

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042397**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.09

(51) Int. Cl. **A61K 38/08** (2006.01)
A61P 15/08 (2006.01)

(21) Номер заявки
201791361

(22) Дата подачи заявки
2015.12.21

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРОВ ОКСИТОЦИНА В КАЧЕСТВЕ ЧАСТИ
ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

(31) 14199709.8; 14/643,307

(32) 2014.12.22; 2015.03.10

(33) EP; US

(43) 2017.11.30

(86) PCT/NL2015/050893

(87) WO 2016/105190 2016.06.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФЕРРИНГ Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Арсе Хоан-Карлес (DK)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) MORALOGU O. ET AL.: "Treatment with oxytocin antagonists before embryo transfer may increase implantation rates after IVF", REPRODUCTIVE BIOMEDICINE ONLINE, REPRODUCTIVE HEALTHCARE LTD, GB, vol. 21, no. 3, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 338-343, XP027238024, ISSN: 1472-6483 [retrieved on 2010-08-25] the whole document
WO-A2-2006121362

VRACHNIS NIKOLAOS ET AL.: "The oxytocin-oxytocin receptor system and its antagonists as tocolytic agents", INTERNATIONAL JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, 2011, vol. 2011, 2011, page 350546, XP002742088, ISSN: 1687-8345, the whole document
WO-A1-9823636

(57) Изобретение относится к применению антагониста рецепторов окситоцина у женщин, проходящих перенос эмбриона в рамках вспомогательных репродуктивных технологий. Предложено применение антагониста рецепторов окситоцина в качестве части вспомогательных репродуктивных технологий, где указанный антагонист вводят женщине, проходящей перенос эмбрионов, таким образом, что эффект антагониста пересекается со стадией восприимчивости эндометрия у указанной женщины, и эффект антагониста присутствует, когда эмбрион достиг стадии бластоцисты. Применение окситоцина в соответствии с изобретением приводит к увеличению частоты имплантации и/или живорождений.

B1

042397

**042397
B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной европейской заявки № 14199709.8, поданной 22 декабря 2014 г., и предварительной заявки США № 14/643307, поданной 10 марта 2015 г., полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к применению антагониста рецепторов окситоцина у женщин, проходящих перенос эмбриона в рамках вспомогательных репродуктивных технологий. В частности, предложены способы увеличения частоты продолжающейся имплантации эмбриона, увеличения частоты продолжающейся беременности, увеличения частоты наступления клинической беременности и/или увеличения частоты живорождения у субъектов женского пола, проходящих перенос эмбриона. В частности, высвобождение антагонистов происходит в лютеиновую фазу, когда эндометрий восприимчив к имплантации эмбриона и/или когда эмбрион достиг стадии бластоцисты.

Уровень техники

Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) представляет собой способ достижения беременности у субъектов женского пола. Процедура обычно включает стимуляцию яичников одним или несколькими гормонами; в основном фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) вводят для инициирования окончательного созревания фолликулов. Забор яйцеклеток происходит обычно через 2 дня (около 36 ч) после введения ХГЧ. Яйцеклетки затем оплодотворяют *in vitro*, культивируют несколько дней и переносят в матку. ЭКО также включает перенос эмбрионов, полученных из яйцеклеток одной женщины (донора) другой женщине (суррогатной матери). Эмбрионы можно хранить с помощью криоконсервации и трансплантировать (перенос криоконсервированных эмбрионов) через несколько месяцев или даже лет.

Увеличение частоты имплантации перенесенных эмбрионов представляет собой одну из основных проблем лечения с использованием вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Приблизительно только треть перенесенных эмбрионов имплантируется у женщин, проходящих контролируемую стимуляцию яичников для ЭКО/интраплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ). На частоту имплантации и наступления беременности влияет множество факторов, связанных с возрастом и другими особенностям пациентки, величиной ответа яичников на стимуляцию, качеством полученных эмбрионов, восприимчивостью эндометрия, а также самой процедурой переноса.

Сократимость матки рассматривают как потенциально важный фактор, влияющий на частоту имплантации и наступления беременности в циклах ЭКО/ИКСИ (Fanchin с соавт. 1998; Schoolcraft с соавт., 2001; Bullett and de Ziegler 2005). Высокая частота маточных сокращений во время переноса, по всей видимости, оказывает негативное воздействие ее на исход, возможно, вследствие выталкивания эмбрионов в полость матки или смещения эмбрионов, таким образом, снижая частоту имплантации и наступления беременности.

Данные наблюдений указывают на снижение частоты наступления клинической беременности при увеличении частоты сокращений во время переноса эмбриона на стадии дробления в день ХГЧ+4 дня (т.е. через четыре дня после введения ХГЧ, что соответствует второму дню после забора яйцеклеток) (Fanchin с соавт., 1998). В проспективном контролируемом исследовании также наблюдали, что у пациенток с более высокой частотой маточных сокращений в день переноса эмбриона на стадии дробления (день 3 после забора яйцеклеток) частота наступления беременности была ниже, чем у пациенток с более низкой частотой маточных сокращений во время переноса (Zhu с соавт., 2014).

Сократимость матки в циклах с контролируемой стимуляцией яичников сравнили с нормальными менструальными циклами (Ayoubi с соавт., 2003). Частоту маточных сокращений нашли одинаковой в момент введения ХГЧ в цикле с контролируемой стимуляцией яичников и во время выброса лютеинизирующего гормона (ЛГ) в естественном цикле. В лютеиновую фазу частота маточных сокращений была выше в день ХГЧ+4 дня (соответствует дню 2 после забора яйцеклеток) в цикле с контролируемой стимуляцией яичников по сравнению с ЛГ+4 дня (т.е. четыре дня после выброса ЛГ) в естественном цикле (Ayoubi с соавт., 2003). Однако частота маточных сокращений в день ЛГ+6 дней и ХГЧ+6 дней (соответствует дню 4 после забора яйцеклеток) не различалась и в обоих случаях была низкой, указывая на одинаковую степень покоя матки в указанный момент времени в цикле с контролируемой стимуляцией яичников и в естественном цикле (Ayoubi с соавт., 2003). В другом исследовании оценивали сократимость матки в день введения ХГЧ, ХГЧ+4 дня (соответствует дню 2 после забора яйцеклеток) и ХГЧ+7 дней (соответствует дню 5 после забора яйцеклеток) у женщин, проходящих цикл с контролируемой стимуляцией яичников (Fanchin с соавт., 2001). Частота маточных сокращений была наиболее высокой в день введения ХГЧ, несколько снижалась в течение ранней лютеиновой фазы, в соответствии с оценкой в день ХГЧ+4 дня, и практически достигла значений состояния покоя в день ХГЧ+7 дней (соответствует дню 5 после забора яйцеклеток). В рамках другого исследования сообщалось о снижении числа сокращений у доноров яйцеклеток в ранней лютеиновой фазе со 2 дня по 3 день, и также по 4 день после забора яйцеклеток (Lesny с соавт., 1999). Аналогично, определение сократимости матки у доноров яйцеклеток, которые прошли контролируемую стимуляцию яичников и получили поддержку лютеиновой фазы экзогенным прогестероном, показало значительное снижение частоты маточных сокращений со 2 дня

после забора яйцеклеток по 5 день после забора яйцеклеток (Bloeskeel с соавт., 2009).

Уровень сократимости матки наиболее высок в конце контролируемой стимуляции яичников (день введения ХГЧ), что связано с высокой концентрацией эстрадиола в сыворотке крови и низкой концентрацией прогестерона в сыворотке крови в указанный момент времени. Снижение сократимости матки в течение лютеиновой фазы считают результатом воздействия эндогенного прогестерона, обусловленного деятельностью желтого тела в ответ на введение ХГЧ, а также поддержки лютеиновой фазы экзогенным прогестероном, применяемой в циклах ЭКО/ИКСИ. Хотя добавочный прогестерон применяют для поддержки лютеиновой фазы у пациентов, проходящих ЭКО/ИКСИ, и он может снижать сократимость матки, имеет место повышенная маточная активность в течение ранней лютеиновой фазы (день 2 или 3 после забора яйцеклеток), когда проводят перенос эмбрионов на стадии дробления.

Поскольку сократимость матки повышена в течение ранней лютеиновой фазы (день 2 или 3 после забора яйцеклеток), когда проводят перенос эмбрионов на стадии дробления, исследования, оценивающие воздействие на сократимость матки различных вмешательств для улучшения имплантации, проводили в раннюю лютеиновую фазу (день 2 или 3 после забора яйцеклеток; ХГЧ+4 дня). Рандомизированные контролируемые исследования (Moon с соавт., 2004; Bernabeu с соавт., 2006; Kim с соавт., 2008; Ng с соавт., 2014), квази-рандомизированные контролируемые исследования (Moraloglu с соавт., 2010), ретроспективные исследования циклов со свежими и криоконсервированными эмбрионами (Chou с соавт., 2011; Lan с соавт., 2012) или исследования клинических случаев циклов со свежими и криоконсервированными эмбрионами (Pierzynski с соавт., 2007; Liang с соавт., 2009), сообщающие об обнаружении соединений, снижающих сократимость матки, таких как атосибан (Kim с соавт., 2008; Moraloglu с соавт., 2010; Ng с соавт., 2014), индометацин (Bernabeu с соавт., 2006) и пироксикам (Moon с соавт., 2004), все были проведены на 2 или 3 день после забора яйцеклеток, т.е. во время переноса эмбрионов на стадии дробления.

