

Данное изобретение относится к лечению женщин с недостаточностью репродуктивной функции (субфертильных) и бесплодных женщин с использованием гонадотропинов.

Относящиеся к овуляции расстройства присутствуют в случае приблизительно 15-25% пар, обращающихся по поводу оценки бесплодия (Hull, *Gynecol. Endocrinol.* 1:235-245 (1987); Speroff et al., *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, 5<sup>th</sup> Edition, Baltimore, Williams and Wilkins (1994)). Наиболее бесплодные пациентки с подавленной или прекращенной овуляцией относятся к категории группы ВОЗ II (WHO Scientific Group Report (B Lunenfeld, Chairman), WHO Techn. Rep. Ser. 514:1-28 (1973)), и подавляющее большинство этих женщин диагностируются как имеющие синдром поликистоза яичников (PCOS) (Hill et al., In *Gynecologic Endocrinology and Infertility*, AC Wenta, CM Herbert III, GA Hill (eds.) Baltimore, Williams and Wilkins, pp.147-160 (1988); Speroff et al., *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, 5<sup>th</sup> Edition, Baltimore, Williams and Wilkins (1994)). В случае этих пациентов лечением для индукции овуляции является в первую очередь антиэстроген, например цитрат кломифена, но в случае женщин с PCOS, у которых отсутствует овуляция (примерно 20% являются резистентными к кломифену) или не беременеют в ответ на повторяющиеся курсы цитрата кломифена, альтернативным способом лечения является обычно гонадотропиновая терапия (Franks and Gilling-Smith, *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 6:136-140 (1996); The ESHRE Capri Workshop, *Hum. Reprod.* 11:1775-1807 (1996)). Хотя было показано, что гонадотропины мочи применимы для индукции овуляции в пациентах PCOS (Balasch et al., *J. Assist. Reprod. Genet.* 13:551-556 (1996); Hamilton-Fairley et al., *Hum. Reprod.* 6:1095-1099 (1991); White et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:3821-3824 (1996)), r-FSH стал в настоящее время дополнительным полезным инструментом для индукции овуляции таких женщин в связи с его более высокой эффективностью (Balasch et al., (1998) (выше); Coelingh-Bennink et al., *Fertil. Steril.* 69:19-25 (1998)).

Наиболее важным принципом в индукции овуляции является обеспечение по возможности физиологического восстановления циклической функции яичника; в частности целью должно быть достижение овуляции единственного фолликула. Развитие множественных фолликулов является осложнением, которое является характерным для индукции овуляции экзогенными гонадотропинами, в частности у женщин, имеющих PCOS, которые являются очень чувствительными к стимуляции гонадотропином (Franks and Gilling-Smith, (1996) (выше)). Действительно, около 75% ятрогенных многоплодных беременностей были следствием индукции овуляции, тогда как остальные 25% являются результатом принудительных репродуктивных

способов (Levene et al., *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 99:607-613 (1992); Hecht, *Assist. Reprod. Rev.* 3:75-87 (1993); Evans et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.* 172:1750-1755 (1995); Corchia et al., *Am. J. Public Health* 86:851-854 (1996)). PCOS является также основным фактором риска для синдрома гиперстимуляции яичников (Schenker, *Hum. Reprod.* 8:653-659 (1993)).

Лечение снижения способности к воспроизведению (субфертильности) и бесплодия с использованием технологий принудительного воспроизведения (ART), таких как оплодотворение *in vitro* (IVF) и перенос зародыша (ET), требует стимуляции яичника для увеличения числа женских гамет и шанса успешного исхода лечения (Healy et al., *Lancet*, 1994, 343:1539-1544). В настоящее время, стандартная схема стимуляции яичника включает в себя фазу даун-регуляции (понижающей регуляции), в которой эндогенный лютеинизирующий гормон (LH) подавляют введением агониста гонадотропин-высвобождающего гормона (GnRH) с последующей фазой стимуляции, в которой развитие множественных фолликулов (фолликулогенез) индуцируют ежедневным введением экзогенного фолликулостимулирующего гормона (FSH). Другой альтернативой является начало стимуляции после спонтанной или индуцированной менструации и предотвращение появления несвоевременного выброса LH введением антагониста GnRH. При достижении адекватного развития фолликулов единственная доза мочевого человеческого хорионического гонадотропина (u-hCG) может быть введена для имитации выброса эндогенного LH и стимуляции созревания ооцита (Loumaye et al., *Human Reproduction Update*, 1995; 1:188-199).

С использованием общепринятой терапии, вводят суточную дозу FSK, пока не получают подходящую реакцию яичника. Этот подход включает в себя продолжительное подвергание действию высоких уровней FSH, что может препятствовать выбору доминантного зрелого фолликула и приводить к множественному фолликулярному развитию как первичных, так и вторичных фолликулов на протяжении стимуляции (Salat-Baroux et al., Submitted 1998 to Human Reproduction).

По мере развития способов лечения на протяжении нескольких последних лет первоначальная исходная доза FSH для IVF-обработки (оплодотворения *in vitro*) уменьшалась (например, первоначально вводили 225 МЕ в течение первых 5 дней с последующей адаптацией дозы, затем позднее вводили 150 МЕ в течение первых 6 дней с последующей адаптацией дозы).

Продолжительные введения низких доз гонадотропинов использовали широко на протяжении последнего десятилетия в схеме с увеличением дозы, в которой исходная доза FSH составляла 75 МЕ в день и постепенно (на полампулы в день) увеличивалась с 1-2-

недельными интервалами в попытке медленного и осторожного превышения индивидуального порога FSH для пополнения фолликулов (Balasch et al., *J. Assist Reprod. Genet.* 13:551-556 (1996); Hamilton-Fairley et al., (1991) (выше); White et al., (1996) (выше); Buvat et al., *Fertil. Steril.* 52:553-559 (1989); Sagle et al., *Fertil. Steril.* 55:56-60 (1991); Shoham et al., *Fertil. Steril.* 55:1051-1056 (1991); Homburg et al., *Fertil. Steril.* 63:729-733 (1995)). Однако низкодозовая увеличивающаяся гонадотропиновая терапия может все-таки приводить к сверхстимулированным циклам со множественным фолликулярным развитием в пациентах PCOS (Herman et al., *Hum. Reprod.* 8:30-34 (1993)). Так, небольшая серия, опубликованная до сих пор выдающейся группой медиков (Hamilton-Fairley et al., (1991) (выше); White et al., (1996) (выше)) и основывающаяся на 934 циклах обработки, показывает, что 20% из них были прекращены перед завершением, в большинстве случаев из-за того, что развивались более трех больших фолликулов. Имелись 72% овуляторных циклов, из которых 77% были моноовуляторными. В целом, эти данные указывают на то, что овуляцию единственного доминантного фолликула получают только в примерно 50% исходных циклах гонадотропиновой обработки (Hamilton-Fairley et al., (1991) (выше); White et al., (1996) (выше)).

С другой стороны, сообщалась низкодозовая понижающаяся схема, в которой большая доза гонадотропина (150-225 МЕ) дается в течение первоначальных 2 или 3 дней для имитации физиологической секреции высвобождения эндогенного FSH (Mizunuma et al., *Fertil. Steril.* 55:1195-1196 (1991); van Santbrink et al., *Hum. Reprod.* 10:1048-1053 (1995)). Это сопровождается либо подходом, аналогичным увеличивающемуся протоколу (Mizunuma et al., (1991) (выше)), или прогрессирующим уменьшением (каждые 3 дня) суточной дозы FSH до минимальной дозы 75 МЕ/день для получения подпороговой дозы, предназначенной для поддержания только роста основного фолликула (van Santbrink et al., (1995) (выше)). Первый выбор связан с низкой степенью (35%) развития единственного доминантного фолликула (Mizunuma et al., (1991) (выше)), тогда как второй привел к монофолликулярному росту в 62% из 234 циклов обработки (van Santbrink et al., (1995) (выше)), но он требует более интенсивного мониторинга (Franks & Hamilton-Fairley, *Ovulation induction: Gonadotropins*. In Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z (eds.), *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology*, Lippincott-Raven, Philadelphia, pp.1207-1223 (1996)), и его воспроизводимость может быть трудной для достижения в основном из-за продолжительной полужизни в организме препаратов FSH (Baird, *Use of gonadotropins to induce ovulation in polycystic ovary syndrome*. In Filicori M and Flamigni C (eds.) *The Ovary: Regulation, Dysfunction and Treatment*.

*Elsevier Science B.V., Amsterdam*, pp.391-401 (1996)).

Испытывались и другие схемы введения FSH. Sharma et al., (*Hum Reprod.*, 1987; 2:553-556) сравнивали реакцию на 150 МЕ FSH один раз в день и в чередующиеся дни против 300 МЕ FSH в чередующиеся дни в предварительно получавших GnRH пациентах. Однако это исследование выполняли на относительно небольшом числе пациентов, и, следовательно, эти результаты не могут оцениваться как позволяющие сделать окончательные выводы. Кроме того, это исследование проводили в 1987 году, когда были доступны только полученные из мочи препараты FSH.

