



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 06 675 T2 2004.09.30**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 196 153 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 06 675.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP00/07108**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 947 995.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/007021**

(86) PCT-Anmeldetag: **25.07.2000**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **01.02.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.04.2002**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **19.11.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.09.2004**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **A61K 31/00**

**A61K 31/352, A61K 31/37, A61K 31/5377,  
A61K 35/52, A61D 19/00, A61D 19/02,  
A01N 1/02, A61P 15/08**

(30) Unionspriorität:

**FI990171 26.07.1999 IT**

(73) Patentinhaber:

**Applied Research Systems ARS Holding N.V.,  
Curacao, AN**

(74) Vertreter:

**Patentanwälte Bosch, Graf v. Stosch, Jehle, 80639  
München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**LUCONI, Michaela, I-50137 Firenze, IT; BALDI,  
Elisabetta, I-50018 Scandicci-Firenze, IT; FORTI,  
Gianni, I-50134 Firenze, IT**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR VERBESSERUNG DER FERTILISIERENDEN AKTIVITÄT VON SPERMATOZOA**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verbesserung der Fertilisationsaktivität von Spermatozoen, insbesondere zur Vergrößerung der Motilität von Spermatozoen durch Inhibierung des Enzyms Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Die Erfindung betrifft weiterhin Verwendungen und Verfahren von PI3K-Inhibitoren bei Infertilität und assistierten Reproduktionstechniken ("assisted reproduction techniques") als auch ein Medium zur Aufbewahrung und/oder zum Transport von Spermatozoen, umfassend PI3K-Inhibitoren.

## Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Infertilität eines Paares wird als Unvermögen der Frau definiert, nach mindestens einem Jahr des regelmäßigen, ungeschützten Sexualverkehrs schwanger zu werden. Infertilität kann durch eine Vielzahl von Einflußfaktoren verursacht werden, wobei männliche Einflußfaktoren eine entscheidende Rolle bei ungefähr 40 bis 50% der Fälle spielen. Die reduzierte männliche Fertilität ist im allgemeinen verbunden mit Veränderungen von Sperma-betreffenden Parametern, wie zum Beispiel der Morphologie, der Motilität und der Spermienanzahl.

[0003] Verschiedene assistierte Fertilisationstechniken (ARTs) werden zur Behandlung der Infertilität des Paares vorgeschlagen, wobei es in vielen Fällen möglich gemacht wird, die Problematik sowohl der männlichen als auch der weiblichen Einflußfaktoren zu überwinden. Diese Verfahren, deren Wahl abhängig von der Art der getroffenen Diagnose ist, können das Ansammeln von männlichen und weiblichen Keimzellen (Spermatozoen und Oozyten) betreffen.

[0004] Die weitere Behandlung variiert je nach Ursache der Infertilität. Die Keimzellen können direkt in den Eileiter (GIFT = "Gamete Intra Fallopian Transfer" = Intra-Eileiter-Transfer von Gameten) überführt werden oder werden miteinander in einem Teströhrchen in Kontakt gebracht. Wenn letzteres zu einer Fertilisation der Oozyten führt, wird die resultierende Zygote oder der Embryo in den Uterus transferiert (IVFET = "In Vitro Fertilization and Embryo Transfer", In-Vitro-Fertilisation und Embryonen-Transfer).

[0005] Falls die Infertilität auf einen männlichen Einflußfaktor(en) zurückgeht, bestimmen die Parameter der Samenflüssigkeit und insbesondere die Anzahl und die Motilität der Spermatozoen die Wahl der jeweilig angewandten assistierten Fertilisationsmethode. In den schwersten Fällen der männlich bedingten Infertilität ist/sind die Spermatozoenanzahl und/oder ihre Motilität sehr niedrig. Die Fertilisationsaktivität von Sperma wird gewöhnlich in einem Spermogramm bewertet. Entsprechend den WHO-Standards, welche dem WHO-Handbuch "WHO manual" (WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions, 4. Auflage, Cambridge University Press 1999) entnommen werden können, wird Sperma in die folgenden Gruppen eingeordnet:

- Normozoospermie: Wenn alle Spermatozoen-Parameter normal sind zusammen mit normalem Samenplasma, WBCs (weiße Blutzellen) und keine Agglutinierung;
- Oligozoospermie: Wenn die Spermienkonzentration < 20 Millionen/ml ist; Teratozoospermie: Weniger als 50% Spermatozoen mit Vorwärtsbewegung (Kategorien (a) und (b)) oder weniger als 25% Spermatozoen mit Kategorie (a)-Beweglichkeit;
- Asthenozoospermie: Weniger als 50% Spermatozoen mit normaler Morphologie; Oligoasthenoteratozoospermie: Bedeutet Störung aller drei Variablen (es kann auch eine Kombination von nur zwei Präfixen verwendet werden);
- Azoospermie: Keine Spermatozoen im Ejakulat.

[0006] Normalwerte der Spermaparameter sind von der WHO herausgegeben worden, die im allgemeinen als Referenz eingesetzt werden. Die Fraktion des beweglichen Sperma im Samenejakulat wird entweder durch manuelles Zählen oder unter Verwendung eines Computerunterstützten Samenanalyse-Systems (CASA) gemessen. Die Motilität wird zum Zeitpunkt der Samenverflüssigung und nach einer und drei Stunden bewertet, um Asthenozoospermie zu detektieren. Manuelles Zählen klassifiziert die Spermienzellen in vier Kategorien (nicht-motil, lokal motil, nicht linear und linear motil) unter Verwendung qualitativer, subjektiver Auswahlkriterien. Viele Infertilitätszentren verwenden nun die CASA-Systeme für objektive Messungen der Spermienbewegung, und positive Korrelationen sind zwischen den Bewegungsparametern, wie zum Beispiel der Amplitude der lateralen Kopfverschiebung, der krummlinigen Geschwindigkeit, der Linearität und der Vorwärtsgeschwindigkeit ("straight line velocity") und den Fertilisationsraten in vitro aufgefunden worden, wobei die Grenzwerte für diese Bewegungscharakteristika bisher noch nicht so etabliert worden sind, daß ein allgemeiner Konsens hergestellt wäre.

