

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202090266 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.06.05

(51) Int. Cl. *A61K 31/505* (2006.01)  
*A61P 15/10* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.07.12

(54) ИНГИБИТОРЫ МРО ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ

(31) 62/533,448

(32) 2017.07.17

(33) US

(86) PCT/EP2018/068992

(87) WO 2019/016074 2019.01.24

(71) Заявитель:  
АстраЗенека АБ (SE)

(72) Изобретатель:

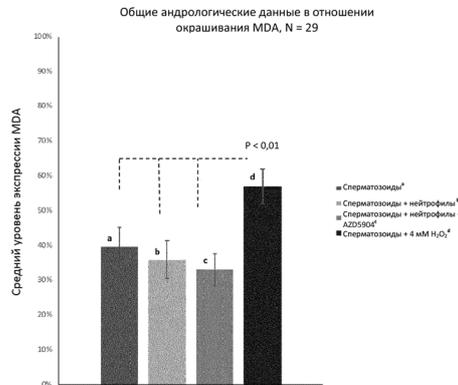
Уиттакер Эндрю, Сангани Хитеш  
Джаянтилал (GB)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новым терапевтическим путям применения ингибиторов МРО и способам лечения, предусматривающим их использование.

Средний уровень окрашивания MDA по результатам анализа проточной цитометрии



A1

202090266

202090266

A1

## **ИНГИБИТОРЫ МРО ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ**

Настоящее изобретение направлено на соединения для применения в лечении мужского бесплодия и способы лечения мужского бесплодия.

Перечисление или обсуждение явно ранее опубликованного документа в данном описании не обязательно должно восприниматься как подтверждение того, что документ является частью уровня техники или является общеизвестными знаниями.

На глобальном уровне бесплодие затрагивает приблизительно 15% пар репродуктивного возраста, пытающихся зачать; причем это примерно соответствует 48,5 миллионам пар. Мужское бесплодие является способствующим фактором при 50% случаев проблем, связанных с бесплодием, и, как сообщается, является единственной причиной бесплодия примерно в 20-30% всех случаев. Эти цифры могут быть заниженными, поскольку информация в отношении оценки и отчетности о мужском бесплодии, вероятно, не является полной во многих странах.

Мужское бесплодие может быть вызвано различными состояниями, некоторые из которых могут быть легко идентифицированы и подвергнуты коррекции, такие как обструкция протоков и гипогонадотропный гипогонадизм. Другие состояния являются необратимыми, как например двусторонняя атрофия яичек, обусловленная вирусным орхитом. У мужчин, которые не имеют поддающейся установлению причины, но демонстрируют аномальный профиль спермы при анализе, как это имеет место у многих пациентов, такое состояние называют идиопатическим мужским бесплодием. Были определены стандартные критерии WHO для образцов спермы, которые широко применяются в ходе оценки мужчин, подвергающихся исследованиям в отношении бесплодия (таблица 1). Мужской фактор бесплодия, как правило, определяется как изменение концентрации, и/или подвижности, и/или морфологии сперматозоидов в по крайней мере одном образце из двух анализов спермы, собранных с интервалом в 1 и 4 недели. До 90% случаев мужского бесплодия обусловлены аномалиями в отношении концентрации сперматозоидов, их морфологии или функции без какой-либо определенной причины, причем это иногда называют идиопатической олигоастенотератозооспермией. В данной когорте окислительный стресс считается значительным фактором, способствующим повреждению сперматозоидов. На фигуре 1 схематически представлена роль окислительного стресса в мужском бесплодии.

Окислительный стресс (OS) отражает дисбаланс между образованием активных форм кислорода (ROS) и эндогенных антиоксидантов, и при наличии избытка ROS может происходить повреждение клеток и тканей. Эпидемиологические данные из США свидетельствуют о том, что избыток ROS является основной причиной мужского фактора бесплодия; причем 30-40% бесплодных мужчин характеризуются повышенными уровнями ROS в их семенной плазме. Сперматозоиды особенно уязвимы к OS, поскольку их клеточные мембраны богаты полиненасыщенными жирными кислотами (PUFA), что делает их восприимчивыми к перекисному окислению липидов. Это приводит к быстрой потере внутриклеточного аденозинтрифосфата (АТФ), что вызывает повреждение аксонемы, снижение жизнеспособности сперматозоидов и увеличение морфологических дефектов шеек сперматозоидов, что в совокупности способствует снижению подвижности сперматозоидов. Кроме того, сперматозоиды имеют характерные дефициты во внутриклеточных ферментах антиоксидантной защиты и, в отличие от большинства типов клеток, сперматозоиды обладают ограниченной способностью выявлять и репарировать повреждения ДНК.

**Таблица 1. Критерии WHO для анализа спермы**

---

**Нормальный анализ семенной жидкости (Всемирная организация здравоохранения, 2002 г.)**

- Объем: > 2 мл
- Концентрация сперматозоидов: > 20 миллионов/мл
- Подвижность сперматозоидов: > 50% с прогрессивной или > 25% с быстрой прогрессивной подвижностью
- Морфология (строгие критерии): > 15% нормальных форм
- Белые клетки крови: < 1 миллион/мл
- Иммуногранулотест или тест смешанной антиглобулиновой реакции\*: < 10% покрытых

\*Тесты на присутствие покрывающих сперматозоид антител

---

ROS вырабатываются как самими сперматозоидами, так и полиморфноядерными лейкоцитами (PMN), такими как нейтрофилы, которые локализуются вместе со сперматозоидами в яичках и придатках яичка, в ходе сперматогенеза и обычно обнаруживаются в семенной плазме, происходящей из предстательной железы и семенных пузырьков. PMN могут вырабатывать и высвобождать примерно в 1000 раз большее количество ROS, чем сперматозоиды, и, таким образом, они, вероятно, являются основным источником OS при идиопатическом мужском бесплодии. Сперматозоиды, инкубированные совместно с активированными нейтрофилами, показывают снижение подвижности, связанное с концентрацией, при увеличении количества нейтрофилов.

Нейтрофилы составляют около 60% популяции PMN, обнаруживаемой в мужских половых путях, и при активации генерируют супероксид и перекись водорода в качестве составной части их окислительного взрыва. Кроме того, нейтрофилы содержат большое количество гем-содержащего фермента миелопероксидазы (MPO), которая использует образующуюся перекись водорода для продуцирования хлорноватистой кислоты и других окислителей с высокой реакционной способностью. Эти окислители вредны для клеток человека и поэтому могут привести к повреждению сперматозоидов и изменению их жизнеспособности и функции. Повышенные уровни миелопероксидазы в семенной жидкости были ассоциированы со снижением концентрации сперматозоидов у молодых здоровых мужчин. Кроме того, было показано, что миелопероксидаза играет важную роль в формировании нейтрофильной внеклеточной ловушки (NET) в ходе нетоза. Человеческие сперматозоиды могут индуцировать высвобождение NET из нейтрофилов, которые затем становятся прочно прикрепляются к сперматозоидам, обездвиживая их. Было показано, что обработка нейтрофилов гидразидом 4-аминобензойной кислоты, доклиническим средством, являющимся ингибитором MPO, значительно снижает образование NET, индуцированное сперматозоидами. Насколько известно авторам настоящего изобретения, до настоящего времени не проводилось каких-либо исследований по применению ингибитора MPO для лечения бесплодных мужчин.

Применяемый в настоящее время режим лечения для мужчин, испытывающих идиопатическое бесплодие, начинается с консультирования в отношении образа жизни, как например прекращение курения, воздержание от алкоголя, оптимизация веса, сведение к минимуму воздействия на яички тепла и токсинов окружающей среды. Доступен ассортимент продаваемых без рецепта препаратов пероральных добавок на основе витаминов и антиоксидантов. Были проведены многочисленные клинические испытания для оценки эффективности этих терапевтических средств. Однако многие из них были небольшими, в совокупности они демонстрируют заметную методологическую и клиническую неоднородность, и в целом они показали смешанные результаты. Недавно проведенный мета-анализ показал, что применение пероральных антиоксидантов у бесплодных мужчин может улучшить качество спермы и показатели беременности. Однако для регулирования клинической практики необходимо должным образом обеспеченное проведение надежных испытаний отдельных антиоксидантов и их комбинаций. В том случае, когда, несмотря на эти меры, парам по-прежнему не удается зачать, используют вспомогательные репродуктивные методы, такие как

внутрицитоплазматическая инъекция сперматозоидов (ICSI) или IVF. Данные методы инвазивны, дороги и не являются общедоступными.

Поэтому существует явная потребность в новых вариантах лечения мужского бесплодия и, в частности, идиопатического мужского бесплодия. Это особенно очевидно в свете нынешней недокументированной терапии, эффективность которой не установлена. Целью настоящего изобретения является предоставление новых терапевтических средств для лечения мужского бесплодия.

Ввиду высокой распространенности окислительного стресса при идиопатическом мужском бесплодии, роли миелопероксидазы в нейтрофил-опосредованном образовании сильных окислителей и поступающих данных, показывающих роль МРО в активируемом сперматозоидами нетозе, авторы настоящего изобретения считают, что ингибиторы МРО могут найти применение в качестве терапевтических средств для лечения или профилактики мужского бесплодия и, в частности, для лечения идиопатического мужского бесплодия.

Соответственно, в первом аспекте настоящее изобретение предусматривает ингибитор миелопероксидазы (МРО) для применения в лечении или профилактике мужского бесплодия. Ингибитор МРО для применения может быть использован для лечения идиопатического мужского бесплодия. Ингибитор МРО для применения может быть использован профилактически у пациента с выявленной склонностью к идиопатическому мужскому бесплодию в связи с выявлением повышенных уровней активных форм кислорода в образце их семенной жидкости и/или дисфункции сперматозоидов, обусловленных окислительным стрессом.