Более недавно, Reddy et al. (1996, Abstracts of the 12<sup>th</sup> Annual Meeting of the EHSRE) испытывали безопасность и эффективность «дружественной для пользователя» (удобной для пользователя) понижающейся схемы введения в чередующиеся дни в мультицентровом исследовании в Великобритании. Стимуляцию sc Gonal-F<sup>®</sup> (рекомбинантным человеческим FSH) начинали при первоначальной дозе 450 МЕ/день в дни 1 и 3 с понижением дозы в день 5 до 300 МЕ/день. Схему с введением в чередующиеся дни 300 МЕ продолжали, пока не удовлетворялись критерии hCG. Средняя продолжительность введения Gonal-F<sup>®</sup> была 10 дней и средняя доза 1800 МЕ (эквивалент 24 ампулам по 75 МЕ), и 83,7% пациентов достигали введения hCG в день 12. Эта схема лечения привела к среднему 8,6 фолликулов  $\geq 14$  мм в диаметре в день введения hCG. Был сделан вывод, что может быть рекомендована упрощенная периодически понижающаяся схема введения, объединяющая высокую переносимость пациентом и пониженное потребление гонадотропинов, с частотой беременности, сравнимой с частотой общепринятых схем введения. Однако это исследование не включало в себя сравнительной группы, получающей обычную терапию IVF, для обеспечения контроля для оценки данных.

Lolis et al. (*Fertil. Steril.*, 1995; 63:1273-1277) показали, что однократная в/м-инъекция высокодозового болюса FSH в ранней фолликулярной фазе здоровой женщины индуцировала 3-дневное увеличение сывороточных концентраций FSH, и это было достаточным для стимуляции развития множественных фолликулов. Однако, кроме доминантного фолликула, эти фолликулы были неспособны поддерживать продуцирование эстрогена и превышать определенный размер в присутствии физиологических концентраций FSH. При применении более сильного стимула FSH посредством увеличения сывороточных концентраций FSH во время средней фолликулярной и поздней фолликулярной фаз введением дополнительных доз FSH наблюдали стационарное увеличение величин эстрадиола (E<sub>2</sub>) в сыворотке и пропорциональ-

ное увеличение числа преовуляторных фолликулов.

Хотя эти исследования предлагали использовать более высокие дозы FSH, вводимого при более продолжительных интервалах, было предположено, что суточная доза, превышающая 300 МЕ, является нецелесообразной (Lashen et al., J. Assist. Reprod and Genet. 1998, 15 (7): 438-443).

Существует потребность в улучшении протоколов стимуляции овуляции.

Согласно первому аспекту данного изобретения, представлен способ лечения бесплодия у женщин, включающий введение нуждающейся в этом женщине фолликулостимулирующего гормона (FSH) и/или его биологически активного аналога в первоначальной дозе в диапазоне от 100 до 600 МЕ с последующей второй дозой по меньшей мере 3 дня спустя в фазе стимуляции.

Для удобства подразумевается, что в последующем ссылка на FSH включает в себя и его биологически активные аналоги.

В применении здесь, «фаза стимуляции» обозначает точку в принудительном репродуктивном цикле (обычно для помощи субфертильным или бесплодным женщинам, чтобы они забеременели), в которой по мнению врача следует индуцировать фолликулогенез. Это может быть после достаточного подавления эндогенного LH (обычно введением агониста GnRH), например, когда уровень эстрадиола равен 200 пмоль и/или невозможно визуализировать рост фолликулов с использованием ультразвука, и/или, когда эндометрий является тонким. Альтернативно, это может быть после самопроизвольной или индуцированной менструации, с введением антагониста GnRH для предотвращения несвоевременного выброса LH.

В данном изобретении, термин «бесплодные» женщины включает женщин, у которых отсутствует овуляция, в том числе женщин с синдромом поликистоза яичника (PCOS), а также женщин с нормальной овуляцией, которые не могут забеременеть.

Введение FSH согласно данному изобретению может усиливать монофолликулярное развитие и уменьшать мультифолликулярное развитие, снижая шансы множественных беременностей. Кроме того, такое введение может приводить к более высокой частоте беременностей. Однако требуется меньшее число инъекций, что является существенным преимуществом для пациента. Инъекции могут вводиться самостоятельно, и, следовательно, уменьшенное число инъекций уменьшает шансы обработки, которая должна быть прервана из-за неудавшихся инъекций. Даже в том случае, когда инъекции вводятся несамостоятельно, данное изобретение обеспечивает преимущество, заключающееся в том, что требуется меньше визитов пациента в

клинику или визитов доктора или сестры к пациенту.

В одном варианте FSH находится для введения в дозе в диапазоне от 300 до 600 МЕ в каждый третий день в первые 6 дней фазы стимуляции. Эта доза составляет предпочтительно 400-500 МЕ, более предпочтительно 430-470 и наиболее предпочтительно около 450 МЕ. Этот вариант может обеспечить результаты, которые являются, по меньшей мере, такими же по фолликулярному развитию, что и при общепринятом введении 150 МЕ/день, а в действительности может приводить к более высокой частоте беременности. Однако, как обсуждалось здесь, требуется меньше инъекций (2 в сравнении с 6 для общепринятой схемы введения).

Согласно этому варианту данного изобретения FSH вводят каждый третий день фазы стимуляции. Предпочтительно, если введение выполняют в дни 1 и 4, хотя можно вводить FSH в дни 2 и 5 или 3 и 6.

После первых 6 дней фазы стимуляции FSH можно вводить при уровне, который должен быть определен врачом, достаточном для адекватного фолликулярного развития. Например, FSH может вводиться в суточной дозе 150 МЕ, если реакция яичников является адекватной, или в дозе 225 МЕ, если эта реакция является неадекватной. Если необходимо, эти дозы могут увеличиваться с приращениями, например, по 75 МЕ FSH/день.

В другом варианте, первоначальная доза находится в диапазоне от 100 до 500 МЕ, причем вторую дозу вводят предпочтительно спустя три-шесть и предпочтительно четыре дня. Первоначальная доза равна предпочтительно 200-400 МЕ, более предпочтительно 250-350 и наиболее предпочтительно около 300 МЕ.

В этом варианте вторая доза может находиться в диапазоне от 50 до 200 МЕ, предпочтительно 70-100 МЕ и наиболее предпочтительно равна около 75 МЕ. Этот вариант является эффективным, в частности, при усилении монофолликулярного развития и уменьшении мультифолликулярного развития. Вторую дозу предпочтительно повторяют один раз в день в течение 1-4 дней, предпочтительно 2 дней, после чего FSH может вводиться при уровне, который должен определяться врачом, для достижения достаточного фолликулярного развития. Например, FSH может вводиться при суточной дозе 75 МЕ, если реакция яичников является достаточной. Если необходимо, эта доза может быть увеличена с приращениями, например, по 37,5 МЕ FSH/день.

В этом варианте данного изобретения предпочтительно, если первоначальную дозу вводят в день 3, хотя ее можно также вводить в дни 1, 2 или 4.

После соответствующего фолликулярного развития, может быть введена однократная доза u-hCG или r-hCG или r-hLH для стимуляции

(провоцирования) созревания ооцита. Это может быть, например, когда наибольший фолликул достиг среднего диаметра по меньшей мере 18 мм; имеются по меньшей мере два других фолликула со средним диаметром  $\geq 16$  мм; и уровень  $E_2$  находится в приемлемом диапазоне для числа присутствующих фолликулов.

Данное изобретение может быть использовано для стимуляции множественного фолликулярного развития, предпочтительно перед оплодотворением *in vitro* (IVF) или интрацитоплазматической инъекцией спермы (ICSI), хотя это может быть перед природным оплодотворением.

LH, FSH и hCG могут быть получены из природных источников, например выделены из мочи, слизистой или плаценты, или могут быть получены с использованием технологии рекомбинантных ДНК (см. WO 85/01959 и Loumaye et al., Human Reprod., 11:95-107, 1996). Их биологически активные аналоги включают в себя мутеины, пептидные аналоги, непептидные аналоги и химеры. Примеры подходящих химер FSH описаны в WO-A-90/09800, WO-A-93/06844, WO-A-91/16922 и WO-A-92/22568. Предпочтительно, в данном изобретении используют FSH человека.

Лекарственное средство может быть упаковано таким образом, что оно обеспечивает только требуемую дозу FSH, например в однодозовом контейнере, таком как флакон. Однако FSH может вводиться два или более раз в течение дня при условии, конечно, что общее количество вводимого в течение дня FSH равно требуемой дозе, и это лекарственное средство упаковывается соответствующим образом, т.е. в многодозовый контейнер. Решения о приеме дозы будут приниматься врачом, вводящим лекарственное средство, и будут зависеть от таких параметров, как индекс массы тела (BMI), история болезни, реакция на лечение, период полужизни лекарственного средства и т.д.

Соединения, применимые в данном изобретении, могут быть приготовлены для введения любым подходящим путем, часто вместе с фармацевтически приемлемым и/или приемлемым в ветеринарии носителем. Предпочтительно, эти соединения готовят для парентерального введения.

Предпочтительно, FSH вводят подкожно, предпочтительно в переднюю брюшную стенку.