[0007] Im Falle schwerer männlich bedingter Infertilität, können mikroassistierte Fertilisationstechniken eingesetzt werden. Unter diesen Techniken ist die intrazytoplasmatische Spermien-Injektion (ICSI) die häufigste

und weist den größten prozentualen Erfolgsanteil auf. Gleichwohl ist die Sicherheit des ICSI-Verfahrens für die Gesundheit des resultierenden Conceptus oder Embryos immer noch Gegenstand von Diskussionen (Edwards, 1999, Luetjens et al, 1999). Hinzu kommt, daß ICSI weitaus teurer und zeitaufwendiger ist verglichen mit IVF.

[0008] Daher könnte die Möglichkeit, eine höhere Anzahl von Spermatozoen, die eine höhere Motilität zeigen, zu gewinnen, es erlauben, etliche oligoasthenosperme Männer in IVF- eher als in ICSI-Programme eintreten zu lassen.

[0009] Verschiedene Methoden sind untersucht worden, um die Motilität der Spermatozoen zu vergrößern, wie etwa die Behandlung von Spermatozoen mit Pentoxyphylen, "platelet activating factor" (Thrombozyten-aktivierendem Faktor) oder Progesteron, zum Beispiel. Gleichwohl sind die erhaltenen Resultate unterschiedlich und die Ansprechbarkeit der Spermatozoen ist nicht vorhersagbar.

[0010] Daher ist das Auffinden von neuen Verfahren und Agenzien zur Verbesserung der Spermienmotilität, was zu einer Verbesserung der Fertilisationsaktivität oder der Fertilisationsrate führt, in höchstem Maße wünschenswert und dringend benötigt.

[0011] Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3Ks) gehören zu einer Familie von Enzymen, die an der Signaltransduktion von Tyrosin-Kinase-Rezeptoren beteiligt sind. Phosphatidylinositol-3-Kinasen, auch bezeichnet als Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3Ks), erzeugen Lipide, welche an der Rezeptor-stimulierten Signalweitergabe und an der Regulation des Membrandurchtritts teilnehmen. Mehrere verschiedene Klassen von PI3Ks, die durch die eukaryotische Evolution konserviert worden sind, sind identifiziert worden. Potentielle Signalkaskaden stromabwärts der PI3Ks sind aufgeklärt worden, und die PI3K-Funktion ist in mehreren Modellorganismen charakterisiert worden, zum Beispiel zusammengefaßt bei Vanhaesebroeck et al. (1997). PI3Ks sind heterodimere Enzyme, die in verschiedenen Isoformen vorliegen, und aus einer katalytischen Untereinheit von 110 kDa, welche mit einer regulierenden Untereinheit von 85 kDa assoziiert ist, bestehen.

[0012] In somatischen Zellen werden Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-Kinasen) infolge der Wechselwirkung mit sowohl Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) als auch G-Proteinen aktiviert, was zur Produktion von Verbindungen, die an dem Inositolphospholipid-Signaltransduktionsweg beteiligt sind, führt. Das Enzym ist auch anwesend und aktiv in humanen Spermatozoen.

[0013] Mehrere selektive Inhibitoren von PI3Ks sind beschrieben worden. Wortmannin ist einer der am weitesten bekannten spezifischen Inhibitoren. Wortmannin und Analoge hiervon werden zum Beispiel in EP 0 635 268 A1, EP 0 648 492 A2 oder EP 0 658 343 A1 beschrieben; diese Verbindungen sind bekannt für ihre Rolle bei der Behandlung von Neoplasmen, Atherosklerose und Knochenstörungen. Andere Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitoren sind 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), beschrieben bei Vlahos et al. (1994 und 1995), verwandt mit dem Bioflavonoid Quercetin (Vlahos et al., 1994), zum Beispiel.

[0014] Es ist bisher nicht beschrieben worden, daß LY294002 die Fertilisationsaktivität von Spermatozoen verbesserte oder dafür bekannt wäre, bei der Fertilisation involviert zu sein.

#### Zusammenfassung der Erfindung

[0015] Es ist nun erfindungsgemäß herausgefunden worden, daß ein Inhibitor des Enzyms Phosphatidylinositol-3-Kinase signifikant die Parameter, die die Fertilisationsaktivität von Spermien bestimmen, verbessern kann, insbesondere die Spermienmotilität.

[0016] Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Verstärkung der Fertilisationsaktivität von Spermatozoen, insbesondere zur Vergrößerung der Motilität von Spermatozoen, umfassend das Behandeln von Spermatozoen mit einem Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K-Inhibitor, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogen davon. Die Erfindung betrifft weiterhin Spermatozoen, bei welchen die Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinase inhibiert ist, als auch die Verwendung eines PI3K-Inhibitors, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogen davon, zur Verbesserung der Fertilisationsrate bei assistierten Reproduktionstechniken (ART). Ein dritter Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung eines Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)-Inhibitors, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogen davon, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung der Infertilität, insbesondere der männlichen Infertilität. Ein vierter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Verfahren der ART-Therapie, umfassend das Behandeln von Spermatozoen mit einem Phosphatidyl-3-Kinase-Inhibitor, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogen davon. Ein fünfter Aspekt der Erfindung betrifft ein Medium zur Aufbewahrung und/oder zum Transport von Spermatozoen, umfassend einen Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitor, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogen davon.

