huden

inneholdende; lidokain som omfatter et medikamentinneholdende lag plassert på et fundament. Preparatet bør anvendes for behandling av herpes zoster neuralgi og postherpetisk neuralgi.

5

Kort beskrivelse av figurene

Anvendt i figurene betyr "endometr" endometriose og "end-prob" mulig endometriose.

Figur 1 er en skjematisk fremstilling som viser
10 antall frie spermatozoer for hver dags inkubering; med cellemedium (A, kontroll), med cellemedium og lidokain (B), med peritonealvæske (C, kontroll) og med peritonealvæske og lidokain (D).

Figur 2 er en skjematisk fremstilling av antall
15 progressivt bevegende spermatozoer for hver dags inkubering; med cellemedium (A, kontroll), med cellemedium og lidokain (B), med peritonealvæske (C, kontroll) og med peritonealvæske og lidokain (D).

Figur 3 er en skjematisk fremstilling av antall ikke-
20 progressive men bevegelige spermatozoer for hver dags inkubering; med cellemedium (A, kontroll), med cellemedium og lidokain (B), med peritonealvæske (C, kontroll) og med peritonealvæske og lidokain (D).

Figur 4 er en skjematisk fremstilling av antall
25 levende men stasjonære spermatozoer vist for hver dags inkubering; med cellemedium (A, kontroll), med cellemedium og lidokain (B), med peritonealvæske (C, kontroll) og med peritonealvæske og lidokain (D).

Figur 5 er en skjematisk fremstilling av antall døde
30 spermatozoer vist per dags inkubering: med cellemedium (A, kontroll), med cellemedium og lidokain (B), med peritonealvæske (C, kontroll) og med peritonealvæske og lidokain (D).

Detaljert beskrivelse

35 Med henvisning til figurene 1-5, beskrives anvendelse av et lokalt anestetikum for fremstilling av et medikament for anvendelse mot infertilitet og for økt fertilitet. Eksempler på slike substanser er bupivakain (1-butyl-N-(2,6-dimetyl-

fenyl)-2-piperidinkarboksamid), lidokain (2-(dietylamin)-N-(2,6-dimetylfenyl)acetamid), mepivakain (N-(2,6-dimetylfenyl)-1-metyl-2-piperidinkarboksamid), prilokain (N-(2-metylfenyl)-2-(propylamino)propanamid) og ropivakain ((S)-N-(2,6-dimetylfenyl)-1-propyl-2-piperidinkarboksamid). Andre lokalanestetika kan også anvendes. I denne oppfinnelsen anvendes lidokain.

Et annet trekk ifølge foreliggende oppfinnelse er en anvendelse av en farmasøytisk effektiv konsentrasjon av lidokain sammen med en farmasøytisk akseptabel eksipiens ved fremstilling av et medikament for å redusere fagocytose av spermatozoer for å øke en kvinnes fertilitet i forhold til kvinnens nåværende fertilitet. Konsentrasjonen er en konsentrasjon som har en effekt på infertilitet hos en kvinne eller en konsentrasjon som øker fertiliteten hos en kvinne. Dosen og konsentrasjonen kan bestemmes av legen. Konsentrasjonen av lidokain er minst 5 µg/ml. Det kan anvendes 100-2000 µg i 1-20 ml, fortrinnsvis ca. 118 µg. Dosen som administreres er minst 100 µg, helst ca. 1000 µg.

Lidokain kan blandes med eksipienser som er farmasøytisk akseptable og kompatible med lidokainet og i mengder egnet for anvendelse. I tillegg kan, om ønskelig, preparatet inneholde små mengder hjelpestoffer som fukte- eller emulgeringsmidler, pH-buffermidler og lignende som øker effektiviteten av den aktive ingrediens.

Det farmasøytiske preparat ifølge oppfinnelsen kan omfatte farmasøytisk akseptable salter av komponentene. Farmasøytisk akseptable salter omfatter syreaddisjonssalter som dannes med uorganiske syrer, slik som f.eks. saltsyre eller fosforsyrer, eller slike organiske syrer som eddiksyre, vinsyre og mandelsyre.

Fysiologisk tolererbare bærere er vel kjente innen teknikken. Eksempler på bærere i væskeform er sterile vandige løsninger som ikke inneholder stoffer i tillegg til de aktive ingredienser og vann, eller inneholder en buffer slik som natriumfosfat ved fysiologisk pH-verdi, fysiologisk saltvann eller begge, slik som fosfatbufret saltvann. Videre kan vandige bærere inneholde mer enn ett buffersalt, så vel som salter slik som natriumklorid og kaliumklorid, dekstrose,

propylenglykol, polyetylen glykol og andre oppløselige stoffer.