В недавно проведенном рандомизированном контролируемом испытании (Ng с соавт., 2014) сравнили результаты терапии после введения атосибана и введения плацебо пациентам, проходящих ЭКО/ИКСИ, с последующим переносом эмбрионов на стадии дробления на 2 день или 3 день после забора яйцеклеток. Указанное крупное исследование было предназначено для определения возможности подтверждения отдельных данных, полученных в предыдущих исследованиях меньшего масштаба. Указанное корректно спланированное, крупное (N=800), двойное слепое, рандомизированное, контролируемое испытание не показало значимого возрастания частоты имплантации или частоты живорождений при применении атосибана по сравнению с плацебо, что иллюстрирует частота живорождений 39,8% против 38%, соответственно (Ng с соавт., 2014). Таким образом, введение атосибана на 2 день или 3 день после забора яйцеклеток значимо не увеличивает частоту имплантации или частоту живорождений.

Следовательно, улучшение имплантации перенесенных эмбрионов остается одной из основных проблем лечения с использованием вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Целью настоящего изобретения является увеличение частоты имплантации, и, соответственно, увеличение частоты наступления беременности и частоты живорождений.

Краткое описание изобретения

Один аспект изобретения обеспечивает применение антагониста окситоцина с целью увеличения частоты продолжающейся имплантации, увеличения частоты продолжающейся беременности, увеличения частоты наступления клинической беременности и/или увеличения частоты живорождения по сравнению с контрольной группой у субъектов женского пола, проходящих перенос эмбрионов в рамках вспомогательных репродуктивных технологий, где антагонист вводят женщине таким образом, что эффект антагониста присутствует, когда женщина находится в стадии восприимчивости эндометрия (или пересекается с этой стадией) и/или когда эффект антагониста совпадает с достижением эмбрионом стадии бластоцисты. В предпочтительном варианте антагонист вводят таким образом, что его высвобождение происходит в стадии восприимчивости эндометрия и/или когда эмбрион достиг стадии бластоцисты. В предпочтительном варианте антагонист вводят в стадии восприимчивости эндометрия у женщины и/или когда эмбрион достиг стадии бластоцисты. В некоторых вариантах реализации антагонист разработан для немедленного высвобождения. В других вариантах реализации антагонист разработан как состав с замедленным или отсроченным высвобождением, такой как препарат пролонгированного действия, и его вводят перед началом стадии восприимчивости эндометрия и/или когда эмбрион находится еще на стадии дробления таким образом, что высвобождение антагониста происходит или продолжается при достижении стадии восприимчивости эндометрия и/или при достижении эмбрионом стадии бластоцисты. В предпочтительном варианте антагонист вводят таким образом, что терапевтически эффективное количество антагониста присутствует в организме, когда женщина находится в стадии восприимчивости эндометрия (или пересекается с этой стадией) и/или когда эффект антагониста совпадает с достижением эмбрионом стадии бластоцисты.

В предпочтительных вариантах реализации стадия восприимчивости эндометрия соответствует:

а) периоду с ЛГ+6 дней по ЛГ+9 дней, предпочтительно с ЛГ+6 дней по ЛГ+8 дней, в наиболее предпочтительном варианте дню ЛГ+7 естественного овуляторного цикла;

б) периоду с ХГЧ+6 дней по ХГЧ+9 дней, предпочтительно с ХГЧ+6 дней по ХГЧ+8 дней, в наиболее предпочтительном варианте дню ХГЧ+7 индуцированного овуляторного цикла;

в) периоду с дня 4 по день 7, предпочтительно с дня 4 по день 6, в более предпочтительном варианте дню 5 или 6, в наиболее предпочтительном варианте дню 5 поддержки лютеиновой фазы, где поддержку лютеиновой фазы начинают на следующий день после забора яйцеклеток в цикле ЭКО, предпочтительно, где женщина прошла стимуляцию яичников; или

г) периоду с дня 4 по день 9, предпочтительно с дня 5 по день 7, в более предпочтительном варианте дню 5 или дню 6 поддержки лютеиновой фазы, предпочтительно при подготовке к переносу криоконсервированных эмбрионов или ЭКО с участием третьей стороны, и предпочтительно где поддержку лютеиновой фазы начинают после подготовки эндометрия экзогенным эстрогеном по меньшей мере в течение 6 дней.

В предпочтительном варианте поддержка лютеиновой фазы включает добавочные прогестерон, хорионический гонадотропин человека, эстрадиол и агонисты прогестерона, прогестин и/или гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ).

Соответственно, антагонисты рецепторов окситоцина, которые можно применять для получения лекарственных средств для увеличения частоты продолжающейся имплантации, увеличения частоты продолжающейся беременности, увеличения частоты наступления клинической беременности и/или увеличения частоты живорождения у субъектов женского пола, проходящих перенос эмбрионов в рамках вспомогательных репродуктивных технологий. Также предусмотрено применение антагониста рецепторов окситоцина для получения лекарственного средства для применения женщинами, проходящими перенос эмбриона на стадии бластоцисты. В предпочтительном варианте лекарственное средство вводят таким образом, что его эффект перекрывается со стадией восприимчивости эндометрия и/или его вводят, когда эмбрион достиг стадии бластоцисты. В предпочтительном варианте высвобождение антагониста, входящего в состав лекарственного средства, в организме женщины происходит в стадию восприимчивости эндометрия у женщины и/или когда эмбрион достиг стадии бластоцисты. В предпочтительном варианте антагонист вводят таким образом, что терапевтически эффективное количество антагониста присутствует в организме, когда женщина находится в стадии восприимчивости эндометрия (или пересекается с этой стадией) и/или когда действие антагониста совпадает с достижением эмбрионом стадии бластоцисты.

В предпочтительных вариантах реализации женщина проходит перенос эмбриона на стадии бластоцисты и антагонист вводят женщине таким образом, что высвобождение антагониста в организме женщины происходит в тот же день, что и перенос эмбриона. В предпочтительном варианте антагонист вводят в период с 2 ч перед по 2 ч после переноса эмбриона (например, в составе с немедленным высвобождением), причем предпочтительно антагонист вводят дважды, при этом предпочтительно первое введение осуществляют примерно за 45 мин до переноса эмбриона и второе введение осуществляют примерно через 60 мин после первого введения. В предпочтительном варианте эмбрион на стадии бластоцисты имеет статус экспансии и хетчинга 3, 4, 5 или 6, причем в более предпочтительном варианте эмбрион на стадии бластоцисты представляет собой эмбрион на пятый день после инсеминации.

В предпочтительных вариантах реализации женщина проходит перенос эмбриона на стадии дробления и антагонист вводят женщине таким образом, что высвобождение антагониста происходит через два или три дня после переноса эмбриона. В предпочтительном варианте эмбрион на стадии дробления имеет по меньшей мере 6 бластомеров и фрагментацию 20% или менее, причем предпочтительно эмбрион на стадии дробления представляет собой эмбрион на второй или третий день после оплодотворения.

В предпочтительных вариантах реализации антагонист представляет собой селективный антагонист рецепторов окситоцина или антагонист рецепторов вазопрессина/окситоцина. В более предпочтительном варианте антагонист представляет собой селективный антагонист рецепторов окситоцина.

В предпочтительном варианте антагонист представляет собой барусибан. В предпочтительном варианте барусибан вводят подкожно. В предпочтительном варианте вводят от 30 до 80 мг, в более предпочтительном варианте 50 мг барусибана. В некоторых вариантах реализации женщина проходит перенос эмбриона на стадии бластоцисты и барусибан вводят женщине в виде препарата пролонгированного действия перед днем переноса эмбриона. В предпочтительном варианте женщина проходит перенос эмбриона на стадии бластоцисты и барусибан вводят женщине в день переноса эмбриона. В предпочтительном варианте 40 мг барусибана вводят подкожно за примерно 15, 30, 45, 60 или 75 мин (например, за 45 мин) до переноса эмбриона на стадии бластоцисты и 10 мг барусибана вводят подкожно через примерно 15, 30, 45, 60 или 75 мин (например, через 60 мин) после первого введения.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1А и 1Б представляют примеры антагонистов рецепторов окситоцина.

Фиг. 2 представляет соотношение шансов продолжающейся имплантации по дням переноса в клиническом испытании (BASIC).

Фиг. 3 представляет собой график частоты продолжающейся имплантации по дням переноса в клиническом испытании (BASIC).

Подробное описание изобретения

В настоящем документе глагол "содержать" и его спряжения используются в неограничивающем смысле для обозначения, что единицы, перечисленные после них, включены, но единицы, не упомянутые конкретно, не исключены. В дополнение глагол "состоять" может быть заменен на "по существу состоять

из", обозначая, что соединение или вспомогательное соединение, как определено в настоящем документе, могут содержать дополнительный(ые) компонент(ы) кроме конкретно обозначенных, указанные дополнительные компоненты не изменяют отличительные особенности изобретения.