## Kurze Beschreibung der Zeichnungen

- [0017] **Fig. 1** zeigt die Wirkung von 10  $\mu\text{M}$  des PI3K-Inhibitors LY294002 auf die Motilität von Spermatozoen. **Fig. 1A**: Schnelle progressive Komponente bei drei individuellen Patienten. Jedes Symbol repräsentiert einen individuellen Patienten. **Fig. 1B**: Schnelle progressive Motilität (a) und schnelle und langsame progressive Motilität (a+b) der Spermatozoen; Mittelwerte  $\pm$  SEM. P indiziert den p-Wert LY zeigt LY294002 an.
- [0018] **Fig. 2** zeigt die Wirkung von 100  $\mu\text{M}$  LY294002 auf die progressive Motilität der Spermatozoen, erhalten durch die "swim-up-Methode".
- [0019] **Fig. 3** zeigt die Wirkung von 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  LY294002 auf die progressive Motilität von Spermatozoen, erhalten durch die "swim-up-Methode"; Mittelwerte  $\pm$  SEM. C indiziert die Kontrolle, LY indiziert LY294002. Die Einfügung ("Insert") zeigt die Wirkungen von 100  $\mu\text{M}$  LY294002 auf die Vitalität von Spermatozoen, erhalten durch die "swim-up-Methode".
- [0020] **Fig. 4** zeigt die Wirkung von 10  $\mu\text{M}$  LY294002 auf die progressive Motilität von Spermatozoen, erhalten durch die "swim-up-Methode". **Fig. 4A** zeigt die Wirkung auf die schnelle progressive Komponente (Motilität a) bei individuellen Patienten. Jedes Symbol steht für einen individuellen Patienten. **Fig. 4B** zeigt ein Histogramm, das die Wirkung auf die schnelle progressive Motilität (a) und die schnelle plus langsame progressive Motilität (a+b) der Spermatozoen (Mittelwerte  $\pm$  SEM) wiedergibt.
- [0021] **Fig. 5** zeigt die Dosis-Reaktions-Kurve bei steigenden Konzentrationen von LY294002 ( $\mu\text{M}$ ) (x-Achse) auf die schnelle Vorwärtsmotilität der Spermatozoen (y-Achse), erhaltend durch die "swim-up-Methode".
- [0022] **Fig. 6** zeigt ein Histogramm, das die Spermienparameter VCL ("percentage curvilinear velocity, prozentuale krummlinige Geschwindigkeit), VAP ("average path velocity, durchschnittliche Weggeschwindigkeit), VSL ("straight-line velocity", Vorwärtsgeschwindigkeit) und HA ("hyperactivated sperm fraction", hyperaktivierte Spermienfraktion) wiedergibt, wie durch Computer-unterstützte Spermienanalyse (CASA) in den Spermienproben aus zwölf verschiedenen oligoasthenospermen Personen bestimmt.
- [0023] **Fig. 7** zeigt ein Histogramm, das die Wirkung von verschiedenen Mengen von Lithiumchlorid (LiCl) mit oder ohne 10  $\mu\text{M}$  LY294002 auf die prozentuale Vorwärtsmotilität von Spermienzellen wiedergibt.

## Beschreibung der Erfindung

- [0024] Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Verbesserung der Fertilisationsaktivität von Spermatozoen zur Verfügung zu stellen, insbesondere zur Steigerung der Motilität von Spermatozoen. Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt das Behandeln von Spermatozoen mit einem Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)-Inhibitor, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogon davon.
- [0025] LY294002 ist die chemische Verbindung 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on, wie beispielsweise bei Vlahos et al. (1994) beschrieben. Derivate und Analoge davon können auch erfindungsgemäß verwendet werden.
- [0026] Ein Verfahren, bei dem der PI3K-Inhibitor LY294002 ist, ist erfindungsgemäß besonders bevorzugt. Dieses Agens hat sich als besonders wirksam zur Erhöhung der Fertilisationsaktivität von Spermien erwiesen.
- [0027] Die Erfindung basiert auf der Erkenntnis, daß dieser Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitor eine ausgeprägte positive Wirkung auf die Parameter hat, die die Fertilisationsaktivität von Samenzellen bestimmen, nämlich die Parameter, die relevant für die Eignung der Samenzellen für die Befruchtung (Fertilisation) einer Oozyte sind. Die bedeutendsten Faktoren, die an der Befähigung zur Fertilisation beteiligt sind, sind die Zahl der aktiven Spermien und die Motilität der Spermatozoen. Nach dem WHO-Handbuch wird eine Motilität von 50% als untere Grenze des Normalbereichs angenommen.
- [0028] In Übereinstimmung mit der Erfindung ist nun herausgefunden worden, daß sowohl die Anzahl der beweglichen (motilen) Spermien, die aus den Samenproben erhältlich sind, wie auch die Motilität der individuellen Spermatozoen durch PI3K-Inhibitoren, welche aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogon davon, ausgewählt sind, signifikant gesteigert werden können, wodurch die Rolle dieser PI3K-Inhibitoren als Fertilitätsverstärker indiziert wird. Diese Wirkung ist bei normospermen Individuen detektierbar. Gleichwohl ist es sogar bei Spermatozoen, die pathogene Merkmale aufweisen, noch stärker ausgeprägt, bspw. bei oligoasthenospermen Patienten, nämlich bei jenen Patienten, die eine reduzierte Gesamtzahl von Spermatozoen und eine reduzierte Motilität der Spermatozoen aufweisen. Die Erfindung macht es möglich, den Prozentsatz der Spermatozoen mit progressiver Motilität zu erhöhen, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Fertilisation signifikant verbessert wird. Daher hilft das erfindungsgemäße Verfahren solchen Patienten, die die Verwendung von ICSI zugunsten einer weniger invasiven ART, wie konventioneller IVF, vermeiden möchten.
- [0029] Die Begriffe "Spermatozoen" oder "Sperma/Spermien/Samenzellen" werden hierin synonym verwendet und beziehen sich auf männliche Gameten. "Samen" oder "Samenflüssigkeit" enthalten sowohl Samenzellen als auch Samenplasma.