Preparatet kan også omfatte hyaluronan som er en viskøs substans f.eks. i gelform. Hyaluronan gir en langsom frigivelse av den aktive substans hvilket er fordelaktig fordi befruktning kan finne sted opp til 24 timer etter ovulasjon og behandling ifølge oppfinnelsen. En annen fordel er at hyaluronan har en stimulerende effekt på spermene (Zimmerman ER, Drobnis E, Robertson KR, Nakajima ST, Kim H: Semen preparation with the Sperm Select system versus a washing technique.

10 Fertil Steril 1994; 61:269-275).

Infertilitet er vanligvis ikke ansett som en sykdom. Det beskrives også en fremgangsmåte for behandling av infertilitet hos en kvinne med et farmasøytisk preparat ifølge oppfinnelsen, kjennetegnet ved at det farmasøytiske preparat settes inn ved perturbasjon.

15 Det omtales spesielt en kosmetisk eller en ikke-terapeutisk fremgangsmåte mot infertilitet og for økt fertilitet der a) ovulasjon diagnostiseres, b) en behandling med et lokalt anestetikum gis når ovulasjon forventes ifølge trinn a).

Behandlingen utføres fortrinnsvis ved perturbasjon. Helst er trinnene som følger:

Spontan ovulasjon: primær behandling under normal menstruasjonssyklus. Stimulering bare hos anovulatoriske pasienter og primært med Clomifen (tabletter) som er lette og billige. En blodprøve er nødvendig etter ovulasjon for å bekrefte at det har vært en ovulasjon under behandlings- syklusen.

30 LH (luteiniserende hormon)-test: LH-toppen 24-36 timer før ovulasjon diagnostiseres ved en hjemmetest av en urinprøve.

Perturbasjon: Når LH-testen er positiv gis en pertubasjonsbehandling med f.eks. 10 ml av 100 µg/ml lidokain i fysiologisk NaCl eller Ringer-løsning under en normal gynekologisk undersøkelse. Det behøves ingen bedøvelse.

Fertilisering: Ingen kunstig behandling. Paret vil prøve å oppnå graviditet på normal måte ved samleie hjemme etter pertubasjonsbehandlingen er gitt.

Fravær av skadelige effekter på spermieoverlevelser viser at spermatozoene er upåvirket av lidokain hvilket også er vist i andre studier (Bennett SJ, Bolton V, Parsons J. The effects of lignocain on human sperm motility. J. Assisted
5 Reprod. & Genetics 1992; 9:271-3). Dette ser ut til å være tilfelle også for oocyttene da høye nivåer av lidokain er blitt målt uten noen problemer med fertilisering eller embryo-
utvikling (Bailey-Pridham DD, Cook CL, Reshef E, Hurst HE, Drury K, Yussman MA. Follicular fluid lidocain levels during
10 transvaginal oocyte retrieval. Fertil Steril 1990; 53:171-173). Det høyeste nivå var 118 µg/ml hvilket betyr at dosen på 1000 µg lidokain gitt ved *in vitro* inkubering bør kunne anvendes fortynnet til f.eks. 100 µg/ml i 10 ml isoton væske. Denne konsentrasjon vil nå anvendes i en klinisk studie av
15 graviditetsresultat etter perturbasjon utført 24 timer før ovulasjon for å øke spermieoverlevelse.

Lidokain er blitt anvendt i mange år uten noen rapporter på skadelige effekter under svangerskap hvilket også er blitt vist ved dyrestudier (Ramazzotto J, Curro FA,
20 Paterson JA, Tanner P, Coleman M. Toxicological Assessment of Lidocaine in the Pregnant Rat. J Dent Res 1985; 64:1214-1218 og bør derfor være mulig å anvende ved behandling av infertilitet hos pasienter med endometriose.

Oppfinnelsen illustreres ved det følgende eksempel.
25 Alle tekniske og vitenskapelige betegnelser som anvendes, der-
som ikke annet er definert, har til hensikt å ha den samme betydning som vanligvis forstås av fagpersoner innen tek-
nikken. Teknikkene anvendt i dokumentet er de teknikker som er kjent for fagpersoner innen teknikken dersom ikke annet er
30 beskrevet.

Eksempel 1 - reduksjon av fagocytose av spermatozoer i PF (peritonealvæske) hos kvinner med endometriose.

Denne studie ble gjenstand for ytterligere analyse av leukocyttfunksjonen ved redusert fertilitet under endometriose
35 og også leting etter en potensiell terapeutisk tilnærming. For å ekskludere immunologisk påvirkning deltok bare en spermie-donor i eksperimentene. Tilberedte spermieprøver ble inkubert med usentrifugert peritonealvæske fra friske kvinner og

kvinner med endometriose for å evaluere betydningen av fagocytose av spermatozoer på den reduserte fruktbarhet under endometriose. Antall levedyktige spermatozoer i inkuberingene ble telt daglig i fem dager med eller uten nærvær av lokale
 5 anestetika som ble tilsatt for å finne en fremgangsmåte for å redusere aktiviteten til de peritoneale leukocyttpopulasjoner.