Композиции для парентерального введения обычно являются стерильными. Фармацевтические композиции, приспособленные для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические агенты и растворенные вещества, которые придают композиции изотоничность с кровью предполагаемого реципиента; водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие аген-

ты и загущающие агенты, также находятся в объеме данного изобретения. Эти композиции могут быть представлены в однодозовых или многодозовых контейнерах, например запаянных ампулах и герметизованных флаконах, и могут храниться в лиофилизированном состоянии, что требует только добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекционных растворов, непосредственно перед применением. Импровизированные инъекционные растворы и суспензии могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток. Композиции могут вводиться при помощи заранее заполненного шприца, аутоинъектора или многодозового аутоинъектора.

Пероральные и другие энтеральные композиции не должны быть стерильными и могут быть представлены в однодозовой или многодозовой форме. Пероральные композиции могут быть в форме твердых веществ, таких как порошки, гранулы, таблетки, капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы) или мазей, или жидкостей, таких как сиропы или эликсиры. Если необходимо, могут присутствовать наполнители и/или носители, и специалисты в области приготовления фармацевтических препаратов смогут получить такие дополнительные и альтернативные эксципиенты, какие могут быть необходимыми или желательными; одним из примеров являются ароматизаторы. Любая композиция, предназначенная для перорального введения, может быть приготовлена таким образом, что она будет энтерально устойчивой для возможности доставки в тонкую кишку во избежание или для ослабления какого-либо расщепления соединения (соединений), которое может иметь место в желудке или проксимальной части тонкой кишки. Таблетки или капсулы могут иметь энтеросолюбильное покрытие, например, нанесенное общепринятыми процедурами. Жидкие композиции могут быть эффективно сделаны энтерально устойчивыми благодаря включению подходящего агента или одновременному введению с подходящим агентом, например триглицеридами с цепью средней длины.

Энтеральные композиции, иные чем пероральные композиции, включают ректальные композиции, которые могут быть в форме суппозитория. Суппозитории обычно будут включать в себя основу для суппозитория, такую как масло какао. И в этом случае, конкретные композиции, содержащие активный ингредиент, могут быть рутинно приготовлены специалистами в области приготовления фармацевтических композиций.

Согласно второму аспекту данного изобретения представлен способ индукции фолликулогенеза у женщин с недостаточной репродуктивной функцией (субфертильных) или бесплодных женщин, включающий введение FSH и/или биологически активного аналога в первоначальной

дозе в диапазоне от 100 до 600 ME, с последующей второй дозой по меньшей мере спустя 3 дня в фазе стимуляции.

Предпочтительные признаки каждого аспекта данного изобретения являются такими же, что и признаки для каждого другого аспекта, в равной степени.

Все патентные и литературные документы в описании включены сюда в полном объеме, допускаемы законодательством в качестве ссылки.

Далее, настоящее изобретение будет описано дополнительно в следующих ниже неограничительных примерах.

#### Пример 1.

Следующее исследование было предназначено для (а) оценки множественного фолликулярного развития после введения г-hFSH с интервалами 3 дня в течение первых 6 дней стимуляции, с последующим ежедневным введением с 7-го дня и далее, в сравнении с ежедневным введением со дня 1, с использованием конечных точек эффективности, таких как общее число инъекций во время фазы стимуляции, кумулятивная доза г-hFSH и продолжительность лечения г-hFSH, и (b) демонстрации, что альтернативный режим дозировки будет приводить к по меньшей мере эквивалентной клинической эффективности, оцениваемой по эффективности конечных точек, например по числу фолликулов  $\geq 11$  мм и  $\geq 14$  мм в день 7 и день введения hCG и по числу извлеченных ооцитов.

В целом, пациенты, допущенные к этому исследованию, были бесплодными женщинами, желающими забеременеть, которым не удалось забеременеть после по меньшей мере одного года половой жизни без предохранения и для которых было обосновано ART (IVF, ICSI), при условии, что они соответствовали некоторым определенным специальным критериям, которые описаны более подробно ниже.

Гипофизарная даун-регуляция достигалась введением агониста GnRH перед обработкой г-hFSH. Схема введения дозы г-hFSH со дня 1 по день 6 фазы стимуляции соответствовала описанной выше. Следует отметить, что фиксированную общую дозу 900 ME FSH для всех пациентов вводили со дня 1 по день 6 включительно. Титрование дозы допускалось на основе индивидуальной реакции яичников (максимальная суточная доза 450 ME) со дня 7. Со дня 7 и далее, FSH вводили ежедневно при дозе, скорректированной для индивидуальной реакции яичника, пока фолликулярное развитие не было оценено как адекватное (с использованием оценки при помощи ультразвука яичника и концентрации эстрадиола ( $E_2$ ) в сыворотке). Для достижения окончательного фолликулярного созревания перед извлечением яйцеклетки (OPU) вводили мочевого человеческого хорионического гонадотропина (u-hCG) в однократной дозе 5000 ME. Определение эффективности

включало в себя мониторинг эндокринной реакции на г-hFSH посредством взятия проб крови для анализа  $E_2$ , FSH, LH и  $P_4$  в сыворотке, а также регулярное ультразвуковое исследование яичников во время фазы стимуляции. Конечные точки эффективности включают в себя общее число инъекций, общую кумулятивную дозу и продолжительность обработки. Конечные точки эффективности включают в себя число фолликулов  $\geq 11$  мм и  $\geq 14$  мм в день 7 и день введения hCG и число извлеченных ооцитов.

#### Выбор пациентов

Были выбраны 68 пациентов, которые удовлетворяли всем критериям включения в исследование.

Бесплодного пациента определяли как женщину, желающую забеременеть и не сумевшую забеременеть после по меньшей мере одного года половой жизни без предохранения. Это бесплодие должно дополняться по меньшей мере одним из следующих признаков и иметь основания для IVF-ET-лечения:

- трубный фактор. Критерии включения;
- слабый эндометриоз (стадия I или II классификации Американского Общества по бесплодию);

- мужское бесплодие (см. условия ниже);
- необъясненные причины.

- Партнер-мужчина с анализом спермы в пределах последних шести месяцев с  $\geq 1,0 \times 10^6$  подвижных сперматозоидов (степени А и В подвижности) на мл в эякуляте и частотой оплодотворения ооцитов  $\geq 20\%$  во время каждой из предыдущих попыток IVF (оплодотворения *in vitro*). Если эти критерии удовлетворяются, могут быть использованы регулярное осеменение (оплодотворение) или интрацитоплазматическая инъекция спермы (ICSI). Если эти критерии не удовлетворяются, пациент может участвовать в исследовании, но только в том случае, если используется ICSI.

- Возраст 18-38 лет.

- Беременность исключалась до начала пероральной контрацепции и/или терапии агонистом GnRH.

- Спонтанный овуляторный менструальный цикл 25-35 дней.

- Сывороточные уровни ранней фолликулярной фазы (дни 2-4), оцененные местной лабораторией, в пределах, определенных ниже:

- FSH менее 10 ME/л.

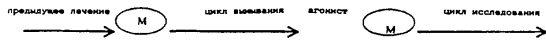
- LH менее 13,5 ME/л.

- PRL менее 800 ME/л.

- Присутствие обоих яичников.

- Не более трех предыдущих циклов принудительной репродуктивной технологии (ART) или не более трех предыдущих циклов ART с последней клинической беременностью.

- Имела по меньшей мере один цикл вымывания (WO-цикл) после последней ART и/или лечение цитратом кломифена или гонадотропином перед первым днем стимуляции (S1)



- Отсутствие предыдущих циклов принудительной репродуктивной технологии (ART), показывающих слабую реакцию на стимуляцию гонадотропином (определяемую как: созревание  $\leq 2$  фолликулов).

- Отсутствие истории умеренного или тяжелого синдрома яичниковой гиперстимуляции (OHSS).

- Полость матки без отклонений, которые могли бы ухудшить имплантацию эмбриона или развитие беременности, оцениваемая с использованием ультразвука (US) или гистероскопии (HSC) или гистеросальпингографии (HSG), выполняемых в пределах 5 лет перед первым днем цикла стимуляции.

- Отсутствие известной аллергии или гиперчувствительности к препаратам человеческих гонадотропинов.

- Нормальный цервикальный мазок на связанный с беременностью  $\alpha$ -протеин (PAP) (который берут, если этот тест не выполняли во время предыдущих 12 месяцев);

и которые не удовлетворяли любому из следующих критериев исключения из исследования:

- Любое противопоказание для беременности и вынашивания плода до срока родов.

- Внематочная беременность в последние 3 месяца.

- Клинически значимое системное заболевание.

- Индекс массы тела более 30 (рассчитанный как масса тела (кг), деленная на рост в квадрате ( $m^2$ )).

- Любое медицинское состояние, которое может препятствовать поглощению, распределению, метаболизму или экскреции FSH.

- Отклоняющееся от нормы гинекологическое кровотечение.

- История злоупотребления наркотиками, лекарственными средствами или алкоголем в пределах последних 5 лет.

Максимально за шесть месяцев перед началом даун-регуляции (терапии GnRH) оценивали следующее:

Демографические данные: дату рождения, рост, вес и расу.

Медицинское обследование, историю болезни до настоящего времени и физическое обследование: в том числе кровяное давление, частоту сердечных сокращений и общую информацию о здоровье. Отдельно отмечали курение.