Во втором аспекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения или профилактики бесплодия у пациента мужского пола, нуждающегося в этом, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора МРО. Пациентом мужского пола, нуждающимся в этом, обычно является пациент с идиопатическим мужским бесплодием или пациент с установленной склонностью к идиопатическому мужскому бесплодию.

В третьем аспекте настоящее изобретение предусматривает ингибитор миелопероксидазы или его фармацевтически приемлемую соль или сольват для использования в изготовлении лекарственного препарата для лечения или профилактики мужского бесплодия.

В четвертом аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую ингибитор миелопероксидазы или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, для применения в лечении или профилактике мужского бесплодия, в частности, для применения при идиопатическом мужском бесплодии.

В пятом аспекте предусмотрен набор, содержащий фармацевтическую композицию, содержащую ингибитор миелопероксидазы или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, и инструкции по применению фармацевтической композиции для лечения или профилактики идиопатического мужского бесплодия.

В предпочтительных аспектах, описанных в данном документе и указанных выше, пациентом мужского пола, нуждающимся в лечении, является пациент с идиопатическим мужским бесплодием или, в случае профилактики, пациент с установленной склонностью к идиопатическому мужскому бесплодию.

В предпочтительных аспектах, описанных в данном документе и указанных выше, пациентом мужского пола является человеком. Настоящее изобретение также предусматривает применение ингибитора миелопероксидазы для лечения мужского бесплодия у наземных млекопитающих, отличных от человека, например, у представителей семейств Canidae, Felidae, Bovidae, Equidae, Suidae, Camelini и Cervidae.

В вариантах осуществления аспектов, представленных выше, ингибиторы миелопероксидазы для применения, для применения в способах лечения, для применения в изготовлении лекарственного препарата или представленные в виде фармацевтической композиции применяются для подавления активируемого сперматозоидами нетоза. В таких вариантах осуществления пациент может быть подвергнут скринингу для лечения путем анализа образца его спермы, в результате чего может быть обнаружено, что он демонстрирует признаки индуцированного окислительным стрессом повреждения сперматозоидов, например, при низком количестве/концентрации сперматозоидов, пониженной подвижности сперматозоидов, признаках фрагментации ДНК сперматозоидов, наличии стерильной лейкоцитоспермии в контексте идиопатического мужского бесплодия или высокой степени семенного нетоза.

В вариантах осуществления аспектов, представленных выше, ингибиторы миелопероксидазы для применения, для применения в способах лечения, для применения в изготовлении лекарственного препарата или представленные в виде фармацевтической композиции применяются для подавления окислительного стресса посредством подавления образования активных форм кислорода и/или последующих продуктов,

опосредованных активными формами кислорода. Таким образом, ингибитор МРО для применения или для применения в способе лечения можно использовать для подавления продуцирования активных форм кислорода, представляющих собой гипогалоидные кислоты, такие как хлорноватистая кислота, а также других продуктов, опосредованных МРО, в том числе без ограничения 3-хлортирозина и 3-нитротионозина.

В дополнение или в качестве альтернативы, у пациента, нуждающегося в лечении, могло быть диагностировано идиопатическое мужское бесплодие, например, после неудачных попыток зачатия в партнерстве с фертильным партнером в течение периода 6 месяцев или больше. В случае профилактического вмешательства нуждающийся в этом пациент, может быть подвергнут анализу на предмет его склонности к развитию идиопатического мужского бесплодия путем анализа характеристик его спермы или других физиологических параметров, например, пациент с определенным профилем маркеров/характеристик в образце спермы, указывающим на опосредованную окислительным стрессом дисфункцию сперматозоидов или аномально высокий уровень окислительного стресса в семенной жидкости (например, снижение общей антиоксидантной способности, повышенное количество активных форм кислорода или повышенное перекисное окисление липидов) или семенную лейкоцитоспермию (по определению WHO) в контексте субнормальной мужской фертильности или высокой степени семенного нетоза.

В вариантах осуществления аспектов, представленных выше, предусмотрен способ восстановления фертильности у субъекта мужского пола, определенного как нуждающийся в этом пациент с идиопатическим бесплодием, включающий введение дозы терапевтически эффективного количества ингибитора МРО. В одном варианте осуществления способ лечения идиопатического мужского бесплодия или способ восстановления фертильности у пациента с идиопатическим мужским бесплодием включает введение дозы терапевтически эффективного количества ингибитора МРО для подавления индуцированного окислительным стрессом повреждения сперматозоидов и предупреждения активируемого сперматозоидами нетоза.

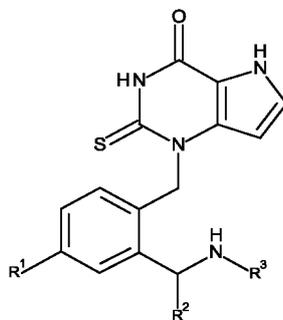
Ингибиторы миелопероксидазы для применения, для применения в способах лечения, для применения в изготовлении лекарственного препарата или представленные в виде фармацевтической композиции могут быть выбраны из любого известного ингибитора МРО. В предпочтительных вариантах осуществления вышеуказанных

аспектов ингибитор МРО выбран из ингибиторов МРО, описанных в WO 2006062465 A1, WO 2008152420 A1 и/или WO 2016087338 A1.

В вариантах осуществления ингибитор миелопероксидазы представляет собой 3-[[2-(2R)-тетрагидрофуран-2-ил]метил]-2-тиоксо-7H-пурин-6-он (AZD5904) или его фармацевтически приемлемую соль или сольват.

В вариантах осуществления ингибитор миелопероксидазы представляет собой 1-(2-изопропоксиэтил)-2-тиоксо-2,3-дигидро-1H-пирроло[3,2-d]пиримидин-4(5H)-он или его фармацевтически приемлемую соль или сольват.

В вариантах осуществления ингибитор миелопероксидазы представляет собой соединение формулы (I),



где

$R^1$  представляет собой H, F, Cl или  $CF_3$ ;

$R^2$  представляет собой H,  $CH_3$  или  $C_2H_5$ ; и

$R^3$  представляет собой H,  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, циклопропил, циклопропилметил, циклобутил, циклобутилметил или циклопентил;

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват.

В одном варианте осуществления соединение формулы (I) выбрано из:

1-{2-[(1R)-1-аминопропил]-4-хлорбензил}-2-тиоксо-1,2,3,5-тетрагидро-4H-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-она;

1-[2-(1-аминоэтил)-4-хлорбензил]-2-тиоксо-1,2,3,5-тетрагидро-4H-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-она;

1-{2-[(1R)-1-аминоэтил]-4-хлорбензил}-2-тиоксо-1,2,3,5-тетрагидро-4H-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-она;

1-{2-[(1S)-1-аминоэтил]-4-хлорбензил}-2-тиоксо-1,2,3,5-тетрагидро-4H-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-она;

1-{4-хлор-2-[1-(метиламино)этил]бензил}-2-тиоксо-1,2,3,5-тетрагидро-4Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-она;

1-{4-хлор-2-[(этиламино)метил]бензил}-2-тиоксо-1,2,3,5-тетрагидро-4Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-она;

1-[2-(аминометил)-4-хлорбензил]-2-тиоксо-1,2,3,5-тетрагидро-4Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-она;

1-{4-хлор-2-[(метиламино)метил]бензил}-2-тиоксо-1,2,3,5-тетрагидро-4Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-она;

1-(2-[(циклобутилметил)амино]метил)бензил)-2-тиоксо-1,2,3,5-тетрагидро-4Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-она;

1-{2-[(циклобутиламино)метил]бензил}-2-тиоксо-1,2,3,5-тетрагидро-4Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-она;

1-{2-[(циклопентиламино)метил]бензил}-2-тиоксо-1,2,3,5-тетрагидро-4Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-она;

1-(2-[(2-метилпропил)амино]метил)бензил)-2-тиоксо-1,2,3,5-тетрагидро-4Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-она;

1-{2-[(пропан-2-иламино)метил]бензил}-2-тиоксо-1,2,3,5-тетрагидро-4Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-она;

1-[2-(аминометил)-4-(трифторметил)бензил]-2-тиоксо-1,2,3,5-тетрагидро-4Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-она;

1-{2-[(метиламино)метил]-4-(трифторметил)бензил}-2-тиоксо-1,2,3,5-тетрагидро-4Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-она и

их фармацевтически приемлемых солей или сольватов.

В случае, когда абсолютная конфигурация (R или S) одного энантиомера соединения формулы (I) указана в списке соединений формулы (I) выше, стереоцентром (хиральным центром), о котором идет речь, является атом углерода, к которому присоединен R<sup>2</sup>.

Гидразид 4-аминобензойной кислоты для применения в лечении мужского бесплодия, в способах лечения мужского бесплодия, в способах изготовления лекарственного средства для лечения мужского бесплодия или в фармацевтических композициях для лечения мужского бесплодия, как описано в данном документе выше, в частности, исключается из всех аспектов и вариантов осуществления, описанных в данном документе.

Термин "фармацевтически приемлемый" используется для указания того, что объект (например, соль, сольват, лекарственная форма, разбавитель или носитель) подходит для применения у пациентов. Иллюстративный перечень фармацевтически приемлемых солей можно найти в Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, P. H. Stahl and C. G. Wermuth, editors, Weinheim/Zürich:Wiley-VCH/VHCA, 2002.

Соединения и соли, описываемые в настоящем изобретении, могут существовать в сольватированных формах и несольватированных формах. Например, сольватированная форма может представлять собой гидратированную форму, такую как полугидрат, моногидрат, дигидрат, тригидрат или другая степень гидратации. Настоящее изобретение охватывает все такие сольватированные и несольватированные формы ингибиторов миелопероксидазы, например соединений формулы (I).