[0030] Die Bezeichnung "Steigerung der Fertilisationsaktivität von Spermatozoen" bedeutet irgendeine Erhöhung, Verbesserung oder Veränderung zum Besseren der Parameter, die die Qualität oder Aktivität der Samenzelle bestimmen, wie zum Beispiel die prozentuale krummlinige Geschwindigkeit (VCL, "percentage curvilinear velocity"), die durchschnittliche Weggeschwindigkeit (VAP, "average path velocity"), die Vorwärtsgeschwindigkeit (VSL, "straight-line velocity") und die hyperaktivierte Spermienfraktion (HA, "hyperactivated sperm fraction"). Die Qualität der Spermatozoen bestimmt die Fertilisationsrate bei assistierten Reproduktionstechniken (ART).

[0031] Der Begriff "Steigerung" der Spermatozoenmotilität, wie hierin verwendet, ist so gemeint, daß er jegliche Verstärkung, Erhöhung, Verbesserung oder Veränderung zum Besseren der Qualität oder der Fertilisationsaktivität oder der Motilität oder der Geschwindigkeit der Zellen umfaßt.

[0032] Der Begriff "Phosphatidylinositol-3-Kinase" oder "PI3K", wie hierin verwendet, umfaßt ein beliebiges Mitglied der PI3K-Familie, also jene verwandten Enzyme, die eine Aktivität aufweisen, wie in der Einführung dargestellt.

[0033] Ein "Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase" wird auch als PI3K bezeichnet und inhibiert die Produktion von D-3-Phosphoinositiden in der Zelle. Die Bezeichnung D-3-Phosphoinositide soll Derivate von Phosphatidylinositol umfassen, die in der D-3-Position des Inositolrings phosphoryliert sind, und umfaßt, zum Beispiel, Phosphatidylinositol(3)monophosphat (PI(3)P), Phosphatidylinositol(3,4)bisphosphat (PI(3,4)P<sub>2</sub>) oder Phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphat (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>).

[0034] In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Behandeln der Spermatozoen mit einem Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)-Inhibitor, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogenen davon, auf der Samenflüssigkeit, die die Spermatozoen umfaßt, durchgeführt. Die Durchführung dieser erfindungsgemäßen Methode direkt auf der Samenflüssigkeit ohne jede weitere Behandlung hat den Vorteil, daß sie einfach und schnell ist. Da der PI3K-Inhibitor nach der Erfindung die Motilität der Samenzellen erhöht, ist die Entfernung des Samenplasmas nicht notwendig.

[0035] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Verfahren weiterhin das Abtrennen der Spermatozoen durch Spermatozoen-Abtrennungsmethoden, die in den assistierten Reproduktionstechniken (ART) verwendet werden.

[0036] Da das Samenplasma Faktoren, die die Befähigung und die Fertilisation inhibieren, wie auch eine beträchtliche Menge von nicht-motilen Spermatozoen sogar bei einem fertilen Individuum enthält, ist es vorteilhaft, die motilen Samenzellen von der Flüssigkeit, nicht-motilen und morphologisch defekten Spermatozoen abzutrennen. Dieser Schritt ist wichtig in der traditionellen ART, wie bspw. IVF, GIFT oder IUI. Er führt zu einer Erhöhung der Erfolgsrate der Fertilisation auch bei dem erfindungsgemäßen Verfahren. Es ist aus den Beispielen offensichtlich, daß die Steigerung bei der Spermatozoen-Motilität durch einen Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitor sogar noch ausgeprägter bei den Spermatozoen ist, welche vom Samenplasma abgetrennt worden sind.

[0037] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das Abtrennen (Separieren) der Spermatozoen durch eine Methode, ausgewählt aus der "Wash-und-Spin-Methode", der Sedimentationsmethode, der direkten "swim-up-Methode" der "Pellet-und-swim-up-Methode" und der Auftriebsdichtegradienten-Methode ("buoyant density gradient method"), durchgeführt.

[0038] Diese Methoden sind im Stand der Technik gut bekannt. Sie werden traditionell bei den assistierten Reproduktionstechniken eingesetzt und sind im Detail im "A textbook of In vitro Fertilization and Assisted Reproduction, The Bourn Hall guide to clinical and laboratory practice", editor: Peter R. Brinsden, The Parthenon Publishing Group" (1999) auf den Seiten 204 bis 208 beschrieben. Dieses Lehrbuch wird im folgenden als "Bourn Hall Guide" bezeichnet.

[0039] Vorzugsweise wird das Abtrennen der Spermatozoen mit der direkten "swim-up-Methode" durchgeführt.