Использование терминов в единственном числе (соотв. артиклям "a" и "an" в исходном тексте на английском языке) в настоящем документе относится к одному или более чем одному (т.е. по меньшей мере одному) объекту, обозначаемому этим термином. В качестве примера, "элемент" обозначает один элемент или более одного элемента.

Слово "приблизительно" или "примерно", используемое вместе с числовым значением (приблизительно 10, примерно 10), предпочтительно обозначает, что этому значению можно придать значение 10 плюс или минус 1% от значения.

В случаях, когда в настоящем документе указан диапазон, такой как, например, диапазон дней, диапазон включает обе крайние точки. Например, с дня ЛГ+6 по день ЛГ+9 включает день ЛГ+6, день ЛГ+7, день ЛГ+8 и день ЛГ+9.

В настоящем документе термин "эмбрион" относится к зиготе до восьми недель после оплодотворения. "Перенос эмбриона" представляет собой манипуляцию, в ходе которой один или более эмбрионов помещают в матку, полость матки или фаллопиевы трубы женщины.

В настоящем документе субъект женского пола представляет собой млекопитающее, включая людей, домашних животных, например, собак и кошек, домашний скот, такой как свиньи, лошади, ослы, козы, овцы, ламы, а также редкие и исчезающие виды. В предпочтительном варианте субъект представляет собой человека.

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) относятся к способам достижения беременности с применением искусственных средств. В предпочтительном варианте ВРТ относятся к способам, при которых оплодотворенный *in vitro* эмбрион переносят субъектам женского пола с использованием, например, ЭКО/ИКСИ.

"Перенос свежих эмбрионов" относится к переносу эмбриона без предварительной криоконсервации.

Обычно естественный овуляторный цикл длится от 21 до 35 дней при средней длительности 28 дней. Первая часть цикла относится к фолликулярной фазе, в которую происходит созревание фолликулов яичников. За ней следует овуляция, когда созревшая яйцеклетка выходит в маточную трубу. Лютеиновая фаза относится к фазе овуляторного цикла, начинающейся с формирования желтого тела в день ЛГ+1 и оканчивающейся в день перед первым днем менструации.

"Частота продолжающейся имплантации" в настоящем документе относится к количеству внутриматочных жизнеспособных плодов через 10-11 недель после переноса, разделенному на количество перенесенных эмбрионов/бластоцист. В предпочтительном варианте введение антагониста рецепторов окситоцина, как раскрыто в настоящем документе, увеличивает частоту продолжающейся имплантации по меньшей мере на 5%, в более предпочтительном варианте по меньшей мере на 10% и в наиболее предпочтительном варианте по меньшей мере на 20%.

"Частота продолжающейся беременности" в настоящем документе относится к беременности по меньшей мере одним внутриматочным жизнеспособным плодом через 10-11 недель после переноса, разделенной на количество перенесенных эмбрионов/бластоцист. В предпочтительном варианте введение антагониста рецепторов окситоцина, как раскрыто в настоящем документе, увеличивает частоту продолжающейся беременности по меньшей мере на 5%, в более предпочтительном варианте по меньшей мере на 10% и в наиболее предпочтительном варианте по меньшей мере на 20%.

"Частота имплантации" в настоящем документе относится к количеству внутриматочных плодных яиц с сердцебиением плода через 5-6 недель после переноса, разделенному на количество перенесенных эмбрионов/бластоцист. В предпочтительном варианте введение антагониста рецепторов окситоцина, как раскрыто в настоящем документе, увеличивает частоту имплантации по меньшей мере на 5%, в более предпочтительном варианте по меньшей мере на 10% и в наиболее предпочтительном варианте по меньшей мере на 20%.

"Частота наступления клинической беременности" в настоящем документе относится к беременности по меньшей мере одним плодным яйцом с сердцебиением плода через 5-6 недель после переноса, разделенной на количество перенесенных эмбрионов/бластоцист. В предпочтительном варианте введение антагониста рецепторов окситоцина, как раскрыто в настоящем документе, увеличивает частоту наступления клинической беременности по меньшей мере на 5%, в более предпочтительном варианте по меньшей мере на 10% и в наиболее предпочтительном варианте по меньшей мере на 20%.

"Частота живорождения" в настоящем документе относится к количеству живорождений среди женщин, проходивших лечение. В предпочтительном варианте введение антагониста рецепторов окситоцина, как раскрыто в настоящем документе, увеличивает частоту живорождения по меньшей мере на 5%, в более предпочтительном варианте по меньшей мере на 10% и в наиболее предпочтительном варианте по меньшей мере на 20%.

"Терапевтически эффективное количество" в настоящем документе относится к количеству, которое обеспечивает желаемый эффект, ради которого его вводят. В некоторых вариантах реализации тер-

мин относится к количеству, которого достаточно, чтобы при введении субъектам женского пола, проходящим перенос эмбриона, в соответствии с терапевтической схемой применения увеличить частоту продолжающейся имплантации, увеличить частоту продолжающейся беременности, увеличить частоту наступления клинической беременности и/или увеличить частоту живорождения.

Специалисты обычной квалификации в данной области техники поймут, что термин "терапевтически эффективное количество" фактически не требует достижения успеха в лечении конкретного пациента. Терапевтически эффективное количество скорее может быть таким количеством, которое обеспечивает определенный желаемый фармакологический ответ у значимого количества субъектов при введении субъектам женского пола, нуждающимся в указанном лечении. Специалисты обычной квалификации в данной области техники поймут, что в некоторых вариантах реализации терапевтически эффективное количество определенного препарата или терапии может быть составлено и/или введено в одной дозе. В некоторых вариантах реализации терапевтически эффективный препарат может быть составлен и/или введен множеством доз, например, в рамках схемы применения.

Один аспект изобретения обеспечивает антагонисты рецепторов окситоцина для применения с целью увеличения частоты продолжающейся имплантации, частоты продолжающейся беременности, частоты наступления клинической беременности и/или частоты живорождения по сравнению с контрольной группой у субъектов женского пола, проходящих перенос эмбрионов. В предпочтительном варианте частота продолжающейся имплантации увеличена по сравнению с контрольной группой.

Предшествующие крупные исследования в данной области техники описывают введение антагонистов рецепторов окситоцина в ранней лютеиновой фазе (соответствующей дню 2 или 3 после забора яйцеклеток), когда частота маточных сокращений высока. Ожидалось, что указанные соединения, которые снижают сократимость матки, улучшат имплантацию эмбриона. Однако антагонисты рецепторов окситоцина не показали никаких улучшающих имплантацию эффектов при использовании в раннюю лютеиновую фазу (Ng с соавт., 2014). По этой причине в некоторых вариантах реализации настоящее изобретение исключает составы немедленного высвобождения или практически немедленного высвобождения антагонистов рецепторов окситоцина, вводимые в раннюю лютеиновую фазу (т.е. до стадии восприимчивости эндометрия).

Настоящее раскрытие демонстрирует эффективность воздействия антагонистов рецепторов окситоцина на имплантацию эмбриона при введении после ранней лютеиновой фазы, или, скорее, в стадию восприимчивости эндометрия и/или когда эмбрион достиг стадии бластоцисты (см. пример 1). Поскольку частота маточных сокращений в этот период возвращается или практически возвращается к базовому уровню, было удивительно и неожиданно, что антагонист рецепторов окситоцина оказывал влияние на частоту имплантации.

Имплантация представляет собой ключевой процесс, при котором эмбрион приближается, прикрепляется и погружается в эндометрий. Матка принимает имплантирующийся эмбрион только в течение ограниченного периода времени, описанного как "окно имплантации" или "окно восприимчивости" (Markigiannakis, Minas 2006; Strowitzki с соавт., 2006). Окно имплантации представляет собой период в несколько дней, во время которого эндометрий достигает состояния восприимчивости, обеспечивающей возможность адгезии и инвазии эмбриона (Koot and Macklon 2013). Указанная стадия в настоящем документе называется "стадией восприимчивости эндометрия".

Успешная имплантация зависит не только от восприимчивости эндометрия, но также от функциональной полноценности эмбриона и синхронного взаимодействия между эмбрионом и материнскими тканями. Соответственно, во время окна восприимчивости к имплантации необходимо также, чтобы эмбрион был на подходящей стадии. Имплантация происходит после выхода эмбриона из блестящей оболочки. Соответственно, как широко известно в области ВРТ, если эмбрион переносят на стадии бластоцисты, в идеальном случае нужно, чтобы женщина находилась в стадии восприимчивости эндометрия, чтобы эндометрий и эмбрион были синхронизированы для имплантации. Если эмбрион переносят на стадии дробления, нужно, чтобы женщина находилась на стадии, предшествующей восприимчивости. Эндометрий и эмбрион будут продолжать развиваться таким образом, что когда эмбрион достигнет стадии бластоцисты, эндометрий достигнет стадии восприимчивости.