Materialer og metoder

Pasienter

10 Kvinner: Pasientene ble inndelt i tre ulike grupper. Kontrollmaterialet (n = 9, gjennomsnittsalder = 38,5 år) bestod av kvinner som gjennomgikk laparoskopisterilisering eller kvinner med diffuse magesmerter. Kontrolltilfellene hadde laparoskopiske funn ansett som normale med anatomisk
 15 normal livmor og eggledere.

Undersøkelsesgruppen var kvinner som gjennomgikk laparoskopi for å finne årsaken til infertilitet eller magesmerter og der diagnosen var endometriose (N = 11, gjennomsnittsalder = 34,5 år). I denne gruppen var diagnosen laparoskopisk hos 8 pasienter og anamnestisk mulig endometriose hos
 20 3 pasienter, men disse hadde ennå ikke utviklet noen endometriotiske implantater som kunne ses ved laparoskopi.

Mann: Spermiedonoren var en frisk 38 år gammel mann med normal fertilitet med en kontinensperiode på 2-3 dager før
 25 hver spermieprøve. Spermieprøvene ble preparert ved "svømmeopp-teknikken" for å utvelge den optimale populasjon (Russel LD, Rogers BK. Improvement in the quality and fertilization potential of a human sperm population using the rise technique. J Androl 1987; 8:25).

30

Prøver av peritonealvæske innsamlet ved laparoskopi

Etter at pasientene var blitt anestisert, ble blodprøver tatt for senere analyser av hyaluronan, som kan være en markør i PF for pågående inflammasjon for å ekskludere en PID
 35 (pelvis inflammatorisk sykdom). Ved begynnelsen av laparoskopien med instrumentene forsvarlig i abdominal hull, ble all peritonealvæske som kunne frembringes i Douglas-posen aspirert med en sugende enhet gjennom et teflon-kateter (diameter 1,7

mm, Optinova, Godby, Finland) og blandet med 10 IU heparin per ml (Olive DL, Weinberg JB, Haney AF. Peritoneal macrophages and infertility: the association between cell number and pelvic pathology. Fertil Steril 1985; 44:772-777) i en

5 teflonflaske (Nalgene, Brochester, NY, USA) og umiddelbart tatt hånd om. Mengden peritonealvæske ble bestemt ved veiing på en elektrisk vekt. Teflon var det valgte materiale for inn-

10 samling av PF på grunn av dets lave adhesjon til pattedyr-celler (Grinnell F, Milam M, Srere PA. Studies on cell adhesion. Arch Biochem Biophys 1972; 153:193-198). Heparin ble anvendt som antikoagulasjonsmiddel for å forhindre aggregering av leukocytter (Makarand et. al. 1985). Tidligere er sitrat blitt anvendt (Edelstam et al. 1994) som har skadelige effekter på spermieviabiliteten under spermieinkuberingen.

15 Alle prøver ble tatt etter tillatelse fra pasientene og innsamlingsprosedyren var godkjent av den etiske komité, det medisinske fakultet, Uppsala universitet, Sverige.

Inkubering av spermatozoer og peritonealvæske

20 Teflonampuller ble anvendt ved alle inkuberinger som ble utført i en fuktig celleinkubator som følger:

a) cellemedium (1 ml), spermatozoer (10^6 i 1 ml cellemedium) og 0,1 ml NaCl.

b) cellemedium (1 ml), spermatozoer (10^6 i 1 ml cellemedium)

25 og 0,1 ml lidokain 10 mg/ml ("Xylocain", ASTRA).

c) spermatozoer (10^6 i ml cellemedium), peritonealvæske (1 ml) og 0,1 ml NaCl.

d) spermatozoer (10^6 i 1 ml cellemedium), 0,1 ml lidokain (10 mg/ml) og peritonealvæske (1 ml).

30 Earls cellemedium (Sigma) med 0,35 % BSA (bovint serumalbumin). Resten av peritonealvæsken ble sentrifugert og supernatanten fryst (-20 °C) for senere analyse av hyaluronan (Edelstam et al. 1994). Ampullene ble analysert daglig i løpet av fem dager og følgende ble telt i alle A-D-inkuberingene opp

35 til 100 spermatozoer:

antall frie spermatozoer ikke-adherente til leukocytter

antall spermatozoer med progressiv motilitet

antall spermatozoer med ikke-progressiv bevegelse
antall spermatozoer som er stasjonære og levende
antall døde spermatozoer

Også prosent levende peritoneale leukocytter ble
5 registrert daglig ved anvendelse av trypanblått.

Resultater

Hovedfunnet var at det var statistisk signifikant
færre fagocyterte spermatozoer ($p < 0,02$) i ampullene når de
10 ble inkubert med peritonealvæske og lidokain. Spermatozoer ble
observert fanget i store aggregater av leukocytter og noen
gjennomgikk tilsynelatende fagocytose følgelig ble antall frie
funksjonelle spermatozoer redusert.