[0040] Diese Methode beinhaltet die Selbstselektion der motilen Spermien, im wesentlichen umfassend das Aufsichten eines Aliquots des Mediums auf die Oberfläche einer Samenprobe und es zu erlauben, diese bei Raumtemperatur für eine gewisse Zeitdauer stehen zu lassen. Die beweglichen (motilen) Samenzellen werden in die Oberschicht (Medium) wandern, aus welcher sie gewonnen werden können. Die Methode kann auch Zentrifugationsschritt(e) einschließen.

[0041] Der Vorteil der "swim-up-selektierten" Spermatozoen ist, daß die motilen Zellen, die in der Probe vorliegen, isoliert und konzentriert werden und daß der Anteil der morphologisch normalen Spermien vergrößert wird. Es wird in den Beispielen gezeigt, daß das erfindungsgemäße Verfahren zu einer Steigerung der Menge der Spermatozoen, gewonnen aus der Samenflüssigkeit durch die "swim-up-Methode" führt. Dies ist auf die gesteigerte Motilität der Spermien zurückzuführen, welche daher schneller und in größeren Mengen in die obere Phase der Probe wandern.

[0042] Die Methode kann variiert und mit weiteren Isolierungs-/Abtrennungstechniken kombiniert werden, abhängig von der Menge der motilen Zellen in der Probe. Zum Beispiel kann die "swim-up"-Vorgehensweise

durch das Beschichten von einem 1 ml Medium, enthaltend Albumin, auf einem 1 ml darunter liegender Samenflüssigkeit in einem Teströhrchen durchgeführt werden. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C an der Luft oder in 5% CO<sub>2</sub> wird die obere Phase des Mediums, zu welcher die Spermatozoen mit besseren Motilitätscharakteristika gewandert sind, gesammelt. Diese Technik kann auch einen Zentrifugationsschritt umfassen oder kann mit einem solchen kombiniert werden, zum Beispiel Zentrifugation auf Percoll-Gradienten. Die abgetrennten, isolierten und angereicherten Spermatozoen werden dann in assistierten Reproduktionstechniken eingesetzt oder können zum Beispiel, bevor sie weiterbehandelt werden, tiefgefroren werden.

[0043] Vorteilhafterweise wird die Inkubation der Spermatozoen mit dem PI3K-Inhibitor auf der Samenflüssigkeit ausgeführt, und dann die "swim-up"-Selektion durchgeführt. Danach können die Spermatozoen einmal oder mehrere Male gewaschen werden, um den PI3K-Inhibitor zu eliminieren, bevor sie für die Fertilisation weiterbehandelt werden.

[0044] Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Verfahren auf Säugetier-Spermatozoen durchgeführt, insbesondere auf humanen Spermatozoen.

[0045] Vorzugsweise werden die Spermatozoen mit einer Menge des PI3K-Inhibitors im Bereich von ungefähr 0,01 bis 1000 µM, stärker bevorzugt von ungefähr 5 bis 500 µM und am stärksten bevorzugt von ungefähr 10 bis 100 µM behandelt. Das Behandeln der Spermatozoen mit dem PI3K-Inhibitor umfaßt vorzugsweise das Inkubieren der Spermatozoen für einen Zeitraum im Bereich von ungefähr 30 Minuten bis 10 Stunden, vorzugsweise von ungefähr 1 bis 8 Stunden, am stärksten bevorzugt von ungefähr 2 bis 6 Stunden bei einer Temperatur von ungefähr 37°C.

[0046] Es ist ein weiteres Ziel der Erfindung, Spermatozoen, die eine verbesserte Fähigkeit der Fertilisationseignung aufweisen, zur Verfügung zu stellen. Daher betrifft die Erfindung weiterhin Spermatozoen, bei welchen die Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinase inhibiert ist. Die Erfindung betrifft auch Spermatozoen, die aus dem oben beschriebenen Verfahren erhältlich sind. Die Spermatozoen, bei welchen die Phosphatidylinositol-3-Kinase inhibiert ist oder welche in einem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten wurden, zeigen eine verbesserte Fertilisationsaktivität, eine, verglichen mit unbehandelten Samenzellen, höhere Motilität und daher eine bessere Leistung in Hinblick auf die Fertilisation.

[0047] Wie oben erwähnt, bestimmt die Fertilisationsaktivität der Samenzellen die Fertilisationsrate bei ART. Die Erfindung betrifft daher weiterhin die Verwendung von einem PI3K-Inhibitor, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogenen davon, zur Verbesserung der Fertilisationsrate bei assistierten Reproduktionstechniken (ART).

[0048] Jede aus dem Stand der Technik bekannte assistierte Reproduktionsmethode kann erfindungsgemäß eingesetzt werden. In bevorzugten Ausführungsformen werden die assistierten Reproduktionstechniken ausgewählt aus In-Vitro-Fertilisation (IVF), Intra-Eileiter-Transfer von Gameten (GIFT) und Intrauteriner Insemination (IUI).

[0049] Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von einem Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K-Inhibitor), ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogenen davon, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung der Infertilität, insbesondere der männlichen Infertilität. Während die Erfindung in weiteren Details für In-Vitro-Fertilisationstechniken beschrieben ist, wird durch den Fachmann erkannt, daß die Verbindung in Hinblick auf die Aktivität genauso wirksam sein kann, wenn das Medikament in vivo verabreicht wird.

[0050] In diesem Fall wird das Medikament vorzugsweise in Form einer pharmazeutischen Zusammensetzung, umfassend den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitor zusammen mit einem oder mehreren pharmazeutisch akzeptablen Trägern und/oder Exzipienten, dargeboten. Eine "wirksame Menge" bezieht sich auf eine Menge der aktiven Bestandteile, die ausreichend ist, die Fertilisationsaktivität zu beeinflussen, insbesondere die Mobilität der Spermatozoen. Die wirksame Menge wird vom Verabreichungsweg und vom Zustand des Patienten abhängen.