Соответственно, антагонисты, раскрытые в настоящем документе, вводят таким образом, что эффект антагониста перекрывается со стадией восприимчивости эндометрия и/или достижения эмбрионом стадии бластоцисты. В предпочтительном варианте антагонисты вводят таким образом, что высвобождение антагониста наступает или продолжается в стадию восприимчивости эндометрия и/или при достижении эмбрионом стадии бластоцисты. Как рассмотрено далее в настоящем документе антагонисты обычно составляют в виде композиций с немедленным высвобождением таким образом, что их вводят в течение стадии восприимчивости эндометрия. Однако изобретение также включает антагонисты, составленные в виде составов с контролируемым или отсроченным высвобождением, например, в виде препарата пролонгированного действия, таким образом, что их вводят в течение стадии, предшествующей восприимчивости эндометрия, но высвобождение происходит в стадии восприимчивости. В предпочтительном варианте терапевтически эффективное количество антагониста присутствует в организме в течение по меньшей мере части стадии восприимчивости эндометрия у женщины.

Ряд клеточных и морфологических изменений связан с переходом эндометрия до стадии восприимчивости в восприимчивый эндометрий. Также были определены биомаркеры, которые можно применять для оценки того, находится ли эндометрий в стадии восприимчивости. Например, тест для определения рецептивных свойств эндометрия Endometrial Receptivity Array (ERA) от Ignomix™ анализирует экспрессию 238 генов для определения находится ли эндометрий в стадии восприимчивости (см. WO 2010010201 и WO 2010010213). В предпочтительном варианте стадия восприимчивости эндометрия определяют как имеющий нормальный профиль рецепции на основании профиля экспрессии одного или более (например, всех) из 238 генов теста для определения рецептивных свойств эндометрия (ERA).

Период восприимчивости эндометрия можно также охарактеризовать на основании фазы нормального овуляторного цикла. Овуляция происходит после выброса лютеинизирующего гормона (ЛГ), который обычно происходит примерно на 14 день нормального овуляторного цикла. Точную фазу овуляторного цикла можно определить на основании времени выброса ЛГ. Выброс ЛГ можно измерить путем взятия образцов крови в различные дни цикла женщины. День выброса ЛГ считают днем ЛГ 0. Затем, ЛГ+1 обычно соответствует 15 дню цикла и ЛГ+7 обычно соответствует 21 дню. Эндометрий становится восприимчивым к имплантации примерно в день ЛГ+7 в естественных циклах и остается восприимчивым обычно примерно 4 дня (Bergh and Navot 1992), хотя указанное время различно для каждой женщины. В предпочтительных вариантах реализации стадия восприимчивости эндометрия соответствует периоду с дня ЛГ+6 по день ЛГ+9 естественного овуляторного цикла, в более предпочтительном варианте с ЛГ+6 по ЛГ+8. Окно восприимчивости в норме занимает 2-3 дня овуляторного цикла. Однако, как широко известно в данной области техники, среди женщин существует изменчивость и длительности окна, и времени его начала.

У женщин, проходящих забор яйцеклеток для переноса свежих эмбрионов, окно восприимчивости можно определять на основании дня после забора яйцеклеток, количества дней поддержки лютеиновой фазы после забора яйцеклеток и/или количества дней после введения ХГЧ.

При стандартной процедуре ЭКО стимуляцию яичников применяют с целью стимулировать образование нескольких яйцеклеток в яичнике. Агонисты гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ) и антагонисты ГнРГ можно применять для предотвращения преждевременной овуляции, тогда как менопаузальный гонадотропин человека (МГЧ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ) и кломифена цитрат можно применять для стимуляции образования нескольких яйцеклеток. Как правило, необходимо от восьми до четырнадцати дней стимуляции для достаточного развития фолликулов яичника. Затем обычно вводят хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) для обеспечения конечной стадии созревания, и осуществляют забор яйцеклеток перед овуляцией обычно примерно через 36 ч после введения ХГЧ. День введения ХГЧ считают ХГЧ+0 и забор яйцеклеток проводят в день ХГЧ+2.

В предпочтительных вариантах реализации стадия восприимчивости эндометрия соответствует периоду с дня ХГЧ+6 по день ХГЧ+9 (или точнее с 4 по 7 день после забора яйцеклеток), предпочтительно с дня ХГЧ+6 по день ХГЧ+8.

Взятие яйцеклеток представляет собой малоинвазивную хирургическую манипуляцию, которую можно проводить, например, с помощью трансвагинальной ультразвуковой аспирации. Яйцеклетки можно осмотреть под микроскопом и провести диагностику для изучения их морфологических особенностей. Затем проводят инсеминацию *in vitro*, например путем инкубации яйцеклеток со сперматозоидами или с путем интраплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ), при которой сперматозоид вводят внутрь яйцеклетки с помощью микроскопической иглы. "Оплодотворение" относится к проникновению сперматозоида в яйцеклетку и объединению их генетического материала, приводящих к формированию зиготы.

После оплодотворения эмбрионы культивируют *in vitro*. Способы культивации и определения стадии эмбрионов широко известны в данной области техники и описаны, например, в патентах США 20140134632, США 20140017717, США 20120252119 и США 20120252119, которые включены в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. Культуральная среда, известная в данной области техники, которая подходит для применения с целью поддержания *in vitro* клеточного развития и роста, включает жидкость маточных труб человека (HTF) (Irvine Scientific), N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этановую (HEPES) среду (Irvine Scientific), ЭКО-50 (Scandinavian IVF Science), S2 (Scandinavian IVF Science), G1 и G2 (Scandinavian IVF Science), UniIVF, ISM-1, BlastAssist, UTM среды (продаваемые под товарным наименованием MEDICULT® от Origio A/S), модифицированную среду Виттена, среду T6 Виттингема, среду Ham's F-10 и раствор Эрла. Среда G1 и G2 были составлены специально для обеспечения физиологических нужд эмбриона на стадии дробления и эмбриона от восьми клеток до стадии развития бластоцисты. Патент США № 6605468 описывает среду для развития эмбрионов ранних стадий до стадии бластоцисты.

Эмбрионы также можно подвергать морфологическому, кинетическому и/или генетическому исследованиям. В предпочтительном варианте визуальное наблюдение эмбриона с помощью микроскопа применяют для определения наличия физических или морфологических нарушений (см., например, WO

2013078312). Часто проводят предимплантационную генетическую диагностику для скрининга наследственных заболеваний. Для указанного способа одну или две клетки отделяют от эмбриона для тестирования на наличие генетических заболеваний.

Способы переноса эмбрионов широко известны в данной области техники. Один или более эмбрионов можно аспирировать в катетер и поместить в матку, полость матки или фаллопиевы трубы.

В некоторых вариантах реализации переносят эмбрион на стадии дробления. Эмбрионы на "стадии дробления" содержат от 2 клеток до 16 клеток и их можно характеризовать на основе, например, фрагментации, симметричности деления и отсутствию многоядерности (см. обзор Prados с соавт. Human Reproduction 2012 27:50-71). Фрагментацию обычно описывают в виде процента объема эмбриона, который замещен фрагментами. В предпочтительном варианте эмбрион на стадии дробления описывают как имеющий 4 бластомера в день 2 после инсеминации и 6-8 бластомеров в день 3 после инсеминации. В предпочтительном варианте эмбрион на стадии дробления имеет по меньшей мере 6 бластомеров и фрагментацию 20% или менее.

В предпочтительном варианте переносят эмбрион дня 2 или дня 3 стадии дробления. При переносе свежих эмбрионов, когда женщина проходила взятие яйцеклеток, эмбрион дня 2 или дня 3 стадии дробления затем обычно переносят через 2 или 3 дня после забора яйцеклеток, соответственно. Стадия бластоцисты эмбриона и стадия восприимчивости эндометрия наступают в идеальном случае одновременно через несколько дней после переноса.

В предпочтительном варианте переносят эмбрион на стадии бластоцисты. Эмбрион на "стадии бластоцисты" имеет внутреннюю клеточную массу, наружный слой клеток, называемый трофобластом, и заполненную жидкостью полость бластоцисты, содержащую внутреннюю клеточную массу, из которой развивается весь эмбрион. Эмбрион в норме достигает указанной стадии на 5 или 6 день после забора яйцеклеток. Эмбрион на стадии бластоцисты можно описывать на основании его статуса экспансии и хетчинга. Экспансия относится к увеличению объема полости (т.е. бластоцеле), тогда как хетчинг относится к выпячиванию или выходу бластоцисты из ее мембраны (т.е. блестящей оболочки). Стадию экспансии и хетчинга описывают следующим образом.

1. Ранняя бластоциста, бластоцеле занимает менее половины объема эмбриона.
2. Бластоциста с бластоцеле, чей объем равен половине или превышает половину объема эмбриона.
3. Бластоциста с бластоцеле, полностью заполняющей эмбрион.
4. Экспандированная бластоциста с объемом бластоцеле, превышающим объем раннего эмбриона, с истончением оболочки.
5. Хетчинг бластоцисты с трофобластом, начинающим выпячивание через оболочку.
6. Завершившая хетчинг бластоциста, где бластоциста полностью вышла из оболочки.