Spermieoverlevelse med og uten endometriose. Etter to
15 dagers inkubering var det statistisk signifikant flere frie
spermatozoer i inkuberingene med peritonealvæske fra normal-
gruppen sammenlignet med endometriosegruppen (Kruskal Wallis
 $p < 0,014$). Spermieoverlevelse med og uten lidokain. Ingen
skadelige effekter ble funnet på spermieoverlevelse og det var
20 statistisk ingen signifikant forskjell mellom inkuberinger av
spermatozoer med eller uten lidokain etter 24 eller 48 timer.
P-verdien ifølge Wilcoxon vises henholdsvis i tabell I og II.

Spermieoverlevelse med og uten PF (peritonealvæske)
og lidokain, uavhengig av diagnose. Den progressive motilitet
25 reduseres raskere uten nærvær av peritonealvæske (fig. 2)
sammenlignet med inkubering av spermatozoer alene. Spermie-
overlevelse med og uten PF og lidokain, i endometriosegruppen.
I nærvær av peritonealvæske og lidokain var det signifikant
flere frie spermatozoer, spesielt etter to dagers inkubering i
30 endometriosegruppen. Figur 1 og tabell II.

Det var flere døde spermatozoer i inkuberingene med
lidokain over tid i begge diagnosegruppene. Figur 5, tabell
II.

Hyaluronankonsentrasjonene i peritonealvæsken viser
35 ingen indikasjoner på pågående inflammatorisk prosess, dvs.
bekrefter at alle pasientene var friske.

TABELL 1: P-verdier for de ulike parametre registrert i inkuberingene når med eller uten inkubering med lidokain sammenlignes. Data etter 24 timers inkuberingsperiode.

	Spermatozoer ± lidokain	Spermatozoer + PF normal, ± lidokain	Spermatozoer + PF endometr. ± lidokain	Samtlige pasienter uavhengig av diagnosen ± lidokain
Frie, ikke- adherente til leukocytter	–	Alle frie med og uten lidokain	0,59	0,27
Progressiv bevegelse	0,88	0,046 (a)	0,67	0,11
Ikke-progressiv bevegelse	0,59	0,59	0,79	0,58
Stasjonær	0,76	0,40	0,31	0,18
Immobil (død)	0,28	0,14	0,09	0,024 (b)
Leukocyt- viabilitet	–	0,26	0,29	0,92
Spermatozoer adherent til leukocytter	–	Ikke-adherent til leukocytter i begge grupper	0,68	0,80

a) flere progressivt bevegende spermatozoer i inkuberingen uten lidokain.

b) flere døde i lidokaingruppen

TABELL II. P-verdier for ulike parametere registrert i inkuberingene når med eller uten inkubering med lidokain sammenlignes. Data etter 48 timers inkubering.

	Spermatozoer ± lidokain	Spermatozoer + PF normal, ± lidokain	Spermatozoer + PF endometr. ± lidokain	Samtlige pasienter uavhengig av diagnosen ± lidokain
Frie, ikke- adherente til leukocytter	—	1,0	0,018 (d)	0,0021 (d)
Progressiv bevegelse	Ingen progressiv bevegelse med eller uten lidokain	1,00	0,89	0,95
Ikke-progressiv bevegelse	0,18	0,025 (c)	0,21	0,021 (c)
Stasjonær	0,78	0,26	0,58	0,22
Immobil (død)	0,50	0,038 (c)	0,003 (c)	0,57
Leukocyt- viabilitet	—	0,78	0,51	0,57
Spermatozoer adherent til leukocytter	—	1,00	0,53	0,63

c) flere i lidokain

d) flere frie i lidokaingruppen

Denne studie sammenligner effekten av lidokain på spermieoverlevelse og effekten på peritoneal leukocyt-fagocytose av spermatozoer *in vitro* under inkubering i fem dager. Studien omfatter bare en donor av spermatozoer for å unngå ulike immunologiske kombinasjoner som kunne ha vært ukontrollerte faktorer i eksperimentene. Denne studie følger også spermieoverlevelsen i opptil fem dager mens tidligere studier har undersøkt spermieoverlevelse i løpet av en 24 timers periode. Videre ble ikke bare antall frie ikke-fagocytterte spermatozoer telt, men også hvordan mange som viste progressiv eller stasjonær bevegelse så vel som antall levende, døde eller frie (dvs. ikke bundet til leukocytter) spermatozoer.

I denne studie ble tidligere funn beskrevet av Muscato et al. 1982 som angår redusert fertilitet hos endometriosepasienter på grunn av spermiefagocytose bekreftet. Økt fagocytosekapasitet hos peritoneale makrofager fra pasienter med endometriose er også blitt vist med fluorescente kuler (Samejima T, Masuzaki H, Ishimaru T, Yamabe T. Activity of Peritoneal Macrophages in Endometriosis. Asia Oceania J Obstet Gynaecol 1989, 15:175-181).