Гинекологическую и акушерскую историю: обзор предыдущей гинекологической и акушерской истории болезни, в том числе данные из всех предыдущих ART-циклов.

Гинекологическое обследование: гинекологическое обследование (в том числе церви-

кальный мазок PAP, если его не выполняли в пределах последних 3 лет).

Диагностическую ультразвуковую эхографию: УЗ-обследование таза выполняли во время ранней фолликулярной фазы при помощи эндовагинального зонда. Описание обоих включенных яичников, длину в трех плоскостях, число фолликулов  $\leq 10$  мм, присутствующих на самом большом сечении через яичник, размер любых фолликулов  $\geq 11$  мм и размер любых яичниковых кист. Регистрировали размер матки (длину, высоту и ширину) и вид матки.

Лабораторный скрининг: брали два мл сыворотки и посылали в местную лабораторию для определения концентраций FSH, PRL и LH ранней фолликулярной фазы (дни 2-4 спонтанного цикла).

Анализ спермы: выполняли анализ спермы партнера-мужчины.

Пациентов случайным образом распределяли в соответствии с полученным при помощи компьютера случайным списком на две группы. 33 пациента относили к группе 1 (150 МЕ в день) и 35 пациентов относили к группе 2 (450 МЕ каждый третий день).

#### **Лекарственная терапия, введение и мониторинг**

Ацетат лейпрорелина, (Uno-Enantone<sup>®</sup>, Takeda) использовали в качестве агониста для десенсибилизации гипофизарных гонадотропных клеток. Его вводили в дозе 0,1 мл, содержащей 0,5 мг в день, подкожно (sc) в бедро один раз в день, начиная при средней лютеиновой фазе менструального цикла и заканчивая в день инъекции u-hCG. Гипофизарную десенсибилизацию подтверждали ультразвуковым сканированием и измерением уровня  $E_2$  в самые ранние 10 дней после начала обработки. Если у пациента не наблюдали понижающую регуляцию (даун-регуляцию) в это время, обработку одним лейпрорелином продолжали еще в течение 15 дней. В любом случае, даун-регуляцию подтверждали перед началом лечения сверховуляции.

После подтверждения даун-регуляции начинали лечение r-FSH (Gonal-F<sup>®</sup>, Serono). Gonal-F<sup>®</sup> вводили либо один раз в день, либо каждый 3-й день, соответственно, в виде sc-введения в живот.

Начальная фиксированная доза (в день S1) была 150 МЕ/день или 450 МЕ FSH/3-ий день в течение 6 дней (включительно). В день S7 (7 дней после начала лечения r-hFSH) дозы приспосабливали в соответствии с реакцией яичников, наблюдаемых при помощи УЗИ и уровней  $E_2$  в сыворотке. В этой связи, в дни S1, S5, S7 и каждый раз, когда пациента наблюдали в центре для мониторинга, в том числе в день введения u-hCG, брали пробу крови, центрифугировали и сыворотку (2 мл) использовали для немедленной оценки в местной лаборатории для анализа  $E_2$ , P<sub>4</sub>, LH и FSH. Ультразвуковые обследования

выполняли с использованием эндовагинального зонда в те же самые дни, что и измерения  $E_2$ . В каждом случае измеряли все фолликулы со средним диаметром  $\geq 11$  мм.

Gonal-F<sup>®</sup> поставлялся в ампулах, содержащих 150 МЕ FSH, 30 мг сахарозы и фосфатный буфер в лиофилизированной форме. Число ампул, требуемое для дневной дозы, восстанавливали водой для инъекций и инъецировали подкожно (sc) сразу же после этого. Следующая таблица показывает конкретное разведение, требующееся при приготовлении дозы для введения:

Таблица 1

| Доза (МЕ) | Число ампул по 150 МЕ FSH | Число мл разбавителя | Объем инъекции (мл) |
|-----------|---------------------------|----------------------|---------------------|
| 150       | 1                         | 1                    | 1                   |
| 225       | 2                         | 1,33                 | 1                   |
| 300       | 2                         | 1                    | 1                   |
| 375       | 3                         | 1,2                  | 1                   |
| 450       | 3                         | 1                    | 1                   |

Дозу FSH корректировали на 7-ой день лечения в соответствии с реакцией яичников. В обеих группах, если реакция яичников была достаточной, использовали дозу 150 МЕ. В обеих группах, если реакция яичников была неадекватной, использовали дозу 225 МЕ. Затем, если дозу увеличивали, приращение было только по 75 МЕ FSH/день над предыдущей дозой. Таким образом, дозы были: 150, 225, 300, 375 и 450 МЕ FSH/день.

Однократную подкожную (sc) инъекцию 5000 МЕ u-hCG (Profasi<sup>®</sup>, Serono) вводили на следующий день после последнего введения r-hFSH и GnRH, когда: наибольший фолликул достигал среднего диаметра по меньшей мере 18 мм; присутствовали по меньшей мере два других фолликула со средним диаметром  $\geq 16$  мм; и когда уровень  $E_2$  был в приемлемом диапазоне для числа присутствующих фолликулов. Profasi<sup>®</sup> поставлялся в ампулах, содержащих 5000 МЕ u-hCG и 10 мг лактозы в виде лиофилизованного порошка для подкожного (sc) введения. Одну ампулу u-hCG восстанавливали 1,0 мл солевого раствора для инъекции (0,9% NaCl) и объем 1,0 мл инъецировали подкожно (sc) сразу же после этого.

Через 34-38 ч после введения u-hCG ооциты извлекали либо абдоминально, либо вагинально под ультразвуковым мониторингом. Затем ооциты оплодотворяли *in vitro* и эмбрионы возвращали на место спустя 2-3 дня после извлечения ооцитов. Возвращали на место не более трех эмбрионов.

Следующую информацию регистрировали.

Число ооцитов: регистрировали общее число извлеченных ооцитов, в том числе поврежденных и незрелых.

Зрелость ядер ооцитов: зрелость ядер ооцитов оценивали каждый раз, когда это было возможным. Ооциты классифицировали как ядро яйцеклетки (ядро яйцеклетки или ядро

ооцита человека является более или менее сферическим по форме и обычно содержит одно, экзоцентрически расположенное ядрышко. Ядро яйцеклетки само расположено в центре ооплазмы в ранних незрелых ооцитах и становится расположенным более экзоцентрически непосредственно перед распадом ядра яйцеклетки), метафазу I (ооцит метафазы I характеризуется отсутствием его связи с первым полярным телом или ядром яйцеклетки. Под световым микроскопом, типичный ооцит метафазы I (промежуточный ооцит) обнаруживает (а) отсутствие первого полярного тела и отсутствие ядра яйцеклетки; (b) ооплазму, которая является круглой и ровной, обычно слегка окрашенной, но иногда слегка гранулярной) или метафазу II (типичный ооцит метафазы II (зрелый; преовуляторный) обнаруживает (а) выпяченное первое полярное тело, (b) ооплазму, которая является круглой и ровной, слегка окрашенной и гомогенной по гранулярности).

Дегенеративные или атрезированные ооциты (нежизнеспособные):

Регистрировали присутствие дегенеративных или атрезированных ооцитов. Дегенеративные ооциты могут проявлять любое из ядерных состояний, описанных выше. Дегенерация и атрезия могут иметь место в ооците в любой временной точке во время процесса созревания в фолликуле, от незрелых стадий до послезрелых стадий. Дегенерация обуславливает множественные аномальные морфологические аспекты в аспирированных ооцитах от потемневшей и вакуолизированной ооплазмы до хрупкости поддерживающих структур, особенно блестящей зоны. Возможно, дегенеративный или атрезированный ооцит легче всего идентифицировать вследствие его в существенной степени отклоняющихся от нормы аспектов. Под световым микроскопом, дегенеративный или атрезированный ооцит может обнаруживать (а) любую форму ядерного состояния (полярное тело, ядро яйцеклетки, отсутствие полярного тела и ядра яйцеклетки, или невозможность идентификации), (b) ооплазму, которая имеет цвет от коричневого до черного и имеет очень неправильную форму.

Число осемененных ооцитов: регистрировали число осемененных ооцитов.

Характеристики спермы и осеменение: регистрировали тип осеменения (нормального или ICSI). Для нормального осеменения регистрировали плотность подвижных сперматозоидов в чашке для оплодотворения. В случае осеменения при помощи интрацитоплазматической инъекции спермы (ICSI) регистрировали источник сперматозоидов (эякулят, эпидидимис или яичко).

Оплодотворение и развитие зародыша: в день 1 после ОПУ оценивали оплодотворение и регистрировали число яйцеклеток, имеющих один, два или много пронуклеусов. В день 2

после OPU документировали число подвергнутых дроблению эмбрионов, число вытесненных эмбрионов, стадию развития и морфологический балл каждого эмбриона во время переноса и выход каждого типа эмбрионов (перенесенных, замороженных или выброшенных).

Система оценки была следующей.