В предпочтительных вариантах реализации эмбрион для переноса на стадии бластоцисты имеет статус экспансии и хетчинга 3, 4, 5 или 6.

При переносе свежих эмбрионов, когда женщина прошла забор яйцеклеток, эмбрион на стадии бластоцисты обычно переносят женщине через 5 или 6 дней после забора яйцеклеток, предпочтительно через 5 дней после забора яйцеклеток.

У женщин, проходящих перенос свежих эмбрионов после забора яйцеклеток, эндометрий в день 2 или день 3 после забора яйцеклеток обычно находится на стадии, предшествующей восприимчивости и не подходит для имплантации. В предпочтительных вариантах реализации стадия восприимчивости эндометрия соответствует периоду с дня 4 по день 7 после забора яйцеклеток, предпочтительно с дня 5 по день 6. Если ХГЧ применяют для стимуляции овуляции или запуска окончательного созревания, дни с 4 по 7 после забора яйцеклеток в норме соответствуют с ХГЧ+6 по ХГЧ+9.

Стимуляция яичников лекарственными препаратами от бесплодия обычно приводит к дефициту лютеиновой фазы. Соответственно, применение поддержки лютеиновой фазы у женщин после забора яйцеклеток представляет собой в большинстве случаев стандартную практику. Поддержка лютеиновой фазы относится к терапевтическим вмешательствам в течение лютеиновой фазы, имеющим целью дополнение функции желтого тела для облегчения имплантации эмбриона и развития ранней беременности. Поддержка лютеиновой фазы известна в данной области техники и обычно содержит добавки с прогестероном, эстрадиолом и агонистом прогестерона, прогестиннов, ХГЧ и/или ГнРГ, или точнее введение экзогенных прогестерона, эстрадиола и агониста прогестерона, прогестиннов, ХГЧ и/или ГнРГ. Прогестерон в норме вводят внутримышечно или вагинально, а ХГЧ вводят внутримышечно или подкожно. В предпочтительном варианте поддержку лютеиновой фазы начинают в первый день после забора яйцеклеток, т.е. в день 1 после забора яйцеклеток.

В предпочтительном варианте стадия восприимчивости эндометрия соответствует периоду с дня 4 по день 7, предпочтительно с дня 4 по день 6, поддержки лютеиновой фазы у женщин, прошедших взятие яйцеклеток. В предпочтительных вариантах реализации женщина проходит стимуляцию яичников при подготовке к взятию яйцеклеток.

Настоящее изобретение включает перенос эмбрионов женщине в течение нескольких дней после оплодотворения (т.е. перенос свежих эмбрионов), а также применение криоконсервированных эмбрионов. Трансплантация криоконсервированных эмбрионов (FET) представляет собой известную процедуру,

в которой применяют криоконсервированные эмбрионы предшествующего цикла оплодотворения *in vitro* или ИКСИ. Криоконсервированные эмбрионы размораживают и переносят в полость матки через катетер. Изобретение также включает применение криоконсервированных яйцеклеток для оплодотворения. В указанных вариантах реализации яйцеклетки могут быть позднее разморожены, оплодотворены и культивированы и трансплантированы, как указано в настоящем документе.

Быстрое замораживание можно применять для указанных целей, например, вместе с криопротектором. Стандартные криопротекторы включают гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль и глицерин, 2-метил-2,4-пентандиол (МПД), диметилсульфоксид (ДМСО) и сахарозу. В альтернативном варианте витрификацию также можно применять для замораживания яйцеклеток или эмбрионов.

FET, также как "ЭКО с участием третьей стороны" (гестационная суррогатная беременность, донорство яйцеклеток, донорство эмбрионов), можно проводить во время естественного овуляторного цикла. Окно восприимчивости для указанных женщин можно определять на основании естественного овуляторного цикла, как указано в данном документе. В некоторых вариантах реализации овуляцию стимулируют введением, например, ХГЧ. В предпочтительном варианте у указанных женщин окно восприимчивости соответствует периоду с ХГЧ+6 по ХГЧ+9, предпочтительно с ХГЧ+6 по ХГЧ+8.

В некоторых вариантах реализации женщины, проходящие FET или ЭКО с участием третьей стороны, также получают поддержку лютеиновой фазы, как описано выше. В предпочтительном варианте у указанных женщин окно восприимчивости соответствует периоду с дня 4 по день 9, предпочтительно с дня 5 по день 7, поддержки лютеиновой фазы. Поддержку лютеиновой фазы часто применяют, когда FET или ЭКО с участием третьей стороны проводят во время "искусственного цикла". В указанных случаях эндометрий подготавливают введением эстрогена и/или прогестерона с применением способов, известных в данной области техники. В предпочтительном варианте поддержку лютеиновой фазы начинают после предварительной подготовки эндометрия экзогенным эстрогеном в течение по меньшей мере шести дней для запуска искусственного цикла.

В приведенном в качестве примера варианте реализации FET или ЭКО с участием третьей стороны эстроген вводят перорально или вагинально в дозировках 4-8 мг в день в течение примерно 10 дней, после чего начинают поддержку лютеиновой фазы введением прогестерона вагинально, и перенос бластоцисты происходит через 6 дней после начала введения прогестерона.

В одном из вариантов реализации изобретения действие антагониста рецепторов окситоцина распространяется на стадию бластоцисты эмбриона. В предпочтительном варианте высвобождение антагониста происходит, когда эмбрион достиг стадии бластоцисты. В предпочтительном варианте эмбрион на стадии бластоцисты переносят указанной женщине, и антагонист вводят в день переноса эмбриона. В предпочтительном варианте терапевтически эффективное количество антагониста присутствует в организме по меньшей мере в течение части стадии бластоцисты трансплантированного эмбриона.

Изобретение также рассматривает перенос эмбриона на стадии дробления. В указанных вариантах реализации антагонист можно обеспечивать в виде состава с замедленным или контролируемым высвобождением для высвобождения через несколько дней после переноса. В альтернативном варианте антагонист можно вводить через несколько дней после переноса в виде состава с немедленным высвобождением. Как показано в примерах, введение барусибана (антагонист рецепторов окситоцина), когда эмбрион находится на стадии бластоцисты, приводит к увеличению частоты продолжающейся имплантации с 27 до 45%, значимое увеличение.

Антагонисты рецепторов окситоцина известны в данной области техники, и любой антагонист рецепторов окситоцина можно применять в способах, входящих в изобретение. В предпочтительном варианте антагонисты рецепторов окситоцина выбирают из селективных антагонистов окситоцина и смешанных антагонистов рецепторов вазопрессина/окситоцина. Селективный антагонист окситоцина имеет сродство K_i к рецепторам окситоцина по меньшей мере на один порядок величин выше сродства K_i к рецепторам вазопрессина.

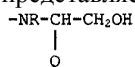
Антагонисты рецепторов включают соединения, которые уменьшают экспрессию и/или активность рецептора окситоцина. Предпочтительный антагонист рецепторов вазопрессина/окситоцина представляет собой атосибан (1-(3-меркаптопропановая кислота)-2-(О-этил-D-тирозин)-4-L-треонин-8-L-орнитин-окситоцин).

Антагонисты рецепторов окситоцина также включают РНК интерференцию или РНК нечувствительные молекулы, направленные против указанных рецепторов.

В предпочтительном варианте антагонист связывается с рецептором и препятствует активности рецептора. Такие антагонисты включают, например, антитела, направленные против рецепторов (например, "нейтрализующие антитела"), а также молекулы малого размера. В предпочтительном варианте антагонист действует как конкурирующий антагонист и конкурирует с окситоцином за связывание с рецептором окситоцина. В предпочтительном варианте антагонисты представляют собой молекулы малого размера, которые связываются с рецептором и противодействуют активности рецептора. Предпочтительный селективный антагонист окситоцина представляет собой барусибан.

Подходящие антагонисты рецепторов окситоцина широко известны среди специалистов и могут быть легко определены на основании известных способов скрининга, которые применяют, например,

активацию рецептора и/или связывание с рецептором в качестве индикатора. Подходящие антагонисты включают таковые, описанные в патенте США № 6143722, который включен в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. В патенте США № 6143722 описаны гептапептидные аналоги или их фармацевтически приемлемые соли, имеющие активность как антагонисты окситоцина и состоящие из гексапептидного фрагмента S и С-концевой бета-аминоспиртового остатка Z, связанного с фрагментом S амидной связью, где бета-аминоспирт Z представляет собой



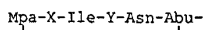
где Q представляет собой $(\text{CH}_2)_n\text{-NH-A}$;

n представляет собой 1-6;

A представляет собой H или $-\text{C(=NH)NH}_2$;

R представляет собой CH_3 или C_2H_5 ;

фрагмент S представляет собой



где Mpa, Ile, Asn и Abu имеют следующие значения:

Mpa 3 остаток меркаптопропионовой кислоты;

Ile остаток изолейцина;

Asn остаток аспарагина;

Abu остаток альфа-аминомасляной кислоты; и

где X представляет собой D-ароматическую альфа-аминокислоту и

Y представляет собой алифатическую альфа-аминокислоту. Предпочтительны антагонисты окситоцина, перечисленные на фиг. 1.