Andre studier av spermiefagocytose har ikke betraktet problemet med tap av leukocytter som adhererer til noe materiale mer enn til andre (Grinnell et al. 1972). Makarand et al. 1985 anvendte glassbeholdere for lagring av peritonealvæske. Glass har den høyeste adhesjon av leukocytter (Grinnell et al. 1972) og er blitt anvendt for å separere makrofager (Smedsroed B, Pertoft H. Preparation of pure hepatocytes and reticuloendothelial cells in high yield from a single rat liver by means of Percoll centrifugation and selective adherence. J Leukocyte Biol. 1985; 38). Muscato et al. 1989 valgte polypropylen som er et bedre alternativ enn glass med hensyn på celleadhesjonsproblemet, men mindre optimalt enn teflon.

Funnet av flere døde spermatozoer i inkuberingene med lidokain over tid må anses som en effekt av redusert spermiefagocytose i nærvær av lidokain, siden det ikke ble funnet noen skadelige effekter på spermatozoene i inkuberinger av

spermatozoer alene med eller uten lidokain. Dette må også være forklaringen på funnet av økt ikke-progressivt bevegende spermatozoer i lidokaininkuberingene (figur 3). Reduksjonen av progressiv motilitet uten nærvær av peritonealvæske kan være en indikasjon på at PF (peritonealvæske) inneholder substanser nødvendig for at spermatozoene skal bibeholde sin funksjon. Som nevnt i introduksjonen fuktes fimbria i egglederen konstant av peritonealvæske som reduserer evnen til å plukke opp egget hos pasienter med endometriose (Suginami et al. 1986). Som vist i denne og tidligere studier er leukocytene i peritonealvæsken hos pasienter med endometriose mer effektive til å fagocyttere spermatozoer (Muscato et al. 1982). Følgelig kan kvinner med endometriose ha to faktorer som bidrar til deres reduserte fertilitet. Denne studie antyder også muligheten av å anvende effekten av lidokain for å redusere fagocytosen av spermatozoer.

Kort oppsummert har denne studie vist en redusert fagocytose av spermatozoer i nærvær av lidokain. Dette fenomen må følges opp med randomiserte kliniske studier av pertubasjon med saltvann eller lidokain/saltvannsløsninger preovulatorisk (tidspunkt for LH-topp).

Mens foreliggende oppfinnelse er blitt beskrevet i henhold til foretrukne preparater og utførelsesformer, skal det forstås at spesielle substitusjoner og endringer kan gjøres i forhold til dette uten å avvike fra ånden og rammen av de følgende krav.

P a t e n t k r a v

1. Anvendelse av et lidokain for fremstilling av et
preparat for å redusere fagocytose av spermatozoer for å øke
5 fertilitet.

2. Anvendelse av en farmasøytisk effektiv konsentrasjon
av lidokain sammen med en farmasøytisk akseptabel eksipiens
ved fremstilling av et medikament for å redusere fagocytose av
10 spermatozoer for å øke en kvinnes fertilitet i forhold til
kvinnens nåværende fertilitet.

3. Anvendelse ifølge krav 2, der den farmasøytisk
effektive konsentrasjon er minst 5 µg/ml og lidokainet
15 anvendes sammen med et fysiologisk NaCl og et hyaluronan.