Термин "терапия" предназначен для обозначения своего обычного значения, когда он касается заболевания, для полного или частичного ослабления одного, нескольких или всех его симптомов или для устранения или купирования лежащей в основе патологии. Термин "терапия" также включает "профилактику", если нет конкретных указаний об обратном. Термины "терапевтический" и "терапевтически" должны интерпретироваться соответствующим образом.

Термин "профилактика" предназначен для обозначения своего обычного значения и включает первичную профилактику для предупреждения развития заболевания и вторичную профилактику, при которой заболевание уже развилось и пациента временно или постоянно защищают от обострения или усугубления заболевания или развития новых симптомов, ассоциированных с заболеванием. Пациент с выявленной склонностью к идиопатическому мужскому бесплодию и которому, следовательно, показано профилактическое лечение (т. е. пациент, нуждающийся в профилактике) в соответствии с настоящим изобретением, обычно считается пациентом, у которого выявлены повышенные уровни активных форм кислорода в образце его семенной жидкости и/или дисфункция сперматозоидов, обусловленная окислительным стрессом. В некоторых вариантах осуществления выявление склонности к идиопатическому мужскому бесплодию можно осуществлять на основе анализа комбинации факторов образа жизни, таких как курение, употребление алкоголя, вес и воздействие на яички тепла и токсинов окружающей среды.

Термин "лечение" используется как синоним термина "терапия". Аналогичным образом термин "лечить" можно рассматривать как "применение терапии", где "терапия" определена в данном документе.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству ингибитора миелопероксидазы, как описано в любом из вариантов осуществления в данном документе, которое является эффективным для обеспечения "терапии" у субъекта или для "лечения" заболевания или нарушения у пациента.

Ингибиторы миелопероксидазы и их фармацевтически приемлемые соли или сольваты можно вводить в виде фармацевтических композиций, содержащих один или несколько фармацевтически приемлемых разбавителей или носителей.

Следовательно, в одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор миелопероксидазы, например 3-[[[(2R)-тетрагидрофуран-2-ил]метил]-2-тиоксо-7Н-пурин-6-он, 1-(2-изопропоксиэтил)-2-тиоксо-2,3-дигидро-1Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4(5Н)-он или соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Композиции могут находиться в форме, подходящей для перорального применения (например, в виде таблеток, пастилок, твердых или мягких желатиновых капсул, водных или масляных суспензий, эмульсий, диспергируемых порошков или гранул, сиропов или настоек), для местного применения (например, в виде кремов, мазей, гелей или водных или масляных растворов или суспензий), для введения путем ингаляции (например, в виде тонкодисперсного порошка или жидкого аэрозоля), для введения путем инсуффляции (например, в виде тонкодисперсного порошка) или для парентерального введения (например, в виде стерильного водного или масляного раствора для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения дозы), или в виде суппозитория для ректального введения дозы. Композиции можно получать с помощью традиционных процедур с применением традиционных фармацевтических вспомогательных веществ, хорошо известных из уровня техники. Таким образом, композиции, предназначенные для перорального применения, могут содержать, например, один или несколько красителей, подсластителей, ароматизаторов и/или консервантов. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления ингибитор МРО подлежит пероральному введению. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления ингибитор МРО подлежит введению в форме с пролонгированным высвобождением, например пероральной форме с

продолжительным высвобождением или вводимой подкожно форме с продолжительным высвобождением.

В одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор миелопероксидазы, например соединение формулы (I), 3-[[[(2R)-тетрагидрофуран-2-ил]метил]-2-тиоксо-7Н-пурин-6-он (AZD5904) или 1-(2-изопропоксиэтил)-2-тиоксо-2,3-дигидро-1Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4(5Н)-он, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель, для применения в лечении мужского бесплодия.

Ингибитор миелопероксидазы будут обычно вводить теплокровному животному в стандартной дозе в диапазоне 2,5-5000 мг/м<sup>2</sup> площади тела животного или приблизительно 0,05-100 мг/кг, и данное количество обычно обеспечивает терапевтически эффективную дозу. Стандартная лекарственная форма, такая как таблетка или капсула, будет обычно содержать, например, 0,1-500 мг активного ингредиента. Суточная доза обязательно будет варьировать в зависимости от получающего лечение пациента, конкретного пути введения, каких-либо вводимых совместно терапевтических средств и тяжести заболевания, подлежащего лечению. Соответственно, практикующий врач, который лечит любого конкретного пациента, может определить оптимальную дозировку.

Чтобы проверить гипотезу о том, что ингибиторы МРО могут быть пригодны для лечения идиопатического мужского бесплодия, был проведен ряд исследований *ex-vivo* на диагностических андрологических образцах, собранных с согласия пациентов, посещающих отделение искусственного оплодотворения (ACU) в больнице Ninewells в Данди, как описано ниже. Эксперименты проводились для оценки различных параметров подвижности и функции сперматозоидов, как описано ниже.

Для лучшего понимания изобретения сделана ссылка на следующие графические материалы.

На **фигуре 1** схематически изображена роль окислительного стресса в мужском бесплодии.

На **фигуре 2** представлена таблица, иллюстрирующая краткое изложение исходной информации, относящейся к данным по андрологии, полученным в клинике, касающейся каждого тестируемого пациента (возраст, первичное/вторичное бесплодие и длительность бесплодия). Единицы измерения количества представляют собой миллион на мл (млн/мл),

эталонными значениями согласно WHO являются: концентрация 15 млн/мл, прогрессия 32%, морфология 4%, лейкоциты 1 млн/мл).

На **фигуре 3а** представлена столбчатая диаграмма, показывающая процентную разницу между измерениями CASA в нулевой момент времени и после 24-часовой инкубации в отношении показателей подвижности, прогрессивной подвижности, быстрой подвижности, средней скорости по траектории (VAP), прямолинейной скорости (VSL), криволинейной скорости (VCL) и бокового смещения головки (ALH) для полного набора данных (n=29). Измерения проводили в трех условиях: только сперматозоиды в качестве контроля (левая колонка, а), сперматозоиды с активированными нейтрофилами (соотношение 3:1) со средой-носителем в качестве контроля (средняя колонка, б) и сперматозоиды с активированными нейтрофилами (соотношение 3:1) плюс 3 мкМ AZD5904 (правая колонка, с). Тест Крускала-Уоллиса показывает положительную динамику для AZD5904, которая не достигает статистической значимости для каждого измеренного параметра ( $P > 0,1$ ). Планки погрешностей представляют стандартную ошибку среднего значения.

На **фигуре 3б** представлена линейная диаграмма, показывающая абсолютное изменение общей подвижности сперматозоидов от исходного уровня до уровня после 2 и 24 часов инкубации для первых 11 субъектов (выделено синим цветом на фигуре 2), у которых наблюдались более выраженные отклонения в исходных параметрах спермы, чем у следующих 18 исследуемых субъектов. Измерения проводили в трех условиях: только сперматозоиды в качестве контроля (а), сперматозоиды с активированными нейтрофилами (соотношение 3:1) со средой-носителем в качестве контроля (б) и сперматозоиды с активированными нейтрофилами (соотношение 3:1) плюс 3 мкМ AZD5904 (с). Двухсторонний t-критерий Стьюдента между AZD5904 и группами, получавшими среду-носитель, показал статистический тренд:  $P = 0,09$ .

На **фигуре 4** показаны кумулятивные результаты пенетрационного теста Кремера для полного набора данных (n=29) с результатами, выраженными в виде отношения к контролю (только сперматозоиды). Планки погрешностей представляют стандартную ошибку среднего значения. Анализ с использованием t-критерия Стьюдента показывает, что при 1 см в группе лечения AZD5904 было обнаружено значительно больше сперматозоидов, чем в группе не получавшей лекарственное средство.  $P = 0,02$ .

На **фигуре 5** показаны примеры данных пенетрационного теста Кремера в 2-часовой временной точке для четырех субъектов, ответивших на лечение. Данные

выражены в виде отношения к контролю (только сперматозоиды). Значения над столбцами соответствуют фактическому количеству сперматозоидов при 1 см; самое верхнее число означает условие теста (среда-носитель или AZD5904), а число в скобках является контрольным количеством. Числа R вдоль оси X означают анонимные номера пациентов. Изменение, составляющее по меньшей мере 0,25, принимается как значимая разница у индивидуумов.

На **фигуре 6** показано среднее окрашивание MDA у 29 пациентов и в зависимости от условий обработки *in vitro*: только сперматозоиды (а), сперматозоиды + нейтрофилы + среда носитель в качестве контроля (b), сперматозоиды + нейтрофилы + AZD5904 (лекарственное средство) (с) и сперматозоиды + 4 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (d). Результаты для сперматозоидов с 4 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> характеризовались значительно большим окрашиванием, чем в других условиях (P<0,01). Планки погрешностей представляют стандартную ошибку среднего значения.

## **Материалы и способы**

### Схема эксперимента

Серию из 5 тестов проводили в отношении каждого полученного образца спермы (фигура 2). Этот подход использовали для оценки различных параметров подвижности и функции сперматозоидов. Способы валидировали до сбора данных для обеспечения надежности и повторяемости результатов.

### Субъекты исследования/сбор образцов

Избыточные диагностические андрологические образцы (N=29) собирали с согласия мужчин, посещающих отделение искусственного оплодотворения (ACU) в больнице Ninewells в Данди.