Также антагонисты включают OBE001/AS-602305 (в частности, их составы для перорального применения), TT-235 (Северо-Западный Университет), селективный антагонист рецепторов окситоцина Эпельсибан ((3R,6R)-3-(2,3-дигидро-1H-инден-2-ил)-1-[(1R)-1-(2,6-диметилпиридин-3-ил)-2-(морфолин-4-ил)-2-оксоэтил]-6-[(1S)-1-метилпропил]пиперазин-2,5-дион); ретосибан ((3R,6R)-6-[(2S)-бутан-2-ил]-3-(2,3-дигидро-1H-инден-2-ил)-1-[(1R)-1-(2-метил-1,3-оксазол-4-ил)-2-(морфолин-4-ил)-2-оксоэтил]пиперазин-2,5-дион); PF-3274167 (5-(3-(3-(2-хлоро-4-флуорофенокси)азетидин-1-ил)-5-(метоксиметил)-4H-1,2,4-триазол-4-ил)-2-метокси-пиридин); и L-368899 гидрохлорид (CAS 148927-60-0); L-371257 (1-[1-[4-(1-ацетилпиперидин-4-ил)окси-2-метоксибензоил]пиперидин-4-ил]-4H-3,1-бензоксазин-2-один). Дополнительные антагонисты окситоцина также описаны, например, в WO 2004020414 и WO 2005/028452, которые включены в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. В предпочтительном варианте антагонист выбирают из барусибана, атосибана, OBE001/AS-602305, PF-3274167, эпельсибана и ретосибана.

В предпочтительном варианте антагонист рецептора окситоцина включен в фармацевтическую композицию. Композиция может также включать фармацевтически приемлемые добавки, такие как консерванты, разбавители, диспергирующие агенты, агенты, способствующие всасыванию слизистой оболочкой (примеры которых описаны Merkus, F.W.H.M. с соавт., J. Controlled Release 24, 201-208, 1993 и которые включают поверхностно-активные вещества, желчные кислоты, фузидаты, фосфолипиды и циклодекстрины), буферные агенты и ароматизаторы. Такие композиции могут быть представлены в твердой форме (например, в виде таблеток, капсул или порошков) или в жидкой форме (например, в виде растворов или суспензий), которая в настоящем документе включает кремы и мази, для перорального или парентерального введения. Пероральный (включая сублингвальный и буквальный), интраназальный, ингаляционный, трансдермальный, ректальный, вагинальный, подкожный, внутримышечный и внутривенный пути введения могут все подходить для введения доз.

В некоторых вариантах реализации доставка фармацевтической композиции может осуществляться в системе с замедленным или отсроченным высвобождением. Например, антагонист можно вводить, применяя трансдермальный пластырь, или он может быть изготовлен в виде липофильного препарата пролонгированного действия (например, жирных кислот, восков, масел). В настоящем документе система с замедленным или отсроченным высвобождением обеспечивает также присутствие антагониста в организме субъекта в некоторый момент времени после введения, например, через несколько часов или даже несколько дней после введения. Такие системы с замедленным или отсроченным высвобождением позволяют вводить антагонисты рецепторов до наступления стадии восприимчивости эндометрия у женщины. Однако, замедленное или отсроченное высвобождение обеспечивает присутствие в организме достаточного количества (или точнее терапевтически эффективного количества) антагониста, когда женщина вступает в стадию восприимчивости эндометрия и/или когда эмбрион достигает стадии бластоцисты.

В тех вариантах реализации, где женщина проходит перенос эмбриона на стадии дробления, высвобождение антагониста должно происходить, когда эмбрион на стадии дробления развился в эмбрион на стадии бластоцисты и/или когда женщина достигла стадии восприимчивости эндометрия. При применении состава с немедленным высвобождением антагонист следует вводить через несколько дней после переноса эмбриона, предпочтительно через два или три дня после переноса эмбриона, так как это будет

соответствовать времени, когда эмбрион на стадии дробления развился в эмбрион на стадии бластоцисты и/или когда женщина достигла стадии восприимчивости эндометрия. При применении состава с замедленным или отсроченным высвобождением указанные составы можно вводить раньше, например, в день переноса эмбриона, при условии, что антагонист высвобождается, когда эмбрион на стадии дробления развился в эмбрион на стадии бластоцисты и/или когда женщина достигла стадии восприимчивости эндометрия.

В тех вариантах реализации, где женщина проходит перенос эмбриона на стадии бластоцисты, высвобождение антагониста должно происходить в день переноса эмбриона (например, в пределах того же 24-часового периода), так как это будет соответствовать времени, когда эмбрион достиг стадии бластоцисты и женщина достигла стадии восприимчивости эндометрия. В предпочтительном варианте антагонист вводят в период от 2 ч до и до 2 ч после переноса эмбриона. В более предпочтительном варианте антагонист вводят дважды. В приведенном в качестве примера варианте реализации с применением бариона первое введение может происходить примерно за 45 мин до переноса эмбриона и второе введение - примерно через 60 мин после первого введения.

Как широко известно среди специалистов, время введения зависит от того, какой конкретно антагонист применяют, в частности, от периода полувыведения антагониста. Антагонисты с относительно коротким периодом полувыведения могут нуждаться в многократном введении с целью обеспечения распространения их эффектов на стадию бластоцисты и/или стадии восприимчивости эндометрия.

Цитируемые источники.

Ayoubi J-M, Epiney M, Brioschi PA, Fanchin R, Chardonnens D, de Ziegler D. Comparison of changes in uterine contraction frequency after ovulation in the menstrual cycle and in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2003; 79: 1101-1105.

Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril* 1992; 58: 537-542.

Bernabeu R, Roca M, Torres A, Ten J. Indomethacin effect on implantation rates in oocyte recipients. *Hum Reprod* 2006; 21: 364-369.

Blockeel C, Pierson R, Popovic-Todorovic B, Visnova H, Garcia-Velasco JA, Mrázek M, Chou P-Y, Wu M-H, Pan H-A, Hung K-H, Chang F-M. Use of an oxytocin antagonist in in vitro fertilization-embryo transfer for women with repeated implantation failure: a retrospective study. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2011; 40: 136-140.

Fanchin R, Righini C, Olivennes F, Taylor S, de Ziegler D, Frydman R. Uterine contractions at the time of embryo transfer alter pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13: 1968-1974.

Fanchin R, Righini C, de Ziegler D, Olivennes F, Ledée N, Frydman R. Effects of vaginal progesterone administration on uterine contractility at the time of embryo transfer. *Fertil Steril* 2001; 75: 1136-1140.

Fuchs A-R, Behrens O, Maschek H, Kupsch E, Einspanier A. Oxytocin and vasopressin receptors in human and uterine myomas during menstrual cycle and early pregnancy. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 594-604.

Killick SR. Ultrasound and the receptivity of the myometrium. *RBM Online* 2007; 15: 63-67.

Kim CH, Lee JW, Jeon IK, Park E, Lee YJ, Kim SH, Chae H, Kang BM, Lee HA. Administration of oxytocin antagonist improves the implantation rates in patients with repeated failure of IVF/ICSI treatment. *Hum Reprod* 2008; 23 (Suppl. 1): i124.

Koot YEM, Macklon NS. Embryo implantation: biology, evaluation, and enhancement. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2013; 25: 274-279.

Lan VT, Khang VN, Nhu GH, Thuong HM. Atosiban improves implantation and pregnancy rates in patients with repeated implantation failure. *RBM Online* 2012; 25: 254-260.

Lesny P, Killick SR, Tetlow RL, Robinson J, Maguiness SD. Embryo transfer – can we learn anything new from the observation of junctional zone contractions? *Hum Reprod* 1998; 13: 1540-1546.

Liang YL, Kuo TC, Hung KH, Chen TH, Wu MH. Oxytocin antagonist for repeated implantation failure and delay of delivery. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2009; 48: 314-316.

Makrigiannakis A, Minas V. Mechanisms of implantation. *RBM Online* 2006; 14: 102-109.

Moon HS, Park SH, Lee JO, Kim KS, Joo BS. Treatment with piroxicam before embryo transfer increases the pregnancy rate after in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 2004; 82: 816-820.

Moraloglu O, Tonguc E, Turgut V, Zeyrek T, Batioglu S. Treatment with oxytocin antagonists before embryo transfer may increase implantation rates after IVF. *RBM Online* 2010; 21: 338-343.

Ng EH, Li RH, Chen L, Lan VT, Tuong HM, Quan S. A randomized double blind comparison of atosiban in patients undergoing IVF treatment. *Hum Reprod* 2014; 29: 2687-2694.

Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H, Venetis CA, Fatemi H, Tarlatzis B and Devroey P. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008; 23: 91-99.

Pierzynski P, Reinheimer TM, Kuczynski W. Oxytocin antagonists may improve infertility treatment. *Fertil Steril* 2007; 88: e19-e22.

Richter ON, Bartz C, Dowaji J, Kupka M, Reinsberg J, Ulrich U, Rath W. Contractile reactivity of human myometrium in isolated non-pregnant uteri. *Hum Reprod* 2006; 21: 36-45.