Оценка А: эти эмбрионы обнаруживают blastomeres одинакового размера почти сферического вида с умеренной преломляющей способностью (т.е. не очень темные) и с интактной зоной. Следует принимать в расчет вид blastomeres, которые находятся в процессе деления или которые делились асинхронно с их одновременно образующимися копиями, например эмбрионами из 3, 5, 6 или 7 клеток. Они могут быть неоднородными, но совершенно нормальными.

Оценка В: эти эмбрионы имеют более неоднородные или имеющие неправильную форму blastomeres, с небольшой изменчивостью в преломляющей способности и с фрагментацией blastomeres не более 10%.

Оценка С: эти эмбрионы обнаруживают фрагментацию не более 50% blastomeres. Остальные blastomeres должны быть, по меньшей мере, в умеренном (оценка В) состоянии и иметь преломляющую способность, ассоциированную с жизнеспособностью клеток; блестящая зона должна быть интактной.

Оценка D: эти эмбрионы обнаруживают фрагментацию более 50% blastomeres, некоторые из которых могут быть чрезвычайно различными в преломляющей способности. Любые остальные blastomeres должны быть жизнеспособными.

Природный прогестерон (Utrogestan®: 3x200 мг/день) вводили вагинальным путем в качестве поддержания лютеиновой фазы, причем введение начинали после OPU (извлечения зрелой яйцеклетки). Лечение прогестероном продолжали до менструации или, если пациентка была беременной, в течение по меньшей мере первых трех недель беременности.

Беременность диагностировали следующим образом. Если у пациентки не было менструаций, брали пробу крови после приблизительно пятнадцати дней после дня введения u-hCG для оценки содержания hCG в сыворотке. Оценку hCG повторяли в день 23-25, если концентрация в сыворотке была  $\geq 10$  МЕ/л. Ультразвуковое сканирование выполняли между днем u-hCG 35 и 42 у всех пациенток, которые беременели, при условии отсутствия выкидыша. Число blastocysts и активность сердец эмбрионов регистрировали.

Табл. 2 суммирует оценки, сделанные во время периода лечения.

Таблица 2

|   | Тест на беременность | Е <sub>2</sub> | Ультразвук | Сывороточный hCG | FSH | P <sub>4</sub> | LH |
|---|----------------------|----------------|------------|------------------|-----|----------------|----|
| Агонист GnRH  | X                    |                |            |                  |     |                |    |
| Между днем 10 и днем 25 даун-регуляции агонистом GnRH |                      | X              | X          |                  | X   | X              | X  |
| S1 (начало обработки r-hFSH)                          |                      | X              | X          |                  | X   | X              | X  |
| S5  |                      | X              | X          |                  | X   | X              | X  |
| S7  |                      | X              | X          |                  | X   | X              | X  |
| S <sub>n</sub>  |                      | X              | X          |                  | X   | X              | X  |
| День hCG  |                      | X              | X          |                  | X   | X              | X  |
| День 15-20 (если нет менструации)                     |                      |                |            | X                |     |                |    |
| День 23-25*   |                      |                |            | (X)*             |     |                |    |
| День 35-42 (беременные) **                            |                      |                | (X)**      |                  |     |                |    |

\* если первый сывороточный hCG  $\geq 10$  МЕ/л

\*\* если есть беременность.

Пробы сыворотки получали и хранили следующим образом. Для получения 3,5 мл сыворотки минимально 7 мл венозной крови брали в соответствии со стандартной процедурой во временных точках, приведенных в табл. 2 выше. Пробы крови свертывались в течение 1 ч при комнатной температуре, их центрифугировали и сыворотку переносили в виде 1 аликвоты 2,5 мл (в вакутейнере на 5,0 мл) и 1 аликвоты 1 мл. Аликвоту 2,5 мл использовали для анализа параметров непосредственно после приготовления: сохраняемую пробу 1 мл хранили в замороженном виде при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Глубокое замораживание этой сыворотки выполняли как можно быстрее после центрифугирования, но в пределах 4 ч после взятия проб.

Пробы FSH брали следующим образом. 3 мл крови брали во временных точках, приведенных в табл. 2 выше, и обрабатывали, как описано выше. Сыворотку переносили в 2 аликвоты по меньшей мере 500 мкл, одну из которых поддерживали в замороженном виде при  $-20^{\circ}\text{C}$ , в виде сохраняемой пробы. Способами, используемыми для определения гормонов, были следующие:

E<sub>2</sub>: ACS 180 Chiron Chemiluminiscent, ELISA.

P<sub>4</sub>: ACS 180 Chiron Chemiluminiscent, ELISA.

FSH: ACS 180 Chiron Chemiluminiscent, ELISA.

LH: ACS 180 Chiron Chemiluminiscent, ELISA.

PRL: ACS 180 Chiron Chemiluminiscent, ELISA.

Результаты

Результаты этого исследования показаны в таблицах ниже. Статистический анализ выполнялся Serono Corporate Biometrics, с использованием статистической программы SAS (SAS Institute, NC, USA).

Обе лечебные группы имели сравнимые демографические данные. Общая кумулятивная доза FSH, требующаяся для завершения стимулирующего лечения, является также высоко сравнимой. Однако число инъекций, которым должен быть подвергнут пациент для получения адекватной стимуляции, является статистически



различным (величина  $p$ : 0,0001). Для сравнительной лечебной группы, среднее число инъекций равно 10,5 (ст. откл. 2,4), тогда как для группы с лечением чередующимися дозами, среднее число инъекций равно 6,9 (ст. откл. 2,2).

Число ооцитов, получаемых из обеих лечебных групп, является сравнимым, что отражено в сравнимом числе осемененных ооцитов: среднее число в сравнительной группе равно 7,7 (ст. откл. 5,2) в сравнении со средним числом группы с чередующимися дозами 6,9 (ст. откл. 3,1). Число криосохраняемых эмбрионов и жизнеспособных эмбрионов было статистически значимым в пользу сравнительной группы (величины  $p$  0,0238 и 0,0319, соответственно). Однако качество перенесенных эмбрионов обнаружило тенденцию большего числа эмбрионов с оценкой А, перенесенных в группе с чередующимися дозами, хотя оно не достигало статистической значимости в пользу лечебной группы с чередующимися дозами (величина  $p$ : 0,0561) со средней частотой имплантации 181 для этой группы по сравнению со средней частотой имплантации 5% при сравнительном лечении.

Кроме того, что клинически наиболее важно (см. таблицу 5 - Биохимические и клинические беременности), различие в числе биохимических беременностей является статистически высокозначимым (величина  $p$ : 0,0038) в пользу лечебной группы с чередующимися дозами: среднее число биохимических беременностей 39,4% по сравнению всего лишь с 8,6% в сравнительной лечебной группе. Это приводило к частоте клинических беременностей, которое опять было статистически значимо (величина  $p$ : 0,0105) в пользу лечебной группы с чередующимися дозами: среднее число клинической беременности 30,3% для лечебной группы с чередующимися дозами по сравнению с 5,7% для сравнительной лечебной группы. Эти данные в сильной степени предполагают, что профиль сывороточного FSH, достигаемый с использованием нового режима, неизбежно приводит к более высокому качеству, более жизнеспособным ооцитам.