### Материалы

- Среда, препятствующая капацитации (pH 7,4): 1,8 мМ CaCl<sub>2</sub>, 5,4 мМ KCl, 0,8 мМ MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 116,4 мМ NaCl, 1 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5,55 мМ D-глюкозы, 2,73 мМ пирувата натрия, 41,75 мМ лактата натрия, 25 мМ HEPES, 0,3% BSA.
- Среда, обеспечивающая капацитацию (pH 7,4): 1,8 мМ CaCl<sub>2</sub>, 5,4 мМ KCl, 0,8 мМ MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 116,4 мМ NaCl, 1 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5,55 мМ D-глюкозы, 2,73 мМ пирувата натрия, 25 мМ лактата натрия, 26 мМ бикарбоната натрия, 0,3% BSA.
- sEBSS (pH 7,4): 1,01 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,4 мМ KCl, 0,8 мМ MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5,5 мМ C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, 2,5 мМ пирувата натрия, 19 мМ лактата натрия, 25 мМ бикарбоната натрия, 15 мМ HEPES, 1,8 мМ CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 118,4 мМ NaCl, 0,3% BSA.

### Подготовка образца спермы

Образцы спермы отбирали путем мастурбации в стерильные пластиковые контейнеры после минимум 2 дней и максимум 7 дней полового воздержания. Образцы спермы получали на месте в АСУ и выдерживали для обеспечения разжижения в течение 30 мин. (37°C). Перед подготовкой образца из каждого образца отбирали 20 мкл необработанной спермы и 10 мкл из этого объема использовали для получения мазков спермы на чистых предметных стеклах (исследование лейкоцитов). Для каждого образца делали два мазка, оборачивали их в фольгу и хранили в морозильной камере при -20°C до востребования. Образцы спермы затем обрабатывали центрифугированием с градиентом плотности Percoll (DGC), как описано ранее (Tardif S, Madamidola OA, Brown SG, Frame L, Lefievre L, Wyatt PG, et al. Human Reproduction 2014;29:10 2123-2135). Затем максимум 2 мл на градиент необработанной спермы аккуратно наслаивали сверху. Затем градиент центрифугировали при 300 g в течение 20 минут. Самый верхний слой, который содержал только сперму, собирали в пробирку Эппендорфа объемом 1,5 мл. Затем этот слой центрифугировали при  $17 \times 10^6 \times g$  в течение 20 минут для осаждения любых клеток и дебриса в слое спермы, чтобы производился отбор только семенной жидкости. Супернатант затем собирали и снова центрифугировали при  $17000 \times g$  в течение 20 минут. Супернатант собирали и хранили в морозильной камере при -20°C до востребования. Осадок из 80% DGC-фракции собирали и промывали в 4 мл среды, препятствующей капацитации, в течение 10 минут при 300 g. Супернатант затем удаляли. Осадок собирали, ресуспендировали в 1 мл раствора sEBSS и инкубировали (37°C) для анализа функции сперматозоидов.

### Изоляция нейтрофилов

Образцы крови отбирали у добровольных доноров в вакутейнер, содержащий EDTA, чтобы остановить свертывание (Zambrano F, Carrau T, Garner U, Seipp A, Taubert A, Felmer R, et al. Fertility and Sterility 2016;106(5):1053-1060). Кровь смешивали с Histopaque 1119 (Sigma, Великобритания) в соотношении 1:1,2 в 15 мл пробирках фирмы Falcon (Zambrano et al, 2016.). Затем смесь центрифугировали при 800 g в течение 20 минут. После этого супернатант удаляли и осадок переносили в новую пробирку фирмы Falcon. Затем данную пробирку заполняли до 15 мл фосфатно-солевым буфером (PBS) и центрифугировали при 300 g в течение 10 минут. Градиенты Percoll получали путем добавления сначала 2 мл 10X PBS к 18 мл Percoll для создания 100% исходного раствора. Затем его разбавляли 1XPBS, чтобы получить пять 4 мл исходных растворов градиента

Percoll в концентрациях 65%, 70%, 75%, 80% и 85%. Далее 2 мл каждой градиентной концентрации наслаивали поверх другой в 15 мл пробирку фирмы Falcon, при этом концентрация 85% находилась на дне пробирки, а концентрация 65% находилась наверху. После 10-минутного центрифугирования супернатант снова удаляли и осадок ресуспендировали до 4 мл с помощью PBS. Затем 2 мл крови аккуратно наслаивали на градиенты плотности и центрифугировали при 800 g в течение 20 минут. Самый верхний слой удаляли, а слои с концентрациями 70-80% собирали и переносили в новую пробирку фирмы Falcon. Затем пробирку заполняли до 15 мл с помощью PBS и центрифугировали в течение 10 минут при 300 g. Супернатант удаляли, и осадок собирали и промывали в 2 мл буфера для лизиса эритроцитов. Эту стадию повторяли до исчезновения красного цвета осадка, при этом супернатант каждый раз удаляли. Наконец, осадок ресуспендировали в 1 мл sEBSS и помещали в инкубатор при 37°C.

#### Обработка сперматозоидов AZD5904 или средой-носителем

10 мМ исходный раствор лекарственного средства получали в 100% DMSO. Затем его серийно разбавляли до рабочей концентрации в 3 мкМ, используя sEBSS в качестве разбавителя, и хранили при 4°C. Затем к нейтрофилам добавляли лекарственное средство или среду-носитель и помещали на водяную баню при 37°C на 10 минут. Затем нейтрофилы добавляли к сперматозоидам в безопасных для спермы 5 мл полистирольных круглодонных пробирках (Falcon) в соотношении примерно 1:3. Зимозан в конечной концентрации 1 мкг/мл добавляли для активации нейтрофилов и инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Четыре варианта условий были получены для проведения оценки подвижности, проточной цитометрии и тестов Кремера: только сперматозоиды, сперматозоиды + нейтрофилы + среда-носитель, сперматозоиды + нейтрофилы + AZD5904 (лекарственное средство) и сперматозоиды + 4 мМ (конечная концентрация) перекись водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; положительный контроль повреждений).

#### Оценка подвижности

Подвижность сперматозоидов оценивали с использованием системы Hamilton-Thorn CASA. Для каждого условия проводили подсчет в общей сложности 200 клеток как минимум при четырех разных полях зрения. Если образец характеризовался очень низкой подвижностью, подсчитывали по меньшей мере 100 клеток. Параметры подвижности оценивали в начале совместной инкубации с нейтрофилами (нулевой момент времени), через 2 часа и через 24 часа. Подвижность выражали в процентной разнице между

нулевым моментом времени и через 2 часа и процентной разнице между нулевым моментом времени и через 24 часа для каждой временной точки для каждого образца.

#### Пенетрационный тест Кремера

Пенетрационный тест Кремера оценивает способность сперматозоидов проникать и плыть через вязкие среды. Этот тест также известен как тест на проникновение сперматозоидов в цервикальную слизь. Заменитель цервикальной слизи получали с использованием 1% метилцеллюлозы, растворенной в среде, обеспечивающей емкость. Раствор насыщали газом в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в течение 20 минут. Затем плоские капиллярные трубки (Rectangle Boro Tubing, CM Scientific) помещали в раствор метилцеллюлозы на дополнительные 20 минут с обеспечением подъема среды вверх по капиллярным трубкам. После 2-часовой инкубации аликвоты объемом 100 мкл, отобранные для каждого варианта условий, помещали в свежую пробирку, безопасную для сперматозоидов. Один конец каждой пробирки затем блокировали с помощью пластилина, а затем одну пробирку помещали открытым концом в образец каждого из вариантов условий. Каждую пробирку, безопасную для сперматозоидов, содержащую капиллярную трубку, инкубировали в течение 1 часа при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Через 1 ч. капиллярные трубки удаляли и количество клеток на отметке 1 см подсчитывали вручную. Результаты выражали в виде отношения к контролю (только сперматозоидам).

#### Проточная цитометрия

После 2-часовой инкубации с активированными нейтрофилами отбирали аликвоты по 50 мкл из всех 4 вариантов условий и переносили в пробирки Эппендорфа объемом 1,5 мл. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> использовали в качестве положительного контроля. Дополнительную аликвоту для единичного вторичного контроля отбирали из пробирки с вариантом, соответствующему только сперматозоидам. Клетки (кроме пробирки с единичным вторичным контролем) инкубировали в течение 0,5 ч. при 37°C с антителом к малоновому диальдегиду (MDA) (ab27642, abcam, Кембридж) в рабочем соотношении 1:50. (Moazamian R, Polhemus A, Connaughton H, Fraser B, Whiting S, Gharagozloo P, Aitken RJ. Mol Hum Reprod 2015;21(6):502-15). Затем пробирки центрифугировали при 300 g в течение 5 минут для осаждения клеток и удаляли супернатант. Затем клетки дважды промывали eBSS и каждый раз удаляли супернатант. Затем ко всем вариантам условий добавляли флуоресцентно меченые вторичные антитела козы к иммуноглобулину кролика (ThermoFisher, Великобритания) в соотношении 1:50 и пробирки инкубировали в течение

10 минут при 37°C. Клетки осаждали и дважды промывали, как описано выше. После последней промывки осадки ресуспендировали в 250 мкл раствора sEBSS и переносили в новые пробирки, безопасные для сперматозоидов. Затем оценивали уровень окрашивания MDA при каждом условии в 10000 клеток с использованием предварительно валидированной программы проточной цитометрии в анализаторе клеток BD LSRFortessa. Ввиду технической ошибки один образец не был оценен с помощью проточной цитометрии.

#### Подсчет лейкоцитов

Предметные стекла с мазками спермы вынимали из морозильной камеры и помещали в сосуды Коплина, заполненные раствором Гимзы-Май-Грюнвальда (разбавленный 1:20 в дистиллированной воде), на 5 минут. Затем предметные стекла промывали в PBS в течение 1,5 мин. Затем предметные стекла помещали в свежий раствор Гимзы-Май-Грюнвальда на 20 минут, затем промывали дистиллированной водой. Стеклам давали высохнуть на воздухе, прежде чем начинали осуществление подсчета. Регистрировали среднее количество для двух мазков на образец. Подсчет количества лейкоцитов производили в той же области, в которой регистрировали 400 сперматозоидов, и рассчитали концентрацию лейкоцитов в образце с использованием концентрации сперматозоидов в соответствии с рекомендованными WHO способами от 2010 года. (Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Augur J, Baker HWG, Behre HM, et al. Human Reproduction Update, 2010;16(3):231-245).