Schoolcraft WB, Surrey ES, Gardner DK. Embryo transfer: techniques and variables affecting success. *Fertil Steril* 2001; 76: 863-870.

Simón C, Martin JC, Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. *Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14: 815-826.

Shukovski L, Healy DL, Findlay JK. Circulating immunoreactive oxytocin during the human menstrual cycle comes from the pituitary and is estradiol dependent. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 455-460.

Stowitzki T, Germeyer A, Popovici R, Wolff M. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 617-630.

Zhu L, Che HS, Xiao L, Li YP. Uterine peristalsis before embryo transfer affects the chance of clinical pregnancy in fresh and frozen-thawed embryo transfer cycles. *Hum Reprod* 2014; 29: 1238-1243.

Все ссылки на патенты и литературу, процитированные в настоящем описании, включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

Изобретение также иллюстрируют нижеследующие примеры.

Указанные примеры не ограничивают объем изобретения, но служат только пояснением к изобретению.

Примеры

Пример.

Рандомизированное, плацебо-контролируемое, двойное слепое, многонациональное, многоцентровое исследование с параллельными группами, в котором оценивают влияние барусибана, вводимого подкожно в день переноса, на частоту имплантации и частоту наступления беременности у пациенток с ЭКО/ИКСИ.

Методика.

BASIC представляло собой рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое, многонациональное, многоцентровое исследование с параллельными группами. Оно было предназначено для оценки влияния барусибана, введенного либо в день переноса эмбриона на стадии дробления, либо в день переноса бластоцисты, на частоту продолжающейся имплантации у пациенток с ЭКО/ИКСИ. Пациентки, прошедшие контролируемую стимуляцию яичников по длинному протоколу с агонистом ГнРГ или по протоколу с антагонистом ГнРГ, получили ХГЧ для активации окончательного созревания фолликулов, прошли взятие яйцеклеток и получали ежедневную поддержку лютеиновой фазы добавками с вагинальным прогестероном, начиная с дня 1 после забора яйцеклеток, и прошли перенос в день 3 или день 5 после забора яйцеклеток. Пациентки были рандомизированы в соотношении 1:1 либо в группу, получающую барусибан, либо в группу плацебо со стратификацией в соответствии с днем переноса (день 3 после забора яйцеклеток или день 5 после забора яйцеклеток) и количеством эмбрионов/бластоцист для переноса. Всего в исследовании рандомизировали 255 пациенток с ЭКО/ИКСИ и получили 440 эмбрионов/бластоцист.

Исследуемый лекарственный препарат, т.е. барусибан или плацебо, в соответствии с рандомизацией, вводили в виде подкожных инъекций в два момента времени: первое введение 40 мг барусибана или плацебо произвели за 45 мин до переноса и второе введение 10 мг барусибана или плацебо произвели через 60 мин после первого введения.

Перенос проводили в день 3 (эмбрионы на стадии дробления) или день 5 (бластоцисты) после забора яйцеклеток. В день 3 переносили только эмбрионы высокого качества, определенного как ≥ 6 бластомеров и фрагментация $\leq 20\%$. В день 5 трансплантировали бластоцисты со статусом экспансии и хетчинга 3, 4, 5 или 6.

Фактическое количество перенесенных эмбрионов/бластоцист для каждой отдельной пациентки зависело от доступности эмбрионов/бластоцист надлежащего морфологического качества, местных правил и клинической практики для возраста пациентки, но максимальное количество составляло 2.

Ключевые аспекты, относящиеся к процедуре переноса, были стандартизованы. Гинекологическое зеркало вводили во влагалище и проводили очищение влагалища и шейки матки в соответствии с местной практикой, но с минимальными манипуляциями и повреждениями. Применяли мягкие и ультрамягкие катетеры. Наружную оболочку катетера вводили только до выхода во внутренний зев (т.е. оставляли наружную оболочку в цервикальном канале). Эмбрион(ы)/бластоцисту(ы) помещали во внутреннюю оболочку, которую затем вводили через наружную оболочку. Под контролем ультразвукового исследования брюшной полости эмбрион(ы)/бластоцисту(ы) помещали в 1,5-2,0 см от дна матки. Время от загрузки внутреннего катетера до размещения эмбриона(ов)/бластоцист(ы) не должно было превышать 1 мин. После размещения внутреннего и наружного катетеры извлекали и проверяли на наличие оставшихся эмбриона(ов)/бластоцист(ы), слизи и крови. После подтверждения отсутствия в катетерах оставшихся эмбриона(ов)/бластоцист(ы) извлекали гинекологическое зеркало; это происходило приблизительно в течение 2 мин после размещения эмбриона(ов)/бластоцист(ы). Любые осложнения/непредвиденные обстоятельства, происходившие во время процедуры переноса, документировали.

Пациентки получали вагинальные таблетки прогестерона 100 мг дважды в день со дня после забора яйцеклеток и до дня приема по поводу клинической беременности. В день переноса пациенткам следует вводить таблетки прогестерона по меньшей мере за 3 ч до переноса и по меньшей мере через 3 ч после переноса. Частоту продолжающейся имплантации (первичную конечную точку) определяли как количество внутриматочных жизнеспособных плодов на 10-11 неделе после переноса, разделенное на количество перенесенных эмбрионов/бластоцист.

С соблюдением статистической методологии первичную гипотезу проверяли, применяя регрессионную логистическую модель с продолжающейся имплантацией (да/нет) в качестве исхода и лечением и рандомизационной стратой в качестве факторов. Эффект лечения представлен на шкале отношения шансов, так как это показывает результат регрессионного логистического анализа; анализа, который допускает включение факторов и ковариаций. Необходимо подчеркнуть, что отношение шансов, основанное на регрессионной логистической модели, обеспечивает наиболее подходящий путь представления данных и основания для оценки эффекта лечения.

На вероятность благополучного исхода переноса эмбриона влияют несколько факторов, включая день переноса, количество перенесенных эмбрионов/бластоцист и качество перенесенных эмбрионов/бластоцист. Рандомизация была стратифицирована по первым двум из указанных факторов, что обеспечивало сопоставимые группы. Однако, поскольку эмбрионы развиваются непрерывно, не представлялась возможной стратификация для качества перенесенных эмбрионов/бластоцист. Взамен поправка на качество эмбрионов/бластоцист была включена в первичный анализ.

Результаты.

Влияние лечения на различные стадии восприимчивости и имплантационный потенциал эмбрионов на стадии дробления и бластоцист было очевидно, что иллюстрируется общей частотой продолжающейся имплантации 19% для переносов в день 3 после забора яйцеклеток и 38% для переноса в день 5 после забора яйцеклеток. Одинаковую закономерность наблюдали и в группе, получающей барусибан, и в группе плацебо.

Наблюдаемая в исследовании общая (день 3 + день 5) частота продолжающейся имплантации составила 27,1% для барусибана и 28,2%¹ (¹ данные, представленные в данном документе, относятся к популяции по протоколу (PP). Такие же результаты наблюдали у популяции, начавшей лечение (ITT). Например, частота продолжающейся имплантации у популяции ITT составила 26,2% для барусибана и 27,9% для плацебо), соответствуя отношению шансов² (² отношения шансов основаны на логистической регрессионной модели, для которой расчеты согласовывают с локализацией, первичной причиной бесплодия и качеством эмбриона/бластоцисты) 1,1 (доверительный интервал для доверительной вероятности 0,95 составил 0,7-1,8; $p=0.6960$), т.е. в пользу барусибана, но не значимо. Таким образом, первичная конечная точка для общей популяции исследования не была достигнута, но, как описано ниже, это произошло из-за взаимного влияния дней переноса. Трансплантация эмбрионов на стадии дробления в день 3 после забора яйцеклеток дала отношение шансов 0,3 (0,3-1,2; $p=0,1509$) (фиг. 2). Анализ страты дня 5 после забора яйцеклеток имел результатом отношение шансов 2.3 (1,1-4,7; $p=0,0270$) и, таким образом,

показал значимое влияние лечения барусибаном на частоту продолжающейся имплантации для переноса бластоцист (фиг. 2). Отношение шансов 2,3 соответствует согласованным значениям частоты продолжающейся имплантации для переноса бластоцист 45% для барусибана против 27% для плацебо (относительное изменение на 67%) (фиг. 3).

Результаты исследования BASIC показали, что на интерпретацию воздействия антагониста окситоцина на частоту имплантации повлиял день переноса; переноса эмбриона на стадии дробления (день 3 после забора яйцеклеток) или переноса бластоцисты (день 5 после забора яйцеклеток). Никакого воздействия на частоту продолжающейся имплантации не было установлено для барусибана, когда перенос эмбриона на стадии дробления проводили в день 3 (стадия, предшествующая восприимчивости). Однако значимое ($p=0,0270$) воздействие барусибана на частоту продолжающейся имплантации наблюдали, когда перенос бластоцисты проводили в день 5 (стадия восприимчивости).