[0051] "Pharmazeutisch akzeptabel" soll jeden Träger umfassen, der nicht mit der Wirksamkeit der biologischen Aktivität des aktiven Bestandteils interferiert und der nicht toxisch gegenüber dem Wirt ist, dem er verabreicht wird. Zum Beispiel können – für die parenterale Verabreichung – die obigen aktiven Bestandteile in Form einer Einheitsdosierung für Injektion in Vehikula, wie zum Beispiel Kochsalzlösung, Dextroselösung, Serumalbumin und Ringer's Lösung, formuliert werden. Neben dem pharmazeutisch akzeptablen Träger, können die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen auch geringe Mengen herkömmlicher Additive, wie zum Beispiel Stabilisatoren, Exzipienten, Puffer und Konservierungsmittel, umfassen.

[0052] Die Verabreichung eines solchen aktiven Bestandteils kann auf intravenösem, intramuskulärem oder subkutanem Weg erfolgen. Andere Verabreichungswege, die die gewünschten Blutwerte der jeweiligen Bestandteile sicherstellen können, sind durch die vorliegende Erfindung mitumfaßt.

[0053] Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von einem Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Inhibitor, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogenen davon, zur Herstellung eines Medikaments zur Verbesserung der Fertilisationsaktivität von Spermatozoen, insbesondere zur Steigerung der Motilität von Spermatozoen.

[0054] Die Verwendung von LY294002 als Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitor ist hoch bevorzugt.

[0055] Es ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, eine Verbesserung der ART-Therapie bereitzustellen. Die Verbesserung besteht darin, daß bei bekannten Techniken zur assistierten Fertilisation ein Schritt aufgenommen wird, der das Behandeln von Spermatozoen mit einem Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)-Inhibitor umfaßt, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogenen davon. Die weiteren Schritte, die bei assistierten Reproduktionstechniken eingesetzt werden, sind dem Fachmann wohl bekannt und können aus dem WHO-Handbuch (s. oben) oder dem "Bourn Hall Guide" (siehe oben) entnommen werden.

[0056] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die ART aus In-Vitro-Fertilisation (IVF), Intra-Eileiter-Transfer von Gameten (GIFT) oder Intrauteriner Insemination (IUI) ausgewählt.

[0057] Es ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Medium zur Aufbewahrung und/oder zum Transport von Spermatozoen, die verbesserte Eigenschaften aufweisen, zur Verfügung zu stellen. Die Erfindung betrifft daher auch ein Medium, das einen Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)-Inhibitor umfaßt, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogenen davon, umfaßt. Abgesehen vom PI3K-Inhibitor kann das Medium jede beliebige weitere Komponente enthalten, die für die Aufbewahrung und/oder den Transport, abhängig von der Art der erforderlichen Aufbewahrung und/oder des erforderlichen Transports, brauchbar ist. Zum Beispiel können die Spermatozoen bei Raumtemperatur oder durch Kryokonservierung aufbewahrt werden. Das letztere ist üblich für die Aufbewahrung von Zellen für einen längeren Zeitraum. Spezifische Beispiele der weiteren Komponenten des Mediums können zum Beispiel aus der WO 97/16965 entnommen werden. Weitere spezifische Medien, die für die Kryokonservierung von Samen geeignet sind, sind im Appendix II, Seite 541 und 542 des "Bourn Hall Guide" (siehe oben) zum Beispiel aufgenommen. Sie könnten um einen erfindungsgemäßen PI3K-Inhibitor ergänzt werden, um die Fertilisationsaktivität zu verbessern, insbesondere die Motilität der Spermien, bevor die Fertilisation stattfindet.

[0058] In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Medium Säugetier-Spermatozoen, insbesondere humane Spermatozoen. In einer hoch bevorzugten Ausführungsform ist der PI3K-Inhibitor LY294002.

[0059] In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Medium Mengen vom PI3K-Inhibitor im Bereich von ungefähr 0,01 bis 1000 µM, vorzugsweise von ungefähr 5 bis 500 µM und am stärksten bevorzugt von ungefähr 10 bis 100 µM.

[0060] Nachdem nun die Erfindung beschrieben worden ist, wird sie durch Bezug auf die nachfolgenden Ausführungsbeispiele, die zum Zwecke der Illustration bereitgestellt werden, noch einfacher verständlich. Die Beispiele sollen die vorliegende Erfindung nicht begrenzen.

#### Ausführungsbeispiele

[0061] In den Experimenten, auf denen die folgenden Ausführungsbeispiele beruhen, sind Standardmethoden der In-Vitro-Fertilisation eingesetzt worden. Bezüglich der Details dieser Methoden wird auf das "WHO-Handbuch" (WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions, 4. Auflage, Cambridge University Press (1999)) Bezug genommen. Im besonderen kann die direkte "swim-up-Methode" den Seiten 104 bis 106 dieses Handbuchs entnommen werden.