### **Результаты**

#### Персональные данные пациентов

В таблице на фигуре 2 представлено краткое описание исходной информации, относящейся к данным по андрологии, полученным в клинике, касающейся каждого тестируемого пациента (возраст, первичное/вторичное бесплодие и длительность бесплодия). Также записали параметры необработанных и обработанных сперматозоидов, а также количества лейкоцитов.

Более подробно, в таблице указаны возраст, продолжительность времени, в течение которого пара пыталась зачать (продолжительность бесплодия), и состояние бесплодия пациента (первичное или вторичное). Параметры спермы измеряли до (необработанная) и после (обработанная) центрифугирования в градиенте плотности с использованием системы Hamilton-Thorne CASA, за исключением подсчета, производимого в отношении необработанной спермы, которую оценивал андролог вручную в соответствии с

руководством WHO (World Health Organization. (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. Geneva : World Health Organization). Красный текст относится к любому образцу с параметрами ниже нормальных согласно WHO 2010 г. Количество лейкоцитов относится к концентрации лейкоцитов, обнаруженных в образце необработанной спермы. Номера R относятся к анонимным номерам пациентов.

#### Оценка подвижности

Образцы спермы собирали у пациентов в день их андрологических исследований и записывали параметры подвижности. Каждый образец измеряли в трех условиях тестирования в течение 24 часов: только сперматозоиды, сперматозоиды с нейтрофилами в соотношении 3:1 плюс среда-носитель в качестве контроля и сперматозоиды с нейтрофилами в соотношении 3:1 плюс 3 мкМ AZD5904. Подвижность измеряли в нулевой момент времени, через 2 часа инкубации и через 24 часа. На фигуре 3а представлены показатели процентной разницы между параметрами спермы в нулевой момент времени и после 24-часовой инкубации. Тест Крускала-Уоллиса показал, что наблюдался незначительный тренд к увеличению значения полезного относительного эффекта приблизительно на 30% при обработке AZD5904 в отношении снижения нарушения общей подвижности сперматозоидов ( $p > 0,01$  для каждого измеренного параметра). Чтобы визуализировать различия в подвижности с течением времени, данные для общей подвижности, быстрой и прогрессивной подвижностей также наносили в виде линейных графиков для первых 11 изученных субъектов, у которых были более выраженные отклонения в исходных параметрах спермы. На фигуре 3б показаны различия с течением времени в отношении показателей подвижности, определенных у испытуемых пациентов (N=11).

#### Пенетрационный тест Кремера

Образец сперматозоидов от каждого субъекта исследования также оценивали в отношении способности проникать в вязкие среды с использованием пенетрационного теста Кремера (N = 29). На фигуре 4 показаны средние для когорты результаты в отношении сперматозоидов с активированными нейтрофилами плюс среда-носитель и сперматозоидов с активированными нейтрофилами плюс AZD5904. Результаты показали улучшение проникновения сперматозоидов через вязкую среду для образцов, обработанных AZD5904, по сравнению с контролем со средой-носителем. Анализ с использованием t-критерия Стьюдента показывает, что при 1 см в группе лечения

лекарственным средством было обнаружено значительно больше сперматозоидов, чем в группе не получавшей лекарственное средство ( $p=0,02$ ). Наблюдались различия в индивидуальном ответе на лечение AZD5904, при этом 15 из 29 субъектов демонстрировали рассматриваемые как клинически значимые улучшения в отношении показателя проникновения сперматозоидов после AZD5904. Четыре примера субъектов, ответивших на лечение AZD5904, показаны на фигуре 5.

#### Проточная цитометрия

После 2-часовой инкубации уровни MDA измеряли с помощью проточной цитометрии ( $N=29$ ). Четыре варианта условий измеряли после 2-часовой инкубации: только сперматозоиды (контроль), сперматозоиды с нейтрофилами в соотношении 3:1 плюс среда-носитель в качестве контроля, сперматозоиды с нейтрофилами в соотношении 3:1 плюс 3 мкМ AZD5904 (лекарственное средство) и сперматозоиды с 4 мМ  $H_2O_2$ . На фигуре 6 показано среднее окрашивание MDA для всех 4 условий. Односторонний анализ ANOVA показал, что сперматозоиды с 4 мМ  $H_2O_2$  окрашивалась значительно интенсивнее, чем в других тестируемых условиях ( $P<0,01$ ).

#### Анализ результатов

AZD5904 был выбран в качестве репрезентативного ингибитора MPO ввиду его обширного предварительного клинического профилирования у человека и наблюдаемого при этом хорошего профиля безопасности. Ожидается, что результаты, полученные с использованием данного репрезентативного ингибитора MPO, будут также получены с использованием сильнодействующих селективных ингибиторов MPO, таких как без ограничения соединения, описанные в WO 2006062465 A1 (который раскрывает 1-(2-изопропоксиэтил)-2-тиоксо-2,3-дигидро-1H-пирроло[3,2-d]пиримидин-4(5H)-он (также известный как AZD3241), WO 2008152420 A1 и/или WO 2016087338 A1 (который описывает соединения формулы (I), раскрытые, в частности, в настоящем документе).

Более подробно, AZD5904 является эффективным ( $IC_{50}$  140 нМ) необратимым ингибитором MPO человека с аналогичной эффективностью у мышей и крыс. Он является в 10-19 раз более селективным по сравнению с близкородственными лактопероксидазой и пероксидазой щитовидной железы; в  $>70$  раз в отношении широкого спектра других ферментов, ионных каналов и рецепторов. В изолированных нейтрофилах человека 1 мкМ данного соединения подавлял PMA-стимулированную выработку  $HOCl$  на  $>90\%$ . У крыс концентрация в плазме крови, составляющая  $\sim 5$  мкМ, снижала образование *in vivo* глутатионсульфонамида (продукта реакции  $HOCl$  с глутатионом) в активированных

зимозаном *in situ* нейтрофилах брюшины. AZD5904 вводили перорально здоровым добровольцам в однократных дозах до 1200 мг (1400 мг для состава с пролонгированным высвобождением, ER) и в многократных дозах до 325 мг TID (600 мг BID в течение 10 дней для состава с ER). В общей сложности 181 субъекту вводили дозы в пяти исследованиях фазы 1. Никаких явных побочных эффектов, связанных с лекарственным средством, пока не выявлено.

Результаты, полученные в тестах, описанных в настоящей заявке, связанные с активностью ингибитора МРО в отношении свойств сперматозоидов, которые представлены на прилагаемых фигурах, иллюстрируют эффекты репрезентативного ингибитора МРО (AZD5904) в отношении сперматозоидов, полученных от пациентов, страдающих идиопатическим мужским бесплодием. В общей сложности были протестированы образцы спермы от 29 пациентов. Несмотря на то, что отдельные результаты показали степень изменчивости, в совокупности, и несмотря на небольшой размер выборки (пилотное исследование), данные показывают положительный тренд к улучшению общей подвижности сперматозоидов через 24 часа после введения AZD5904 для совместной инкубации сперматозоидов человека с активированными нейтрофилами человека относительно среды-носителя.

Пенетрационный тест Кремера является особенно применимым тестом для оценки влияния лекарственного средства на подвижность сперматозоидов. Это объясняется тем, что он оценивает способность сперматозоидов проникать и плыть через среды с вязкостью, аналогичной вязкости, обнаруживаемой в женском тракте, через который сперматозоиды естественным образом проплывают *in vivo* (Ivic A, Onyeaka H, Girling A, Brewis IA, Ola B, Hammadi H et al. *Human Reproduction* 2002;17(1):143-149). Тест на проникновение сперматозоидов дает объективную, количественную и воспроизводимую информацию о функциональном состоянии сперматозоидов и, как было показано, является ценным маркером фертильности, особенно при мужском факторе бесплодия (см. Eggert-Krause W, Gerhard I, Tilgen W, Runnebaum B. *Fertil Steril* 1989; 52: 1032-1040; Eggert-Krause W, Leinhos G, Gerhard I, Tilgen W, Runnebaum B. *Fertil Steril* 1989; 51: 317-323; Polansky FF and Lamb EJ. *Fertil Steril* 1989; 51(2): 215-28; Ola B, Afnan M, Papaioannou S, Sharif K, Bjordahl L, Coomarasamy A. *Hum Reprod* 2003; 18(5): 1037-46). Было показано, что заменитель цервикальной слизи, который применяли в исследовании и созданный с использованием метилцеллюлозы и сред, обеспечивающих капациацию, является подходящим заменителем цервикальной слизи человека (Ivic et al, 2002; Tang S,

Garrett C, Baker HW. Human Reprod 1999; 14(11): 2812-7). Результаты этого предварительного исследования показали, что после 2-часовой обработки спермы, совместно инкубированной с активированными нейтрофилами, было получено статистически значимое улучшение проникновения сперматозоидов при обработке AZD5904 по сравнению со средой-носителем ( $p=0,02$ ). На уровне индивидуальных субъектов AZD5904 оказывал клинически значимый положительный эффект чуть более чем у 50% протестированных пациентов (15 пациентов, ответивших на лечение, из 29 обследованных пациентов), в то время как еще у 8 пациентов наблюдалось меньшее улучшение. Были предприняты попытки определить фенотипические или демографические факторы, которые были связаны с положительным ответом на лечение AZD5904, но размер выборки был слишком мал, чтобы осуществить это. Дальнейшая работа с большим количеством субъектов продолжается.