4. Anvendelse ifølge krav 2, der medikamentet
administreres til en kvinne før kvinnens ovulasjon.

20

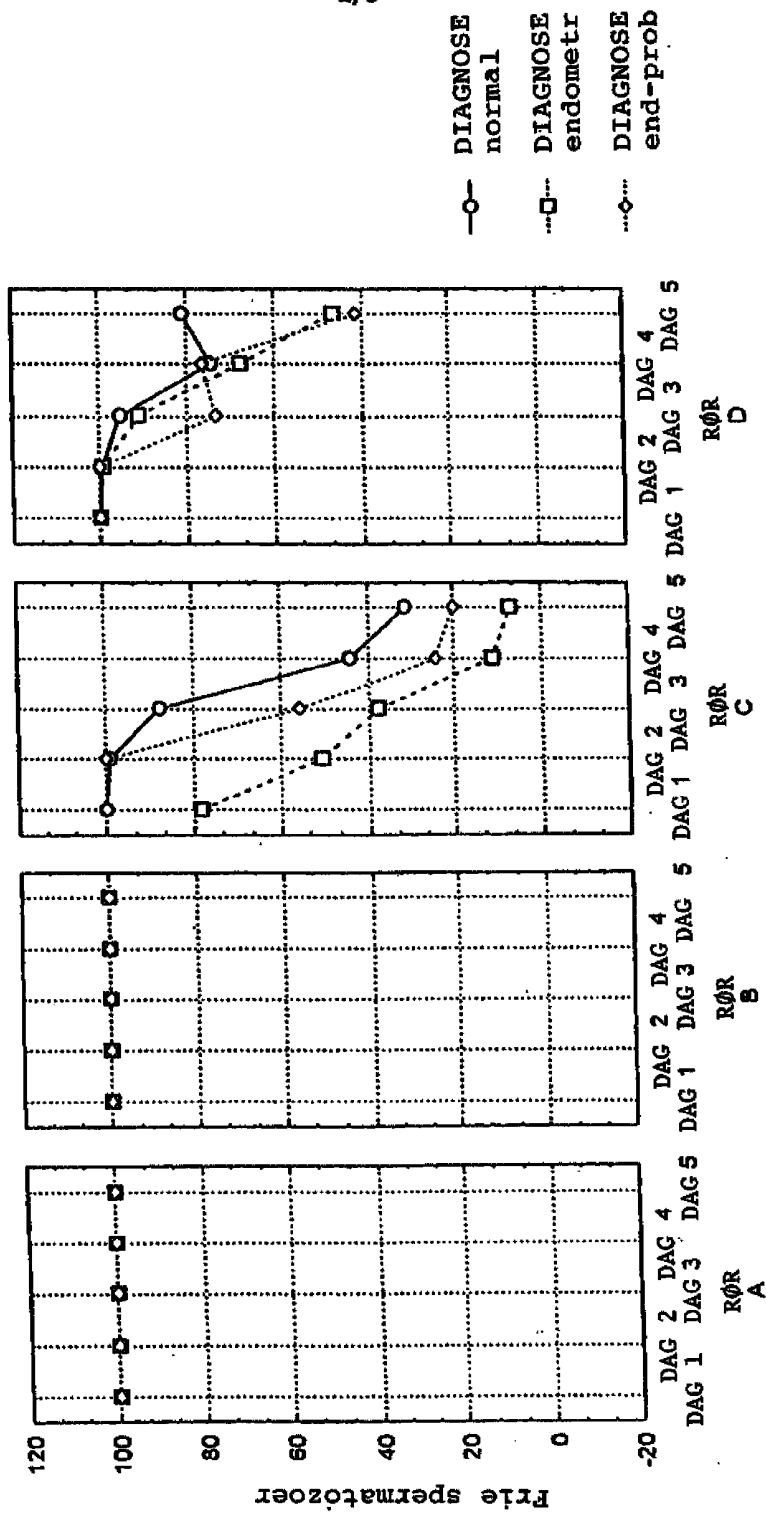
25

30

35

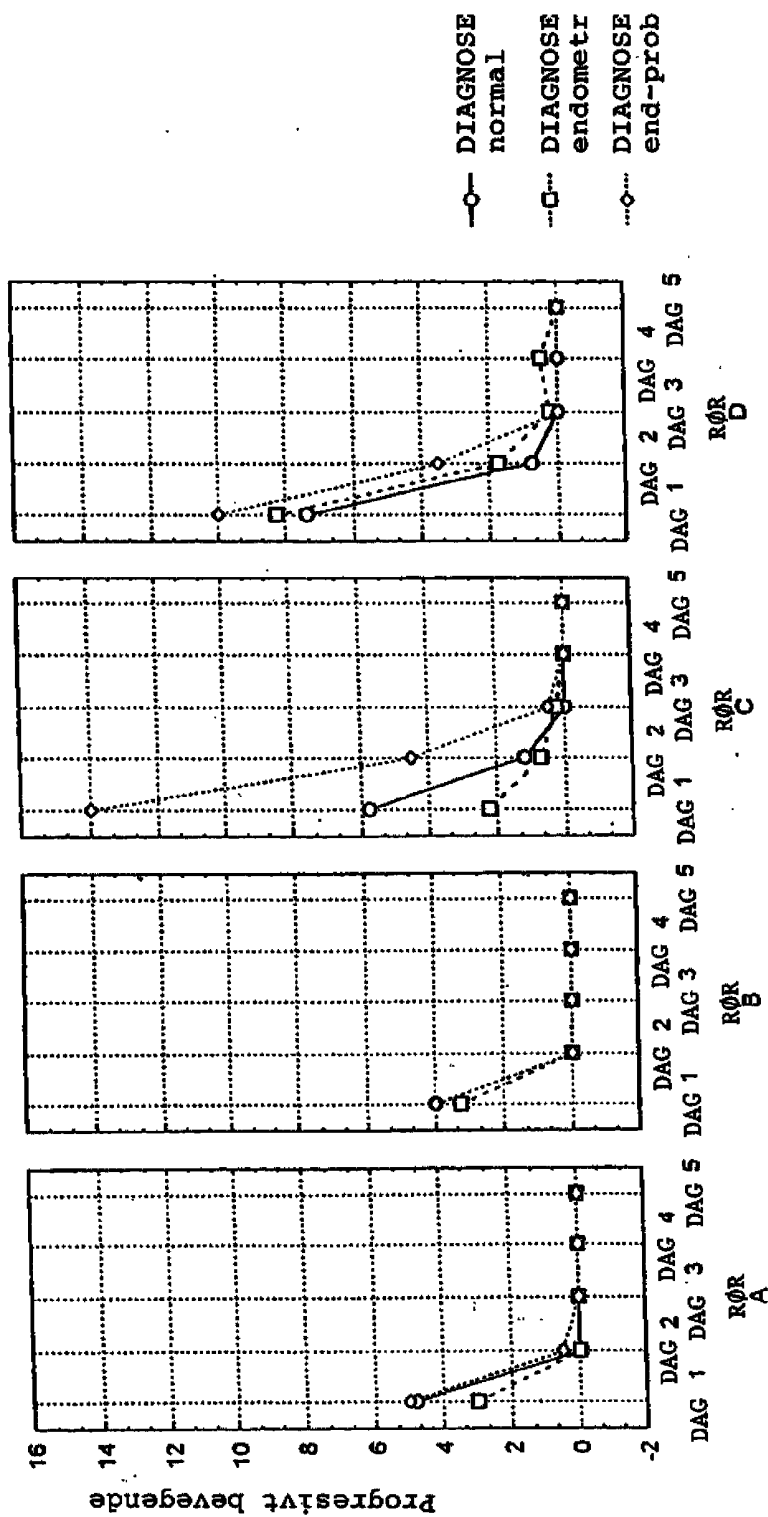
Plott av gjennomsnittsverdier
3-veis interaksjon