Таблица 3. Суммарная статистика

| Переменная                           | Случайная обработка |        |         |       |      |       | 150 ME |        |         |       |      |       | 450 ME |        |         |      |      |        | Велич. р* |
|--------------------------------------|---------------------|--------|---------|-------|------|-------|--------|--------|---------|-------|------|-------|--------|--------|---------|------|------|--------|-----------|
|                                      | N                   | Отсут. | Среднее | SD    | Мин. | Макс. | N      | Отсут. | Среднее | SD    | Мин. | Макс. | N      | Отсут. | Среднее | SD   | Мин. | Макс.  |           |
| Возраст (лет)                        | 35                  | 0      | 31,5    | 4,8   | 20   | 39    | 33     | 0      | 31,1    | 3,4   | 23   | 38    | 0      | 31,1   | 3,4     | 23   | 38   | 0,7169 |           |
| Продолжительность бесплодия (месяцы) | 32                  | 3      | 30,0    | 33,2  | 12   | 120   | 32     | 1      | 47,0    | 29,0  | 13   | 125   | 0      | 47,0   | 29,0    | 13   | 125  | 0,7016 |           |
| Число предыдущих ART                 | 35                  | 0      | 0,8     | 1,0   | 0    | 3     | 33     | 0      | 0,7     | 0,9   | 0    | 3     | 0      | 0,7    | 0,9     | 0    | 3    | 0,5629 |           |
| Кумулятивная доза FSH (ME)           | 35                  | 0      | 1748,6  | 630,9 | 900  | 3675  | 33     | 0      | 1743,2  | 538,3 | 1050 | 3675  | 0      | 1743,2 | 538,3   | 1050 | 3675 | 0,9700 |           |
| Число инъекций                       | 35                  | 0      | 10,5    | 2,4   | 6    | 17    | 33     | 0      | 6,9     | 2,2   | 3    | 13    | 0      | 6,9    | 2,2     | 3    | 13   | 0,0001 |           |
| Число фолликулов >11 мм              | 35                  | 0      | 10,9    | 3,7   | 4    | 21    | 33     | 0      | 10,2    | 2,9   | 5    | 16    | 0      | 10,2   | 2,9     | 5    | 16   | 0,3872 |           |
| Число фолликулов >14 мм              | 35                  | 0      | 10,1    | 4,0   | 4    | 21    | 33     | 0      | 9,0     | 2,5   | 5    | 14    | 0      | 9,0    | 2,5     | 5    | 14   | 0,1881 |           |
| Число полученных ооцитов             | 35                  | 0      | 10,7    | 6,3   | 0    | 26    | 33     | 0      | 8,5     | 3,9   | 3    | 18    | 0      | 8,5    | 3,9     | 3    | 18   | 0,0909 |           |
| Число осемененных ооцитов            | 35                  | 0      | 7,7     | 5,2   | 0    | 19    | 33     | 0      | 6,9     | 3,1   | 3    | 18    | 0      | 6,9    | 3,1     | 3    | 18   | 0,4727 |           |
| Число ооцитов с 2 PN                 | 35                  | 0      | 3,7     | 3,6   | 0    | 14    | 33     | 0      | 3,0     | 1,9   | 0    | 8     | 0      | 3,0    | 1,9     | 0    | 8    | 0,3531 |           |
| Число криосохраняемых эмбрионов      | 35                  | 0      | 1,5     | 2,7   | 0    | 10    | 33     | 0      | 0,4     | 1,0   | 0    | 4     | 0      | 0,4    | 1,0     | 0    | 4    | 0,0238 |           |
| Число перенесенных эмбрионов         | 30                  | 5      | 3,8     | 3,1   | 1    | 12    | 33     | 0      | 2,6     | 1,1   | 1    | 6     | 0      | 2,6    | 1,1     | 1    | 6    | 0,0319 |           |
| Число беременностей                  | 30                  | 5      | 2,0     | 0,6   | 1    | 3     | 33     | 0      | 2,2     | 0,6   | 1    | 3     | 0      | 2,2    | 0,6     | 1    | 3    | 0,3238 |           |
| Число эмбрионов с оценкой А          | 30                  | 5      | 0,27    | 0,64  | 0    | 2     | 33     | 0      | 0,58    | 0,97  | 0    | 3     | 0      | 0,58   | 0,97    | 0    | 3    | 0,1446 |           |
| Число эмбрионов с оценкой В          | 30                  | 5      | 1,27    | 1,05  | 0    | 3     | 33     | 0      | 1,18    | 0,98  | 0    | 3     | 0      | 1,18   | 0,98    | 0    | 3    | 0,7414 |           |
| Число эмбрионов с оценкой С          | 30                  | 5      | 0,47    | 0,73  | 0    | 2     | 33     | 0      | 0,39    | 0,75  | 0    | 3     | 0      | 0,39   | 0,75    | 0    | 3    | 0,6979 |           |
| Число эмбрионов с оценкой D          | 30                  | 5      | 0,00    | 0,00  | 0    | 0     | 33     | 0      | 0,00    | 0,00  | 0    | 0     | 0      | 0,00   | 0,00    | 0    | 0    | NA     |           |
| Индекс имплантации                   | 30                  | 5      | 5,0%    | 0,2   | 0,0% | 100%  | 33     | 0      | 18,0%   | 0,3   | 0,0% | 100%  | 0      | 18,0%  | 0,3     | 0,0% | 100% | 0,0561 |           |

\* Величины  $p$  из ANOVA

Таблица 4. Распределение оценок перенесенных эмбрионов

| Оценка эмбрионов*           | Случайная обработка |        |        |        |
|-----------------------------|---------------------|--------|--------|--------|
|                             | 150 ME              |        | 450 ME |        |
|                             | N                   | %      | N      | %      |
| Число эмбрионов с оценкой А | 8                   | 13,3%  | 19     | 26,8%  |
| Число эмбрионов с оценкой В | 38                  | 63,3%  | 39     | 54,9%  |
| Число эмбрионов с оценкой С | 14                  | 23,3%  | 13     | 18,3%  |
| Всего                       | 60                  | 100,0% | 71     | 100,0% |

\* Нет эмбрионов с оценкой D

Таблица 5. Биохимические и клинические беременности

| Биохимическая беременность | Случайная обработка |        |        |        | Величина р* |
|----------------------------|---------------------|--------|--------|--------|-------------|
|                            | 150 ME              |        | 450 ME |        |             |
|                            | N                   | %      | N      | %      |             |
| Да                         | 3                   | 8,6%   | 13     | 39,4%  | 0,0038      |
| Нет                        | 32                  | 91,4%  | 20     | 60,6%  |             |
| Всего                      | 35                  | 100,0% | 33     | 100,0% |             |

| Клиническая беременность | Случайная обработка |        |        |        | Величина р* |
|--------------------------|---------------------|--------|--------|--------|-------------|
|                          | 150 ME              |        | 450 ME |        |             |
|                          | N                   | %      | N      | %      |             |
| Да                       | 2                   | 5,7%   | 10     | 30,3%  | 0,0105      |
| Нет                      | 33                  | 94,3%  | 23     | 69,7%  |             |
| Всего                    | 35                  | 100,0% | 33     | 100,0% |             |

Величины  $p$  из критерия Фишера

Таблица 6. Суммарная статистика

| Переменная                           | Совокупно F-150 ME каждый 3-й день в течение 6 дней(исключительно) |      |         |       |         |          |
|--------------------------------------|--|------|---------|-------|---------|----------|
|                                      | N  | Нед. | Среднее | SD    | Минимум | Максимум |
| Возраст (лет)                        | 33   | 0    | 31,1    | 3,4   | 23      | 38       |
| Продолжительность бесплодия (месяцы) | 32   | 1    | 47,0    | 29,0  | 13      | 125      |
| Число предыдущих ART                 | 33   | 0    | 0,7     | 0,9   | 0       | 3        |
| Кумулятивная доза FSH (ME)           | 33   | 0    | 1743,2  | 538,3 | 1050    | 3675     |
| Число инъекций                       | 33   | 0    | 6,9     | 2,2   | 3       | 13       |
| Число фолликулов >14 мм              | 33   | 0    | 9,0     | 2,5   | 5       | 14       |
| Клиническая беременность             | n = 10 (30,3%)   |      |         |       |         |          |

Таблица 7. Суммарная статистика

| Переменная                           | Случайная обработка |         |       |      |        |    |         |       |      |       |           |        | Велич. р* |
|--------------------------------------|---------------------|---------|-------|------|--------|----|---------|-------|------|-------|-----------|--------|-----------|
|                                      | 150 ME              |         |       |      | 450 ME |    |         |       |      |       |           |        |           |
|                                      | N                   | Среднее | SD    | Мин. | Макс.  | N  | Среднее | SD    | Мин. | Макс. | Велич. р* |        |           |
| Возраст (лет)                        | 35                  | 31,5    | 4,8   | 20   | 39     | 33 | 31,1    | 3,4   | 23   | 38    | 0,7169    |        |           |
| Продолжительность бесплодия (месяцы) | 32                  | 50,0    | 33,2  | 12   | 120    | 32 | 47,0    | 29,0  | 13   | 125   | 0,7016    |        |           |
| Число предыдущих ART                 | 35                  | 0,8     | 1,0   | 0    | 3      | 33 | 0,7     | 0,9   | 0    | 3     | 0,5629    |        |           |
| Кумулятивная доза FSH (ME)           | 35                  | 1748,6  | 630,9 | 900  | 3675   | 33 | 1743,2  | 538,3 | 1050 | 3675  | 0,9700    |        |           |
| Число инъекций                       | 35                  | 10,5    | 2,4   | 6    | 17     | 33 | 6,9     | 2,2   | 3    | 13    | 0,0001    |        |           |
| Число фолликулов >14 мм              | 35                  | 10,1    | 4,0   | 4    | 21     | 33 | 9,0     | 2,5   | 5    | 14    | 0,1881    |        |           |
| Клиническая беременность**           | n = 2 (5,7%)        |         |       |      |        |    |         |       |      |       |           | 0,0105 |           |

\* Величины  $p$  из ANOVA

\*\* Величины  $p$  из критерия Фишера

Из этих результатов видно, что инъекция 4 50 ME FSH каждый 3-ий день дает по меньшей мере те же самые результаты в отношении развития фолликулов и может приводить к большему числу беременностей. Однако требуется меньшее число инъекций.

Пример 2.

Следующий пример сравнивает функцию яичников и гормональные уровни после стимуляции яичников в пациентах с синдромом поликистоза яичника (PCOS) с использованием рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (r-FSH) в двух последовательных циклах в соответствии с двумя различными низкодозовыми схемами введения гонадотропина, классическим продолжительным протоколом с увеличивающимися дозами и модифицированным

протоколом с уменьшающимися дозами. Последний протокол используется также для женщин с нормальной овуляцией, подвергающихся их первому циклу внутриматочного осеменения.