Хотя точный механизм действия, с помощью которого ингибирование МРО обеспечивает улучшение свойств сперматозоидов, еще предстоит установить, различия в тестах на подвижность становились более очевидными после 24-часовой инкубации.

Подводя итог, можно сказать, что результаты предварительного исследования потенциала ингибиторов МРО для лечения идиопатического мужского бесплодия, раскрытых выше, показывают, что обработка сперматозоидов человека *in vitro* ингибитором МРО связана с сильной тенденцией к проявлению положительного эффекта защиты сперматозоидов от повреждения, опосредованного нейтрофилами, в отношении улучшения общей подвижности сперматозоидов через 24 часа и показателя проникновения сперматозоидов через всего 2 часа. У 15 из 29 субъектов улучшение в пенетрационном тесте Кремера было признано клинически важным, и общее лечение ингибитором МРО привело к статистически значимому улучшению показателя проникновения сперматозоидов в тесте Кремера. Эти результаты убедительно подтверждают предположение, что ингибиторы МРО, как например AZD5904, могут быть пригодны для лечения идиопатического мужского бесплодия. Расширенные исследования для подтверждения результатов, полученных в этих первоначальных исследованиях, продолжаются.

## Формула изобретения

1. Ингибитор миелопероксидазы для применения в лечении или профилактике мужского бесплодия.

2. Способ лечения мужского бесплодия у пациента мужского пола, нуждающегося в этом, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора МРО.

3. Способ профилактики мужского бесплодия у пациента мужского пола, признанного нуждающимся в этом, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора МРО.

4. Ингибитор миелопероксидазы или его фармацевтически приемлемая соль или сольват для применения в изготовлении лекарственного препарата для лечения или профилактики мужского бесплодия.

5. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор миелопероксидазы, для применения в лечении или профилактике мужского бесплодия.

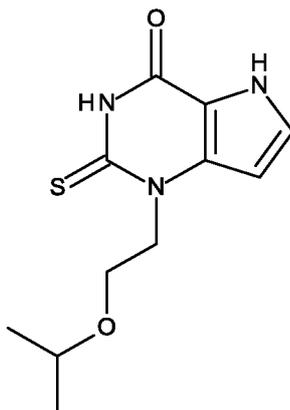
6. Ингибитор миелопероксидазы для применения, способ лечения или профилактики или фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов, где применение, способ или композиция предназначены для пациента, страдающего идиопатическим мужским бесплодием.

7. Ингибитор миелопероксидазы для применения, способ лечения или профилактики или фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов, где применение, способ или композиция предназначены для пациента, являющегося человеком.

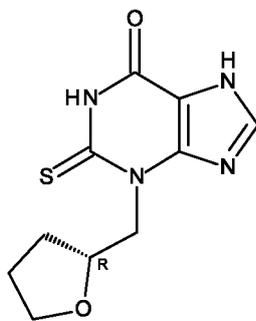
8. Ингибитор миелопероксидазы для применения, способ лечения или профилактики или фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов, где применение, способ или композиция предназначены для наземного млекопитающего, не являющегося человеком.

9. Ингибитор миелопероксидазы для применения, способ лечения или профилактики или фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов, где применение, способ или композиция предназначены для подавления индуцируемого окислительным стрессом повреждения сперматозоидов и/или предупреждения активируемого сперматозоидами нетоза в контексте идиопатического мужского бесплодия.

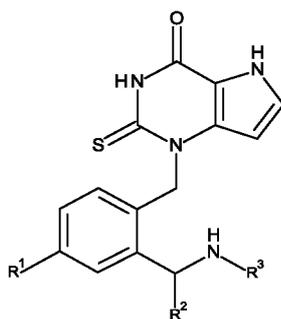
10. Ингибитор миелопероксидазы для применения, способ лечения или профилактики или фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов, где ингибитор миелопероксидазы представляет собой ингибитор миелопероксидазы, представляющий собой 1-(2-изопропоксиэтил)-2-тиоксо-2,3-дигидро-1H-пирроло[3,2-d]пиримидин-4(5H)-он или его фармацевтически приемлемую соль или сольват,



11. Ингибитор миелопероксидазы для применения, способ лечения или профилактики или фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-9, где ингибитор миелопероксидазы представляет собой 3-[[[(2R)-тетрагидрофуран-2-ил]метил]-2-тиоксо-7H-пурин-6-он или его фармацевтически приемлемую соль или сольват,



12. Ингибитор миелопероксидазы для применения, способ лечения или профилактики или фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-9, где ингибитор миелопероксидазы представляет собой соединение формулы (I),



где

$R^1$  представляет собой H, F, Cl или  $CF_3$ ;

$R^2$  представляет собой H,  $CH_3$  или  $C_2H_5$ ; и

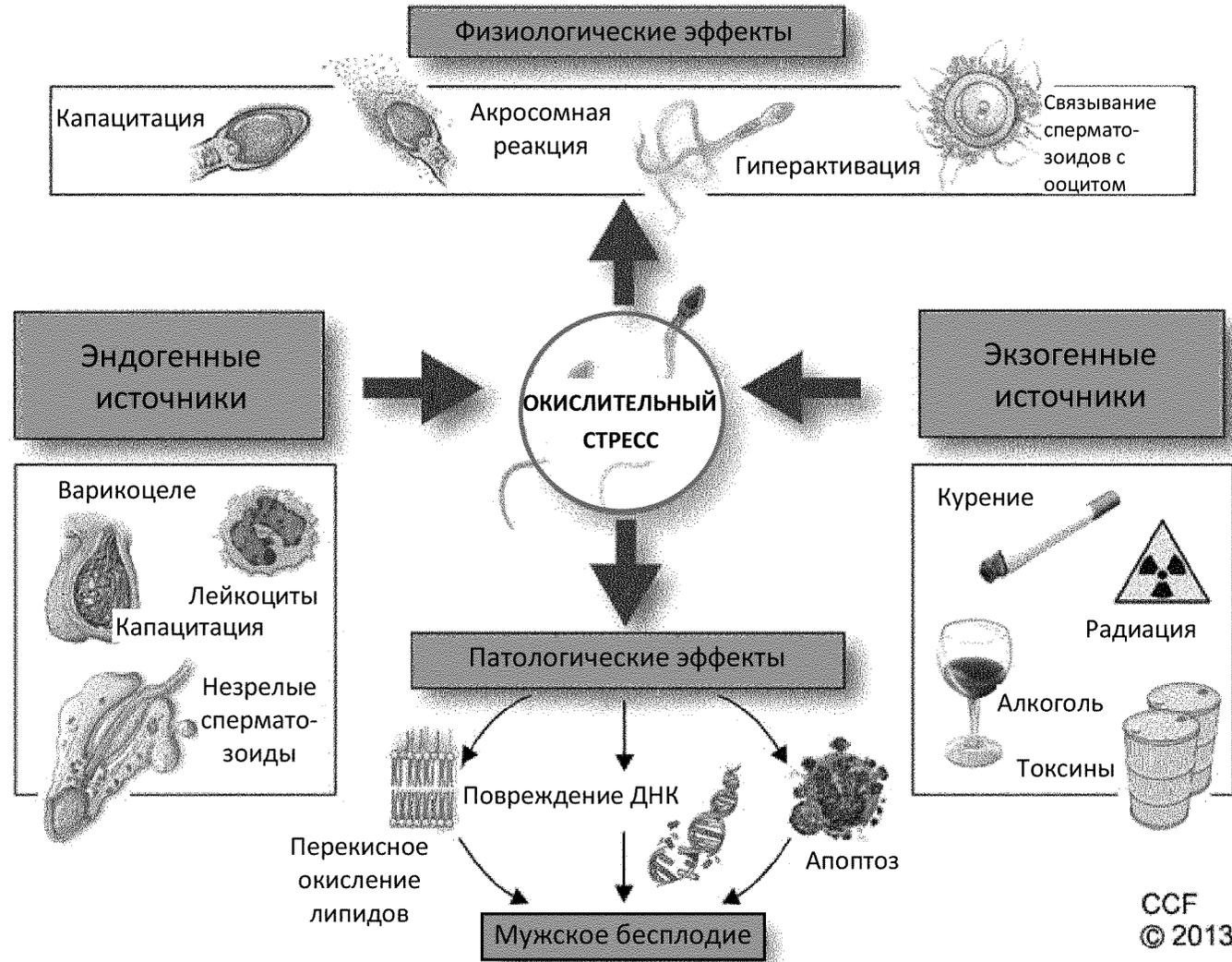
$R^3$  представляет собой H,  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, циклопропил, циклопропилметил, циклобутил, циклобутилметил или циклопентил;

или его фармацевтически приемлемую соль или сольват.

13. Набор, содержащий фармацевтическую композицию, содержащую ингибитор миелопероксидазы или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, и инструкции по применению фармацевтической композиции для лечения или профилактики идиопатического мужского бесплодия.

14. Набор по п. 13, где ингибитор МРО определен в любом из пп. 10, 11 или п. 12.