FIGUR 1



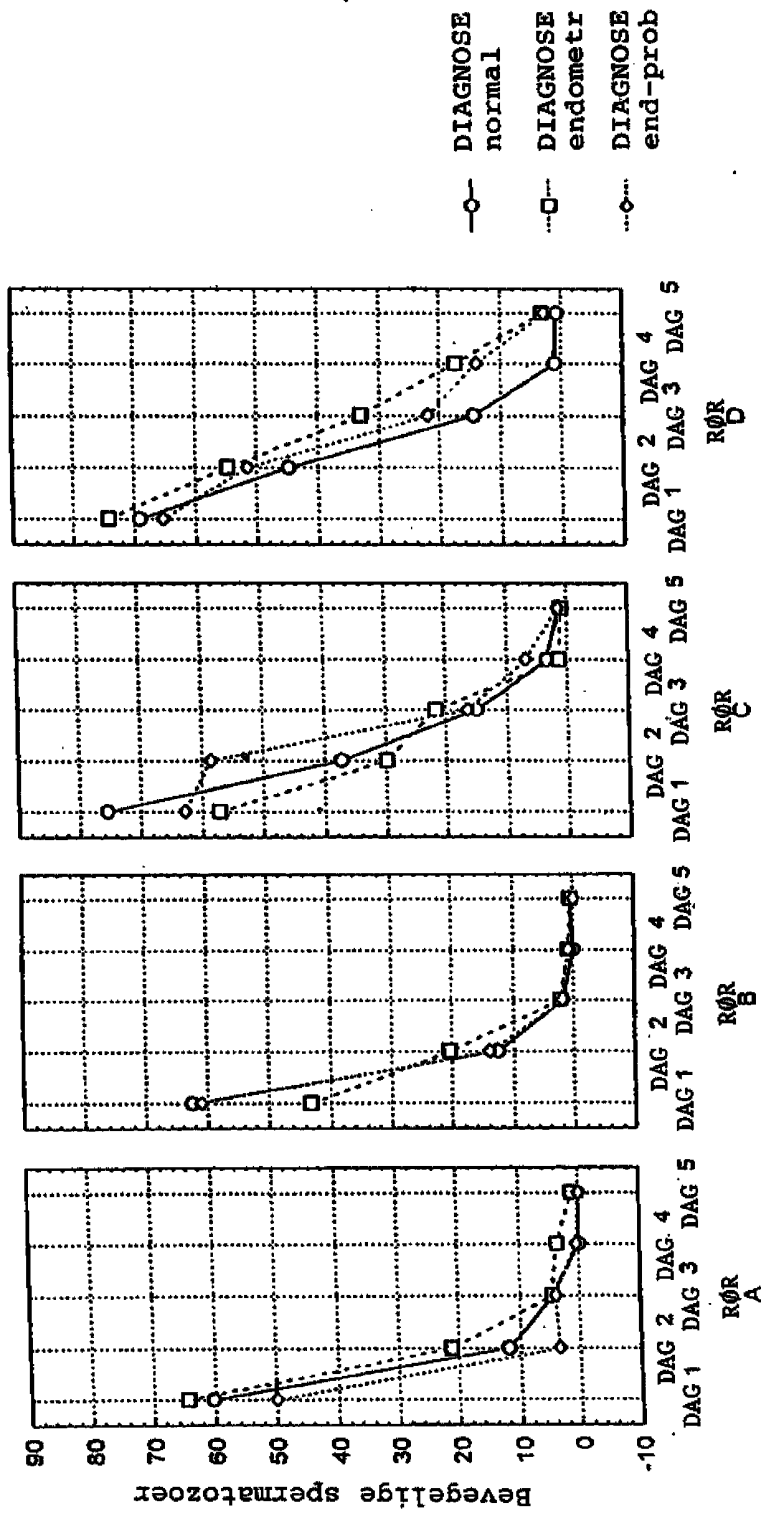
Plott av gjennomsnittsverdier
3-veis interaksjon