#### Материалы и способы

В целом, в исследование включали 30 женщин с первичным бесплодием. У десяти из них (группа 1) был PCOS и их исследовали в 20 циклах лечения. Средний ( $\geq$ SE) возраст пациентов был  $31,8 \pm 1,2$  лет и их средняя продолжительность бесплодия была  $4,1 \pm 1,5$  года. Они представляли олигоменорею или аменорею, среднее базальное отношение LH/FSH было  $2,8 \pm 0,35$  и их средние базальные уровни андростерона и свободного тестостерона были  $305 \pm 36$  нг/дл (нормальные величины 60-200 нг/дл) и  $7,76 \pm 3,81\%$  (нормальные величины 0,3-3,8%), соответственно. Их средний индекс массы тела был  $26,4 \pm 1,6$ , и у всех были видны поликистозные яичники с помощью ультразвуковой эхографии (Adams et al., Br. Med. J. 293:355-359 (1986)). Эндогенная эстрогенная активность была очевидной в этих пациентах по средним базальным уровням эстрадиола  $93,7 \pm 10,1$  пг/мл и положительной реакции на тест стимуляции прогестинном (обычное взятие крови после обработки перорально медроксипрогестеронацетатом, 10 мг ежедневно в течение 5 дней) в каждом из них. Параметры спермы нормального партнера-мужчины, нормальную гистеросальпингограмму или лапароскопию и отсутствие в анамнезе хирургических операций органов таза и/или воспалительных заболеваний органов таза регистрировали перед индукцией овуляции в этих пациентах. Ни у кого из них не происходила овуляция под воздействием кломифенцитрата, либо не наблюдалось беременности после по меньшей мере трех циклов овуляции при таком лечении при дозах  $\leq 200$  мг/день в течение 5 дней.

Пациентов с PCOS подвергали лечению подкожным r-FSH (Gonal-F, Serono S.A., Madrid, Spain) в соответствии с протоколом стандартной низкодозовой схемой введения, описанным ранее (Balasch et al., J. Assist. Reprod. Genet. 13:551-556 (1996)) в первом исследуемом цикле лечения и затем с использованием модифицированной схемы введения уменьшающихся доз во втором цикле лечения гонадотропином. Временной интервал между циклами лечения для каждой женщины был равен 1-3 месяцам. Терапию r-FSH начинали в день 3 спонтанного цикла или индуцированного кровотечения матки. Поскольку целью было сравнение функции яичников и гормональных уровней, но не ставилась цель сравнения частоты беременностей, 10 последовательных пациентов с PCOS, которые не становились беременными в первом цикле обработки, включали в данное исследование.

Продолжительная схема с низкими увеличивающимися дозами состояла из введения первоначальной дозы 75 ME r-FSH в день, и доза

увеличивалась, если необходимо, с приращениями по 37,5 ME.

Первое увеличение суточной дозы выполняли спустя 14 дней терапии только в том случае, если не было доказательства реакции яичников при ультразвуковом исследовании (т.е. нет фолликулов с размером более 10 мм в диаметре). Дополнительные коррекции дозы выполняли, если необходимо, после периода 7 дней. Это ступенчатое увеличение продолжали, пока активность яичников не обнаруживалась при ультразвуковом исследовании; затем ту же самую дозу (т.е. пороговую дозу) продолжали вводить до достижения диаметра фолликулов  $> 17$  мм.

В модифицированном протоколе с уменьшением дозы пациенты получали 4 ампулы (300 ME) r-FSH при дне 3 цикла и не получали лечения в следующие 3 дня (дни цикла 4-6). Терапию r-FSH повторно начинали в день 7 цикла введением 1 ампулы в день r-FSH после выполнения соответствующего ультразвукового сканирования яичников. Эту дозу поддерживали до дня 9 цикла (т.е. 1 неделю после начала лечения) и затем протокол был точно таким же, что и протокол, который использовали в низкодозовом подходе с увеличением дозы. Таким образом, каждая женщина служила ее собственным контролем для исследования функции яичников и гормональных уровней. Применение одного и того же протокола, применяемого к различным гонадотропиновым лекарственным средствам в одном и том же пациенте, как описано ранее (Balasch et al., Hum. Reprod. 10:1678-1683 (1995); Balasch et al., J. Assist. Reprod. Genet. 15:552-559 (1998); Couzinet et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 66:552-556 (1998); Shoham et al., Fertil. Steril. 56:1048-1053 (1991), является, по-видимому, более подходящим построением исследования, когда целью сравнения являются функции яичников и гормональные уровни, но не уровень беременности.

Модифицированный протокол с уменьшением дозы испытывали также на 20 бесплодных женщинах с нормальной овуляцией (группа 2), имеющих нормальную морфологию яичников при вагинальной ультразвуковой эхографии. Они подвергались первому внутриматочному циклу оплодотворения в сочетании с лечением яичников гонадотропином из-за невыясненной причины бесплодия или пониженной мужской фертильности после того, как маточные трубы пациента диагностировали при помощи гистеросальпингограммы или с использованием лапароскопии. Средний возраст пациентов в группе 2 был  $32,9 \pm 2,0$  года, и их средняя продолжительность бесплодия была  $5,3 \pm 1,2$  года.

Реакцию яичников в обеих группах пациентов подвергали мониторингу при помощи вагинального ультразвукового сканирования и измерений эстрадиола. Кроме того, для этого исследования сывороточные уровни прогесте-

рона средней лютеиновой фазы (7 дней после инъекции hCG) измеряли ретроспективно во всех циклах лечения для пациентов в группе 1. Это делали с использованием замороженных проб, хранящихся при  $-20^{\circ}\text{C}$ , которые исследовали в одном цикле. Гормоны измеряли с использованием коммерчески доступных наборов согласно известным ранее способам (Balasch et al., Hum. Reprod. 11:2591-2594 (1996)). Концентрации эстрадиола и прогестерона в сыворотке определяли прямым радиоиммуноанализом (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France для эстрадиола; Immunotech International, Marseille, France для прогестерона). Для эстрадиола коэффициенты вариации внутри анализа и между анализами были  $<4,5\%$  и  $<5,5\%$ , соответственно и коэффициент внутри анализа для прогестерона был  $6,5\%$ .

Последовательное ультразвуковое сканирование проводили для определения роста фолликулов и изменений во времени диаметра яичников. hCG (Profasi; Serono S.A.), 10000 ME в/м вводили для индукции овуляции, когда основной фолликул достигал  $>17$  мм. Ультразвуковые сканирования выполняли с вагинальным датчиком 5 мГц, подсоединенным к сканеру Aloka sector scanner (модели SSD-620, Aloka, Tokyo).

Данные анализировали статистической программой SPSS с использованием приспособленного для парных наблюдений рангового критерия Уилкоксона и хи-квадрат-критерия, где как удобно. Результаты выражены в виде средних с SE (стандартной ошибкой).

#### Результаты

Все циклы лечения гонадотропином, включенные в этот пример, были овуляторными в соответствии с данными ультразвуковой эхографии, базальными записями температуры тела, длиной лютеиновой фазы, а для пациентов в группе 1, также концентрацией сывороточного прогестерона в середине лютеиновой фазы  $> 10$  нг/мл.

Среди пациентов PCOS (группа 1) были 1 продолжающаяся беременность и 1 спонтанный триместровый выкидыш в случае модифицированного подхода с уменьшением дозы. Сравнительные результаты двух схем г-FSH-лечения в этой группе женщин суммированы в табл. I и II. Общее количество FSH, используемое для индукции овуляции у пациентов с PCOS, было более высоким в способе с уменьшением дозы, несмотря на то, что как средняя продолжительность лечения, так и пороговая доза были одинаковыми в случае обоих подходов. Однако частота мультифолликулярных циклов (т.е. основной фолликул  $> 17$  мм и два или более вторичных фолликулов) была значимо более высокой в случае протокола с увеличением дозы, тогда как монофолликулярные циклы (т.е. развивается только один фолликул, который достигает  $> 17$  мм в диаметре) получали в 80% циклов лечения с использованием способа с

уменьшением дозы (табл. I). Данные по динамике фолликулов и уровням эстрадиола во время лечения г-FSH в обеих группах исследования представлены в табл. II. Селективное извлечение ооцитов проводили в двух мультифолликулярных циклах перед инъекцией hCG в последней группе лечения. Четыре и три ооцита (5 из них незрелые), соответственно, были получены из этих извлечений, но оплодотворение *in vitro* не пытались произвести в соответствии с предпочтением пар. Таким образом, с конечным фолликулярным развитием, сывороточные уровни эстрадиола в день hCG были на 71% более высокими с протоколом с увеличением дозы (различие, показывающее тенденцию в отношении статистической значимости,  $P=0,1$ ), тогда как сывороточный прогестерон средней лютеиновой фазы был значимо более высоким ( $P<0,05$ ) (табл. I).

Для пациентов в группе 2, подвергающихся стимуляции яичников гонадотропином во внутриматочных циклах оплодотворения, дни лечения гонадотропином и число использованных ампул г-FSH были  $6,1\pm 1,2$  и  $9,0\pm 1,4$ , соответственно. Суточная эффективная (пороговая) доза была 75 ME (1 ампула) для каждого цикла лечения. 15/20 (75%) циклов лечения были монофолликулярными, тогда как в остальных 5 случаях наблюдали вторичный фолликул, сопровождающий основной фолликул, в день hCG (25% бифолликулярных циклов), но не получали мультифолликулярного развития. Средние сывороточные уровни эстрадиола в день лечения 4 и в день инъекции hCG были  $89,8\pm 14,7$  и  $271\pm 29,7$  пг/мл, соответственно. Были три одноплодные продолжающиеся беременности ( $> 14$  недель беременности) из 20 циклов лечения, две из которых имели место во время монофолликулярных циклов.