#### Ausführungsbeispiel 1

##### Wirkung von LY294002 auf die schnelle Motilität der Spermatozoen

[0062] Spermatozoen wurden nach den Standardvorgehensweisen der IVF aufbereitet. Kurz gefaßt, wurden die Spermatozoen aus 3 oligoasthenospermen Personen, die sich einer Samenanalyse wegen Infertilität des Paares nach "informed consent" unterzogen haben, aufbereitet. 10 µM des PI3K-Inhibitors LY294002 wurden direkt zur Samenflüssigkeit hinzugegeben und 2 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Motilität der Spermatozoen wurde dann unter dem Mikroskop entsprechend den Vorgehensweisen des WHO-Handbuchs blind evaluiert. Die Ergebnisse dieser Evaluierung sind in **Fig. 1** dargestellt. Die Inkubation mit der Verbindung verursacht eine Steigerung der schnellen Motilität der Spermatozoen in der Samenflüssigkeit (**Fig. 1A**). **Fig. 1B** zeigt, daß die Steigerung nicht nur für die schnelle Mobilität beobachtet wurde (a), sondern auch beim Prozentsatz der Vorwärtsmotilität (schnelle und langsame Komponente a+b).

[0063] In einer Gruppe von 7 Proben, die 7 Individuen entnommen wurden, wurde der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitor LY294002 in einer höheren Konzentration (100 µM) hinzugegeben. Nach der Inkubation mit der Verbindung für 2 Stunden wurde die "swim-up-Selektion" der Spermatozoen entsprechend den Vorgehensweisen, die im WHO-Handbuch beschrieben sind, durchgeführt. Die Inkubation der Samenzellen mit einer 10-fach höheren Konzentration des Inhibitors (100 µM) in Kombination mit der "swim-up-Selektion" führte zu einer signifikanten Steigerung der progressiven Motilität in allen 7 Proben (wie in **Fig. 2** gezeigt).

[0064] Tabelle I faßt die Ergebnisse, die in einem ähnlichen Experiment mit 20 oligoasthenospermen Patienten erhalten wurden, zusammen. Die Verbindung wurde in einer Konzentration von 10 µM hinzugegeben. Die Wirkungen der Zugabe von LY294002 zum Samenplasma auf den Prozentsatz der Vorwärtsmotilität der Spermien sowohl im Samenplasma als auch in der wiedergewonnenen "swim-up-Fraktion", gemessen nach Inkubation mit der Verbindung, führte zu einer Steigerung von 39% der Vorwärtsmotilität der Spermien im Samenplasma und von 26% bei den "swim-up-selektierten" Samenzellen.

[0065] Tabelle II faßt die Wiedergewinnung der Samenzellen beim "swim-up", welche um 43%, verglichen mit der Kontrolle, gesteigert wurde, zusammen. Derart führt die Inkubation von Samen mit dem Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitor zu einer signifikanten Steigerung bei der Gewinnung von Spermatozoen während der "swim-up-Selektion".

Tabelle I

% Spermien-Vorwärtsmotilität (n=20)			
Spermien im Samenplasma		"swim-up-selektierte" Spermien	
C	LY 10µM	C	LY 10µM
35,7±5,1	49,8±4,7 *	54,2±4,5	68,6±3,9 *
	p<0,001		p<0,001
	↑ 39%		↑ 26%

Tabelle II

Wiedergewinnung von Spermien beim "swim-up" (10 <sup>6</sup> )		
C	LY 10	µ M
13,3 ± 3,9	19,0 ± 4,8	* p<0,005
(n=20)		(n=20)
		↑ 43%

[0066] **Fig. 3** faßt die Ergebnisse, die in einem ähnlichen Experiment auf Proben von einer größeren Anzahl von Patienten erhalten wurden, zusammen. Die Samenzellen wurden der "swim-up-Selektionsmethode" unterzogen. Die Behandlung mit 10 µM des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitors LY294002 führte zu einer Steigerung von 58% bei der progressiven Motilität (21 Patienten), verglichen mit der Kontrolle (40 Patienten, ohne LY294002). Die Behandlung der Proben von 29 Patienten mit 100 µM des Inhibitors führte zu einer Steigerung der Motilität von 67%, verglichen mit der Kontrolle, also zu einer zusätzlichen Erhöhung der Motilität der Spermatozoen von ungefähr 10%.

[0067] Die Wirkung von 100 µM LY 294002 auf die Lebensfähigkeit der Spermatozoen wurde auch untersucht (siehe Einfügung von **Fig. 3**). Die Inkubation für 2 Stunden mit LY294002 veränderte die Vitalität der Zellen nicht, wie unter Verwendung des Eosintests und hypoosmotischer Aufquellung bewertet wurde. Sogar nach 48 Stunden Inkubation wurde keine Wirkung auf die Lebensfähigkeit der Spermien in einer beliebigen der getesteten Proben (nicht dargestellt) beobachtet.

[0068] **Fig. 4** zeigt die Ergebnisse eines weiteren Experiments, das in der gleichen Weise, wie oben für die Proben von 12 individuellen Patienten dargestellt, durchgeführt wurde. Eine Verbesserung der prozentualen progressiven Motilität nach 2 Stunden Inkubation der Samenzellen mit LY294002 war eindeutig detektierbar, sowohl für die schnelle Komponente (a) als auch für die schnelle und langsame Komponente (a+b).

[0069] Die Experimente, die oben beschrieben wurden, wurden auf Proben von oligoasthenospermen Individuen durchgeführt. Die Wirkungen auf die Stimulation der progressiven Motilität durch LY294002 sind stärker ausgeprägt, je ernsthafter die Spermienpathologie der Patienten ist (Oligospermie, Asthenospermie, Teratospermie). Gleichwohl konnte die Wirkung dieser Verbindung auch bei normospermen Personen beobachtet werden. Die Wirkung der Inkubation mit 10 µM LY294002 für 2 Stunden, gefolgt von einer "swim-up-Selektion",

fürte zu einer Steigerung von  $53,5 \pm 2,0\%$  bis  $76,3 \pm 1,5\%$  bei der Vorwärtsmotilität der Spermatozoen von 88 zufällig ausgewählten Personen (nicht gezeigt).