FIGUR 2



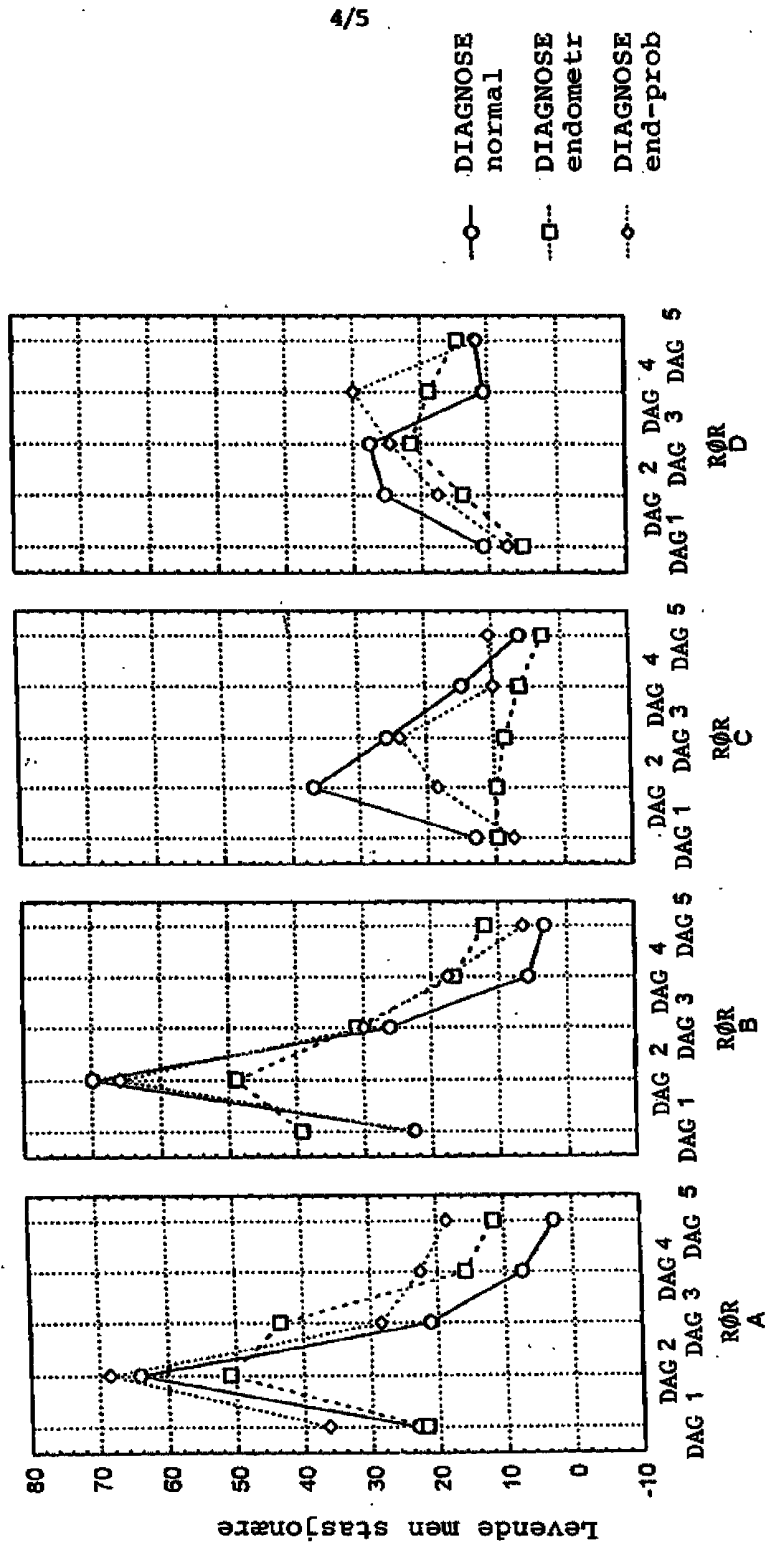
Plott av gjennomsnittsverdier
3-veis interaksjon

FIGUR 3



Plott av gjennomsnittsverdier
3-veis interaksjon

FIGUR 4



Plott av gjennomsnittsverdier
3-veis interaksjon

FIGUR 5