Исследование BASIC определило время окна для клинически значимого влияния барусибана или в целом антагонистов окситоцина и смешанных антагонистов рецепторов вазопрессина/окситоцина на имплантацию, которое не было предугадано до проведения исследования. Воздействие на частоту имплантации заметно, когда антагонист окситоцина вводят во время имплантации, в день 5 после забора яйцеклеток (или позднее), но не в раннюю лютеиновую фазу в день 2-3 после забора яйцеклеток.

Недостаток устойчивого эффекта между переносами эмбрионов на стадии дробления в день 3 после забора яйцеклеток и переносами бластоцист в день 5 после забора яйцеклеток имеет важность для гипотез о механизмах, относящихся к сократимости матки и последствий для исхода цикла. Для обоих дней дозировка и способ проведения фармакологического вмешательства, а также процедура переноса совпадали. Таким образом, предполагаемые механизмы, такие как изгнание или рассеивание эмбрионов/бластоцист в связи с сократимостью матки в раннюю лютеиновую фазу или в связи с процедурой переноса эмбриона/бластоцисты, не следует в дальнейшем рассматривать как возможные объяснения увеличения частоты имплантации препаратами расслабляющими мускулатуру матки, включая антагонисты окситоцина или смешанные антагонисты вазопрессина/окситоцина. В случае если указанные механизмы были бы наиболее значимыми, полученные результаты оказались бы одинаковыми для наблюдений дня 3 и дня 5 после забора яйцеклеток.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение антагониста рецепторов окситоцина в качестве части вспомогательных репродуктивных технологий, где указанный антагонист вводят женщине, проходящей перенос эмбрионов, таким образом, что эффект антагониста пересекается со стадией восприимчивости эндометрия у указанной женщины, и эффект антагониста присутствует, когда эмбрион достиг стадии бластоцисты.

2. Применение по п.1, где стадия восприимчивости эндометрия соответствует:

а) периоду с ЛГ+6 (6 дней после выброса лютеинизирующего гормона) по ЛГ+9, предпочтительно с ЛГ+6 по ЛГ+8, естественного овуляторного цикла;

б) периоду с ХГЧ+6 (6 дней после введения хорионического гонадотропина человека) по ХГЧ+9, предпочтительно с ХГЧ+6 по ХГЧ+8, индуцированного овуляторного цикла;

в) периоду с дня 4 по день 7, предпочтительно с дня 4 по день 6, поддержки лютеиновой фазы, следующей за забором яйцеклеток, предпочтительно где женщина прошла стимуляцию яичников;

г) периоду с дня 4 по день 9, предпочтительно с дня 5 по день 7, поддержки лютеиновой фазы, где предпочтительно поддержку лютеиновой фазы начинают после подготовки эндометрия экзогенным эстрогеном по меньшей мере в течение 6 дней.

3. Применение по п.2, где поддержка лютеиновой фазы включает добавки прогестерона, эстрадиола и агонистов прогестерона, хорионического гонадотропина человека, прогестиннов и/или гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ).

4. Применение по любому из предшествующих пунктов формулы изобретения, где женщина проходит перенос эмбриона на стадии бластоцисты, и антагонист вводят женщине таким образом, что высвобождение антагониста происходит в день переноса эмбриона.

5. Применение по п.4, где антагонист вводят женщине в день переноса эмбриона.

6. Применение по п.5, где антагонист вводят в период от 2 ч до и до 2 ч после переноса эмбриона, предпочтительно где антагонист вводят дважды, предпочтительно где первое введение происходит примерно за 45 мин до переноса эмбриона и второе введение происходит примерно через 60 мин после первого введения.

7. Применение по любому из пп.4-6, где эмбрион на стадии бластоцисты имеет статус экспансии и хетчинга 3, 4, 5 или 6, предпочтительно где эмбрион на стадии бластоцисты представляет собой эмбрион в день 5 после оплодотворения.

8. Применение по любому из пп.1-3, где женщина проходит перенос эмбриона на стадии дробления, и антагонист вводят женщине таким образом, что высвобождение антагониста происходит через два или три дня после переноса эмбриона, предпочтительно где антагонист вводят женщине через два или три дня после переноса эмбриона.

9. Применение по п.8, где эмбрион на стадии дробления имеет по меньшей мере 6 бластомеров и фрагментацию 20% или менее, предпочтительно где эмбрион на стадии дробления представляет собой эмбрион в день 2 или день 3 после оплодотворения.

10. Применение по любому из вышеперечисленных пунктов формулы изобретения, где антагонист представляет собой селективный антагонист рецепторов окситоцина или антагонист рецепторов вазо-прессина/окситоцина.

11. Применение по любому из предшествующих пунктов формулы изобретения, где антагонист выбран из барусибана, атосибана, ОВЕ001, эпельсибана, ретосибана, ТТ-235, PF-3274167 (5-(3-(3-(2-хлоро-4-флуорофенокси)азатедин-1-ил)-5-(метоксиметил)-4Н-1,2,4-триазол-4-ил)-2-метоксипиридина); L-368,899 гидрхлорида (CAS 148927-60-0) и L-371,257 (1-[1-[4-(1-ацетилпиперидин-4-ил)окси-2-метоксибензоил]пиперидин-4-ил]-4Н-3,1-бензоксазин-2-он).

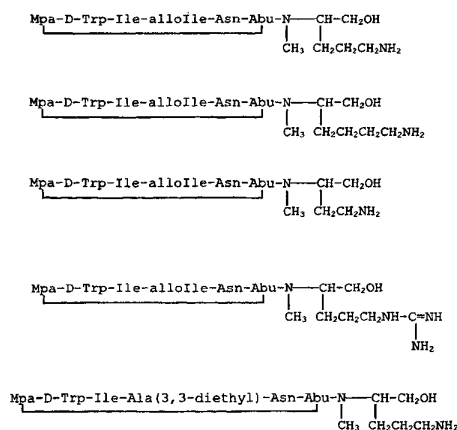
12. Применение по п.10, где антагонист представляет собой барусибан.

13. Применение по п.12, где барусибан вводят подкожно.

14. Применение по любому из пп.12 или 13, где вводят от 30 до 80 мг, предпочтительно 50 мг, барусибана.

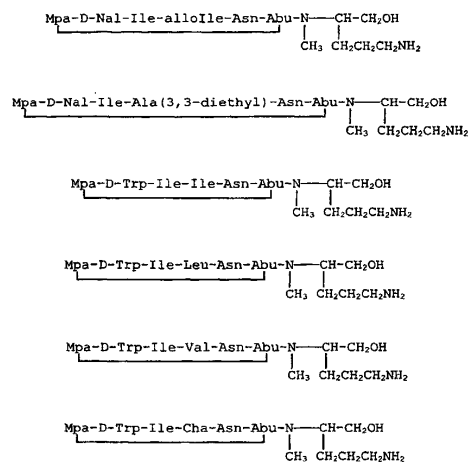
15. Применение по любому из пп.12-14, где женщина проходит перенос эмбриона на стадии blastocysts и барусибан вводят женщине в день переноса эмбриона.

16. Применение по п.15, где 40 мг барусибана вводят подкожно за 45 мин до переноса эмбриона и 10 мг барусибана вводят подкожно через 60 мин после первого введения.



Mpa - остаток меркаптопропионовой кислоты
 D-Trp - остаток D-триптофана
 Ile - остаток изолейцина
 alloIle - остаток алло-изолейцина
 Asn - остаток аспарагина
 Abu - остаток альфа-аминомасляной кислоты
 Ala - (3,3-диэтил)остаток 3,3-диэтилаланина

Фиг. 1А



Mpa - остаток меркаптопропионовой кислоты
D-Nal - остаток D-нораланина
Ile - остаток изолейцина
alloIle - остаток алло-изолейцина
Asn - остаток аспарагина
Abu - остаток альфа-аминомасляной кислоты
Ala - (3,3-диэтил)остаток 3,3-диэтилаланина
D-Trp - остаток D-триптофана
Leu - остаток лейцина
Val - остаток валина
Cha - остаток циклогексилаланина

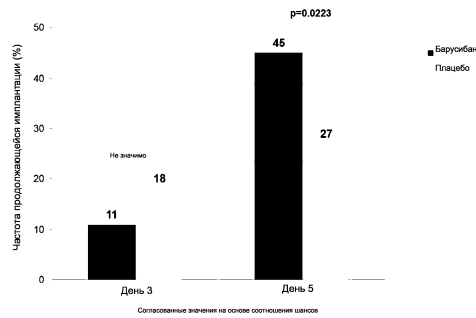
Фиг. 1Б

	Барусибан	Плацебо	Соотношение шансов Доверительный интервал для доверительной вероятности 0.95	p-значение
Частота продолжающейся имплантации День 3 + День 5	27.1%	28.2%	1.1 [0.7; 1.8]	0.6960

	Соотношение шансов Доверительный интервал для доверительной вероятности 0.95	p-значение
Частота продолжающейся имплантации Барусибан против Плацебо		
День 3	0.6 [0.3; 1.2]	0.1509
День 5	2.3 [1.1; 4.7]	0.0270

Расчеты составлены с использованием логистической регрессии и методов выборочной статистики

Фиг. 2



Фиг. 3