Фигура 1. Роль окислительного стресса в мужском бесплодии

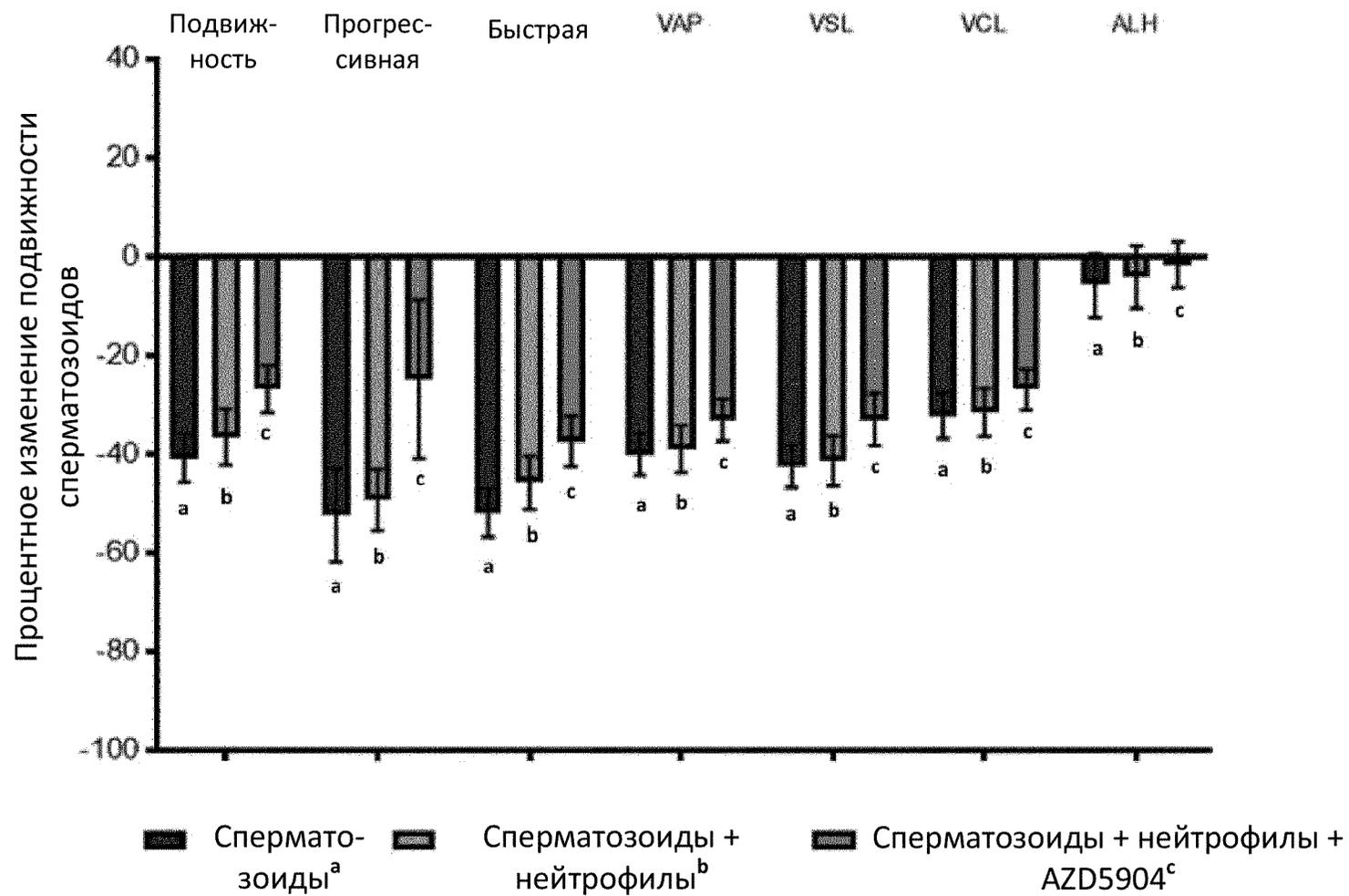


**Фигура 2. Таблица, показывающая исходную относящуюся к андрологии информацию о пациентах, параметры спермы и количество лейкоцитов**

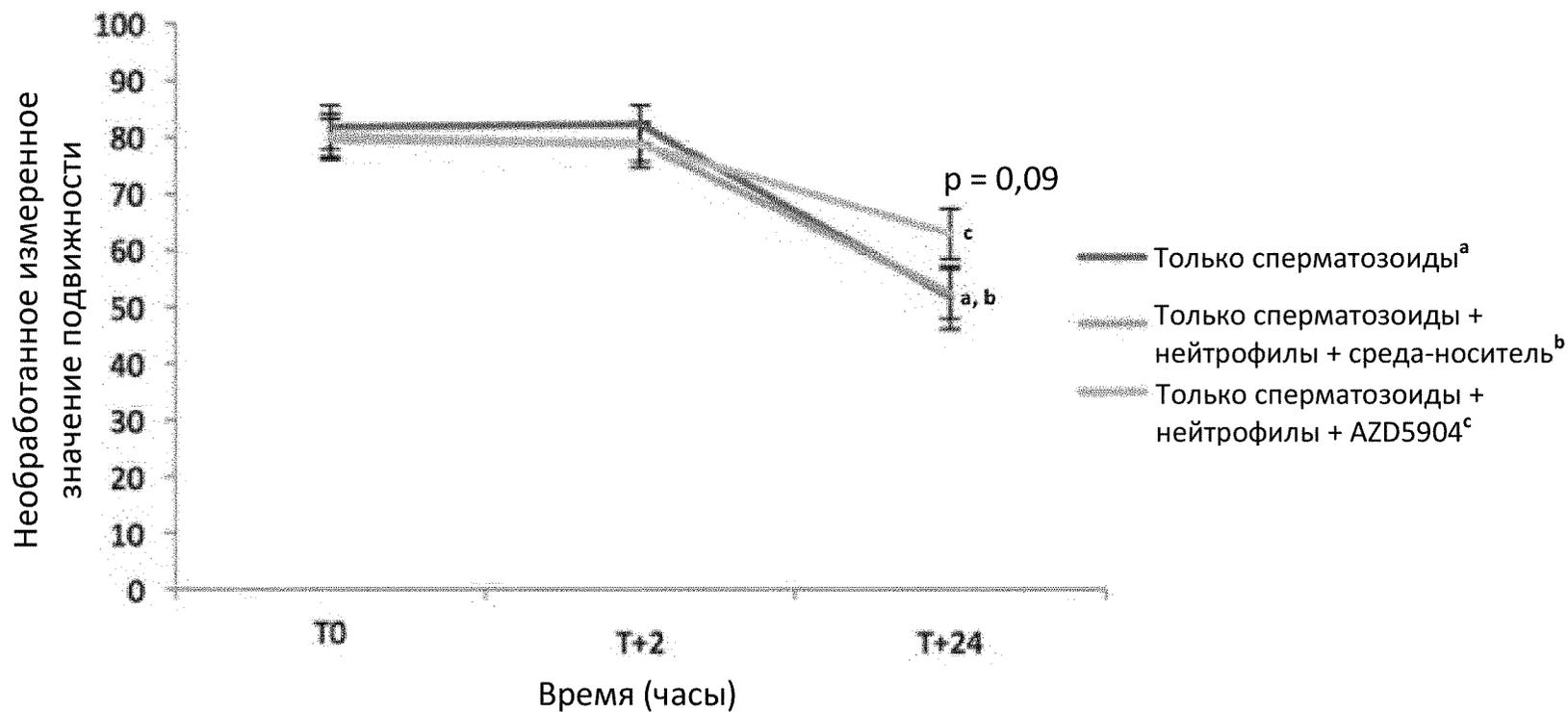
Возраст	Первичное/вторичное бесплодие	Длительность бесплодия (месяцев)	Параметры клинической андрологии					Значения CASA								Лейкоциты Количество (млн/мл)
			Объем (мл)	Количество (млн/мл)	Общая подвижность (%)	Морфология (% нормальных форм)	TZI	Необработанная				Обработанная				
								Количество (млн/мл)	Прогрессивная (%)	Быстрая (%)	Общая подвижность (%)	Количество (млн/мл)	Прогрессивная (%)	Быстрая (%)	Общая подвижность (%)	
35	вторичное	20	3,3	32	45	1,5	1,3	32	17	22	31	7,2	57	60	71	1,26
29	первичное	12	2,4	46	67	3,3	1,2	46	48	59	66	22,7	69	78	87	0,84
49	первичное	15	2,5	36	49	2,8	1,2	36	19	26	32	5,1	52	59	63	0,89
43	вторичное		2,6	16	58	1,8	1,4	16	16	23	28	2,7	42	44	44	0,39
32	первичное	24	2,6	92	48	2,8	1,2	92	41	59	66	17,2	55	70	79	0,93
33	вторичное		3,3	33	44	4,8	1,3	34	18	26	30	1,4	47	53	57	0,25
30		24	3,9	50	48	3,5	1,3	50	32	35	40	1,3	45	48	54	0,39
42	вторичное	56	1,6	138	50	0,8	1,5	138	19	31	31	2,9	61	67	76	2,2
38	первичное	14	1,9	48	49	1,8	1,4	48	14	20	32	1,3	67	39	77	0,69
35			3	61	45	3,8	1,3	62	21	26	35	10,1	83	87	92	0,48
40	вторичное		2,6	79	52	0	1,4	79	27	31	36	15,6	75	85	89	1,04
23			2,3	34	49	1	1,3	63	37	57	74	4,2	38	74	88	0,47
27			3,2	204	60	4,8	1,2	109	24	40	51	73,5	74	95	96	1,08
31	вторичное	30	3,2	156	58	4	1,3	117	48	69	77	20,8	48	87	90	3,22
24			6,2	23	38	3,2	1,3	36	21	30	38	26	68	88	89	0,18
25	первичное		3,8	31	44	1	1,5	62	11	26	34	11,5	51	76	78	2,45
29	вторичное	24	4,8	75	47	2,8	1,3	69	52	80	87	32,8	73	86	94	0,26
33								81	53	66	73	20,7	69	72	93	1,01
32	первичное	13	4,7	86	32	2,8	1,3	55	15	26	53	18,2	29	44	57	0,55
50			1,2	75	38			99	40	55	68	1,3	11	25	34	1,97
39			2,6	216	20			72	40	61	67	21	36	53	57	0,72
35	вторичное	54	2,5	21	35	5,8	1,3	33	23	37	48	2,2	58	69	71	0,37
42			4,1	112	48	6,3	1,2	65	54	69	73	46,7	38	70	73	0,49
36	первичное	18	5,4	20	38	1,3	1,3	38	15	20	34	9,4	27	73	78	0,29
н/д								92,5	45	69	79	31,9	71	88	94	
н/д								14,2	23	31	35	3,1	24	42	53	
н/д								33,5	18	32	47	6,4	31	46	53	
н/д								67,2	38	58	65	27	38	80	88	
н/д								24,2	12	17	25	1,9	42	46	46	