Таблица I

| Параметр                                       | Увеличение дозы | Уменьшение дозы  | P       |
|--|-----------------|------------------|---------|
| Число циклов лечения                           | 10              | 10               |         |
| Требуемый г-FSH                                |                 |                  |         |
| Дни лечения (число)                            | $15,7\pm 2,0$   | $14,6\pm 2,0$    | HЗ      |
| Ампулы (число)                                 | $16,6\pm 2,8$   | $19,1\pm 2,2$    | $<0,05$ |
| ME   | $1245\pm 217$   | $1436\pm 167$    | $<0,05$ |
| Пороговая доза                                 | $87,5\pm 8,8$   | $86,2\pm 8$      | HЗ      |
| Фолликулярное развитие в день hCG              |                 |                  |         |
| Монофолликулярные циклы (%)                    | 60              | 80               | $<0,05$ |
| Бифолликулярные циклы (%)                      | 0               | 20 <sup>a)</sup> |         |
| Мультифолликулярные циклы (%)                  | 40              | 0                |         |
| Эстрадиол в день hCG (пг/мл)                   | $474\pm 90$     | $277\pm 38$      | HЗ      |
| Прогестерон в середине лютеиновой фазы (пг/мл) | $19,2\pm 2,1$   | $16,4\pm 1,9$    | $<0,05$ |

Величины представляют среднее  $\pm$  SE

HЗ=незначимый результат

<sup>a)</sup> В двух циклах был один вторичный фолликул, 14 и 15 мм в диаметре, соответственно.

Таблица II

| Параметр                    | День лечения | Увеличение дозы | Уменьшение дозы | P     |
|-----------------------------|--------------|-----------------|-----------------|-------|
| Растущие фолликулы (>11 мм) | 4            | -               | 0               | -     |
|                             | 8            | 1,1±0,2         | 0,2±0,1         | <0,05 |
| Эстрадиол (пг/мл)           | 4            | -               | 58,7±8,9        | -     |
|                             | 8            | 106,7±30,2      | 69,1±8,8        | <0,01 |

Величины являются средними ±SE.

#### Обсуждение

Данный пример показывает значимо высокую частоту (80%) монофолликулярных циклов, 100% частоту моно- и бифолликулярных циклов и отсутствие мультифолликулярного развития. Этот факт вместе с более низкими уровнями эстрадиола в день инъекции hCG подразумевает уменьшенные шансы множественной беременности и гиперстимуляции яичников.

Рандомизированное исследование, сравнивающее схемы с низкими увеличивающимися дозами (18 пациентов) и уменьшающимися дозами (17 пациентов) показали 56% и 88% монофолликулярных циклов в первой и последней схемах лечения, соответственно (van Santbrink and Fauser, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:3597-3602 (1997)). Это было рандомизированное исследование, в котором пациенты, предположительно имеющие одно и то же эндокринное отклонение от нормы, получали один из двух подходов лечения случайным образом. Однако PCOS является гетерогенным состоянием с различающимися эндокринными признаками. Порог FSH варьируется для отдельных пациентов, что предполагает переменные отклонения от нормы (Fauser et al., *Endocr. Rev.* 18:71-106 (1997); Baird (1996) (выше)). Таким образом, как обсуждалось выше, применение одного и того же гонадотропного лекарственного средства, применяемого к различным протоколам лечения в одном и том же пациенте, кажется более подходящей схемой исследования, когда целью сравнения являются функция яичников и гормональные уровни, но не частота беременности. В данном примере, каждая женщина была ее собственным контролем в отношении активности яичников и гормональных изменений. Использование каждой женщины в качестве собственного контроля устраняет действие, перенесенное из предыдущего цикла, которое могло бы повлиять на эти результаты, так как каждый пациент с PCOS подвергался сначала лечению с увеличением дозы. Кроме того, временной интервал между циклами лечения каждой женщины был 1-3 месяца.

В исследовании van Santbrink and Fauser (van Santbrink and Fauser (1997) (выше)) после предоставления обычной первоначальной дозы гонадотропина применяли постепенное уменьшение дозы. Однако в данном примере использовали период снижения до полного прекращения введения. Такое снижение возможно, когда полужизни г-FSH составляет около 36 ч (Le Co-

tonnec et al., (1994) (выше); Le Cotonnec et al., *Fertil. Steril.* 61:669-678 (1994)). Было сделано предположение, что такое снижение может предотвратить циклы, склонные к развитию гиперстимуляции яичников, и, следовательно было показано, что явно выраженное уменьшение сывороточных концентраций FSH предупреждает дальнейшее развитие фолликулов среднего размера, тогда как большие фолликулы продолжают созревать (van Santbrink et al., (1995) (выше)). Однако известно также, что во время подобного снижения до полного прекращения введения может происходить резкое падение концентрации эстрадиола, которое ведет к прекращению цикла (Sher et al., *Hum. Reprod.* 10:3107-3109 (1995); Aboulghar et al., *Hum. Reprod.* 13 (Abstract Book 1):243-244 (1998)). Это наблюдали как в индукции стимуляции в женщинах с отсутствием овуляции, так и во время контролируемой гиперстимуляции яичников. Таким образом, для устранения прекращения цикла в данном примере используют высокую первоначальную дозу для имитации природного цикла, что стимулирует активизацию фолликулов, с последующими поздними небольшими ступенчатыми приращениями, если необходимо, которые могут быть решающими в определении созревания фолликулов (Franks and Hamilton-Fairly, (1996) (выше)).

У большей части женщин, подвергающихся лечению с применением внутриматочного оплодотворения, наблюдалась овуляция, и было подчеркнуто, что интенсивность протоколов стимуляции яичников, используемых для сверховуляции в циклах внутриматочного осеменения, связана с частотой множественных беременностей (te Velde and Cohlen *N. Engl. J. Med.* 340:224-226 (1999)). Таким образом, предпочтительны (te Velde and Cohlen, (1999) (выше)) мягкие схемы стимуляции яичников гонадотропином, которые могут давать приемлемые успешные частоты беременности, но с низкой долей близнецов и без беременностей более высокого порядка (Balasch et al., *Hum. Reprod.* 9:1863-1866 (1994); Cohlen et al., *Hum. Reprod.* 13:1553-1558 (1998)). Схема со ступенчатым понижением дозы, применяемая к женщинам с нормальной овуляцией, представляет собой в соответствии с данным изобретением новый подход в этой связи. 100% частота встречаемости монофолликулярных/бифолликулярных циклов, полученная в женщинах группы 2, дает дополнительное доказательство в пользу применимости данного подхода, когда мультифолликулярное развитие в индукции яичников является нежелательным.

В заключение можно сказать, что физиологический подход со ступенчатым уменьшением дозы для индукции овуляции в пациентках-женщинах с PCOS может быть более подходящим для достижения монофолликулярных циклов, чем подход с повышением дозы. По-

видимому, этот модифицированный подход является также применимым для получения монофолликулярного развития у женщин с нормальной овуляцией, подвергающихся стимуляции при внутриматочных циклах оплодотворения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения бесплодия у женщин, включающий введение нуждающейся в этом женщине фолликулостимулирующего гормона (FSH) и/или его биологически активного аналога в первоначальной дозе в диапазоне от 100 до 600 МЕ с последующей второй дозой по меньшей мере 3 дня спустя в фазе стимуляции.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что FSH и/или его биологически активный аналог вводят в дозе в диапазоне от 300 до 600 МЕ в каждый третий день первых 6 дней фазы стимуляции.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что доза находится в диапазоне от 400 до 500 МЕ.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что доза находится в диапазоне от 430 до 470 МЕ.

5. Способ по п.3, отличающийся тем, что доза составляет приблизительно 450 МЕ.

6. Способ по любому из пп.2-5, отличающийся тем, что FSH и/или его биологически активный аналог вводят в дни 1 и 4, дни 2 и 5 или дни 3 и 6 фазы стимуляции.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что первоначальная доза находится в диапазоне от 100 до 500 МЕ.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что первоначальная доза находится в диапазоне от 200 до 400 МЕ.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что первоначальная доза равна приблизительно 300 МЕ.

10. Способ по любому из пп.7-9, отличающийся тем, что вторую дозу вводят между тремя и шестью днями после первоначальной дозы.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что вторую дозу вводят спустя четыре дня после первоначальной дозы.

12. Способ по п.7 или 8, отличающийся тем, что вторая доза находится в диапазоне от 50 до 200 МЕ.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что вторая доза находится в диапазоне от 70 до 100 МЕ.

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что вторая доза равна приблизительно 75 МЕ.

15. Способ по любому из пп.7-14, отличающийся тем, что вторую дозу повторяют ежедневно в течение 1-4 дней, предпочтительно в течение 2 дней.

16. Способ по любому из пп.7-15, отличающийся тем, что первоначальную дозу вводят в день 1, 2, 4 или предпочтительно 3 фазы стимуляции.

17. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что FSH является рекомбинантным FSH (r-FSH).

18. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что FSH является FSH человека (hFSH).