**Фигура 3а. Отличия в отношении параметров подвижности сперматозоидов после 24-часовой инкубации**

Усредненные показатели процентной разницы между значениями при T0 и T + 24 ч. (N = 29)

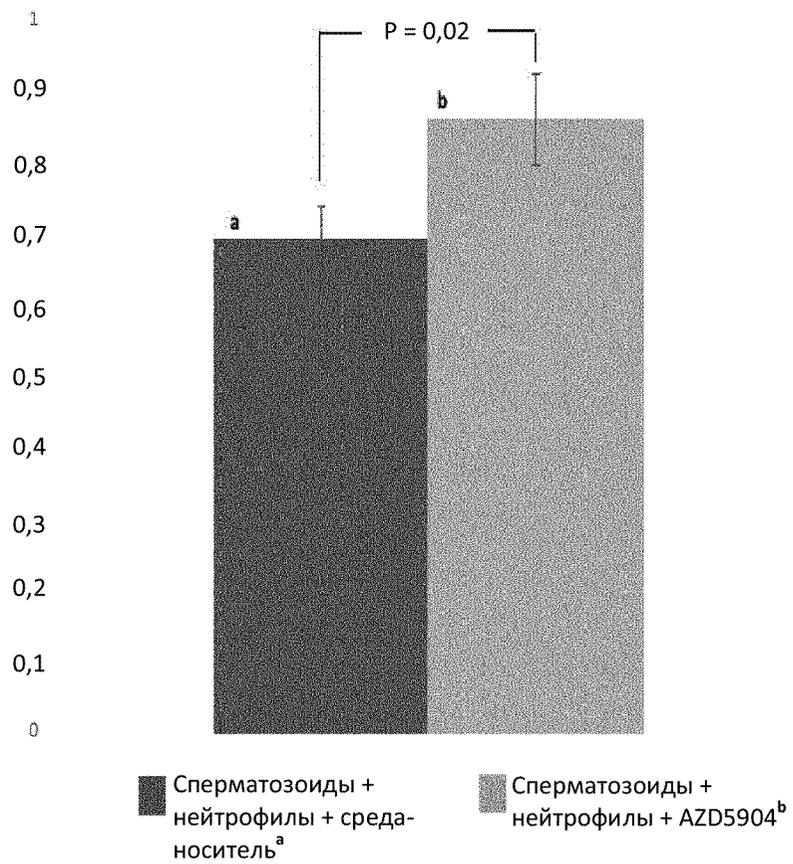


Фигура 3в. Изменение параметров подвижности сперматозоидов после 2-часовой и 24-часовой инкубации

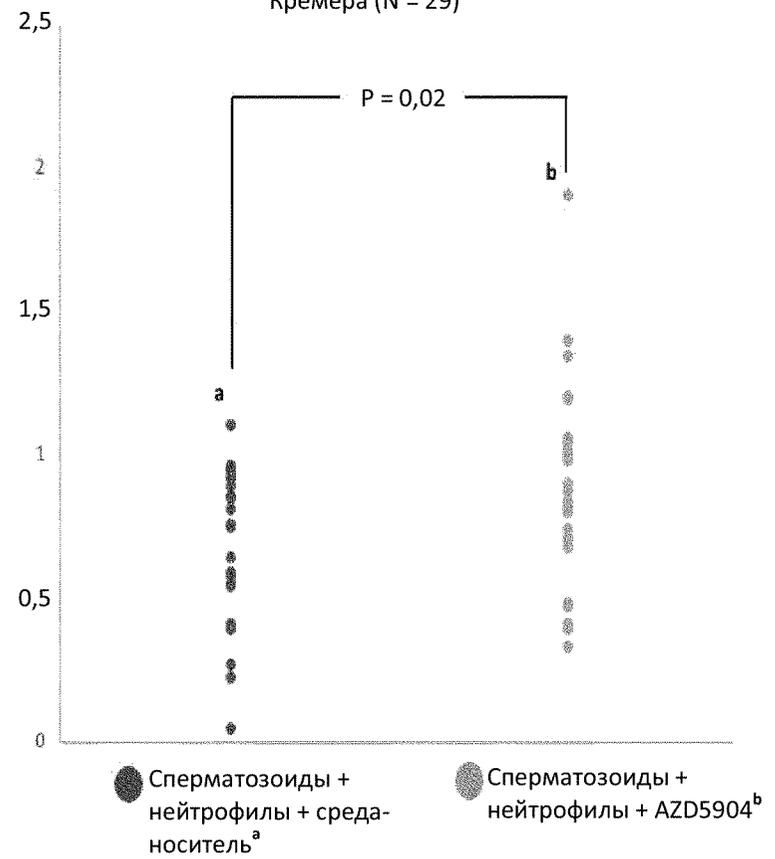


**Фигура 4. Эффект, оказываемый обработкой AZD5904 в пенетрационном тесте Кремера по прошествии 2 часов**

Показатель пенетрации согласно тесту Кремера (N = 29).  
Полные наборы данных

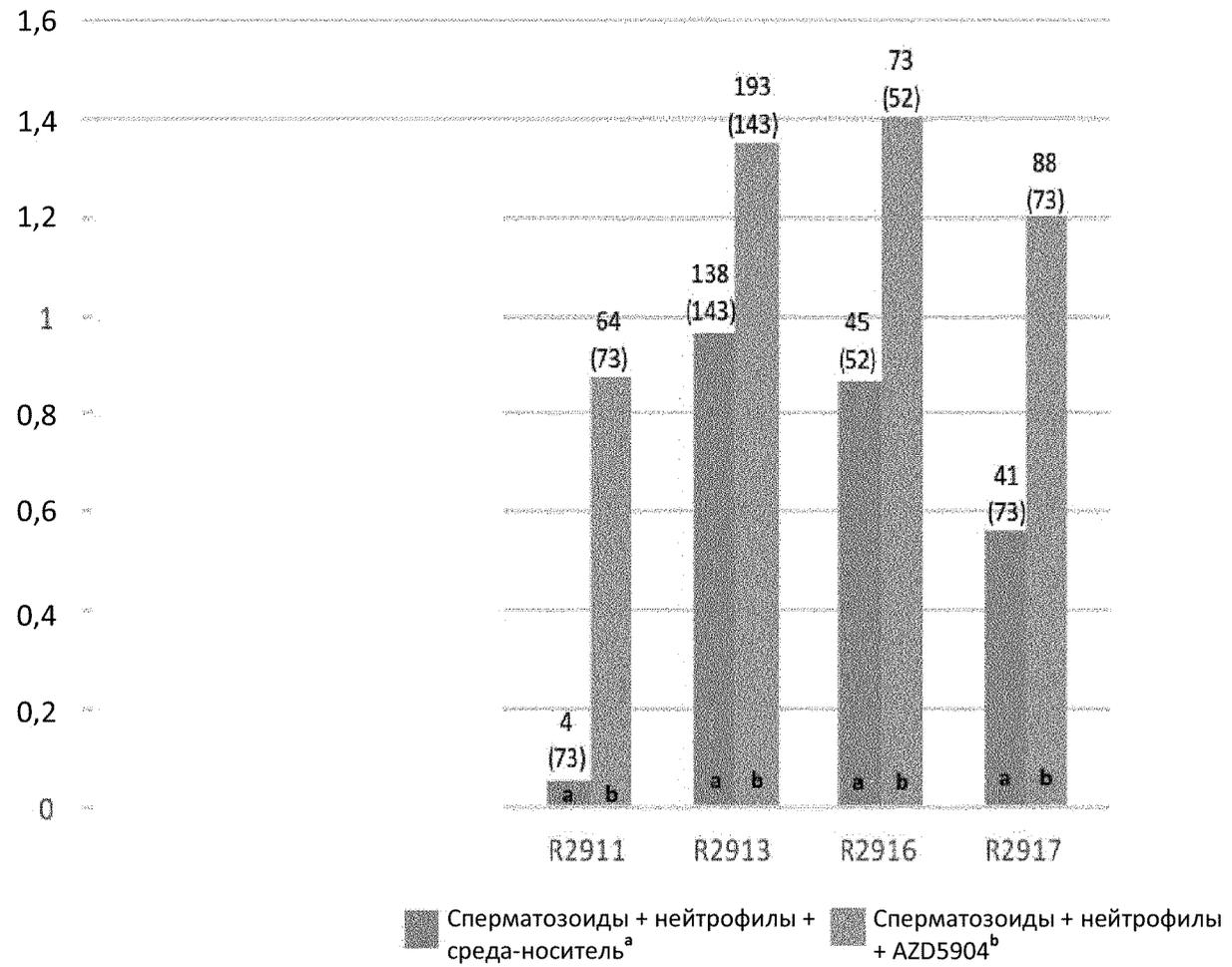


Показатель пенетрации согласно тесту Кремера (N = 29)



**Фигура 5. Примеры субъектов, продемонстрировавших положительный ответ на AZD5904 в пенетрационном тесте Кремера**

Показатель пенетрации согласно тесту Кремера



**Фигура 6. Средний уровень окрашивания MDA по результатам анализа проточной цитометрии**