[0070] Dieser Effekt von LY294002 auf Proben von normospermen Individuen war dosisabhängig, wie in **Fig. 5** gezeigt. Die Werte für die schnelle Vorwärtsmotilität steigerten sich mit erhöhten Dosen des aufgetragenen Inhibitors (von 0 bis  $1000 \mu\text{M}$ ). Die Werte wurden in Hinblick auf den Kontrollwert (Null) berechnet. Die erwartete sigmoidale Kurve zeigt die dosisabhängige Wirkung des Inhibitors auf die schnelle Vorwärtsmotilität der behandelten gegenüber den unbehandelten Spermatozoen, was einen EC50-Wert (Wirkungsdosis von 50%) von ungefähr  $1 \mu\text{M}$  ergibt.

[0071] Ähnliche Wirkungen auf Spermatozoen sind bei Verwendung eines nicht-verwandten Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitors, Wortmannin, beobachtet worden.

[0072] Der experimentelle Nachweis, wie oben beschrieben, zeigt, daß zwei verschiedene Inhibitoren des Enzyms Phosphatidylinositol-3-Kinase bei der Verbesserung der Spermatozoenmotilität hochwirksam sind. Diese Wirkung ist besonders ausgeprägt bei pathogenen Spermatozoen, allerdings auch detektierbar bei normospermen Individuen. Die Ergebnisse, die oben dargestellt sind, zeigen, daß die Inkubation von Spermatozoen mit einem Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitor, wenn aufgenommen bei traditionellen assistierten Reproduktionstechniken, zu einer Steigerung der Samenzellmotilität führt, was die Wahrscheinlichkeit der Fertilisation bei ART vergrößert.

### Ausführungsbeispiel 2

#### Wirkung von LY294002 auf weitere Samenzellparameter

[0073] Die Steigerung bei der Vorwärtsmotilität, gezeigt in Beispiel 1, war mit einer Steigerung bei den Spermienparametern, die die Fertilisationsaktivität von Spermatozoen in vitro betreffen, verbunden, wie zum Beispiel der prozentualen krummlinigen Geschwindigkeit (VCL, "percentage curvilinear velocity"), der durchschnittlichen Weggeschwindigkeit (VAP, "average path velocity"), der Vorwärtsgeschwindigkeit (VSL, "straight-line velocity") und der hyperaktivierten Spermienfraktion (HA, "hyperactivated sperm fraction"). Diese Parameter wurden durch Computer-unterstützte Spermienanalyse (CASA) in Spermeproben von 12 verschiedenen oligoasthenospermen Personen bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Fig. 6** gezeigt. Alle diese Parameter wurden in statistisch signifikanter Weise durch die Inkubation mit  $10 \mu\text{M}$  LY294002, verglichen mit der Kontrollprobe, gesteigert, was eine signifikante Gesamtverbesserung der Fertilisationsaktivität von Samenzellen anzeigt.

[0074] Ähnliche Wirkungen auf Spermatozoen sind bei Verwendung eines nicht-verwandten Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitors, Wortmannin, beobachtet worden.

[0075] Diese Resultate zeigen die Gesamtverbesserung der relevanten Parameter, die die Fertilisationsaktivität von Samenzellen betreffen, durch Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitoren. Da alle der oben genannten Parameter für die Fertilisationsrate, die bei assistierten Fertilisationstechniken erhalten wird, wesentlich sind, stellt die Erfindung ein Agens bereit, das für die Behandlung von schwerer, männlich bedingter Infertilität einsetzbar ist.

### Ausführungsbeispiel 3

#### Wirkung von LY294002 auf die Vorwärtsmotilität von $\text{H}_2\text{O}_2$ - oder LiCl-behandelten Spermatozoen.

[0076] Es ist bekannt, daß reaktive Sauerstoffspezies (ROS), welche während der Spermavorbereitung für IVF erzeugt werden, ungünstige Wirkungen auf das Spermafertilisationspotenzial ausüben können. Insbesondere reduziert  $\text{H}_2\text{O}_2$  unter den ROS die Motilität stark, wenn es zu Spermienproben mit mikromolaren Konzentrationen hinzugegeben wird. Daher wurde die Wirkung von LY294002 auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelte Samenzellen untersucht. Die Verbindung wurde auf die "swim-up-selektierten" Spermatozoenproben von oligoasthenospermen Patienten in Mengen von  $10 \mu\text{M}$  entweder allein oder in Kombination mit  $200 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  hinzugegeben. Es wurde beobachtet, daß die ungünstigen Wirkungen, die durch  $200 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die Spermienmotilität ausgeübt wurden, vollständig durch Zugabe von LY294002 zum Inkubationsmedium (Tabelle III) aufgehoben wurden, was eine protektive Aktivität der Verbindung in Hinblick auf die ROS-Wirkungen zeigt.

Tabelle III

Kontrolle (%)	LY294002 (%)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	LY294002+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)
45,4±5,0 (n=12)	71,7±3,2** (n=12)	26,5±4,9** (n=12)	52,6±5,5* (n=12)

\*P<0,002 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; \*\*P<0,0001 vs Kontrolle

[0077] LiCl ist auch als Inhibitor der Samenzellmotilität bekannt. Eine Inkubation der "swim-up-selektierten" Spermatozoen mit 10 µM LY294002 für 2 Stunden entweder mit oder ohne unterschiedliche Konzentration von LiCl führte zu einer Aufhebung der Wirkung von LiCl-induzierter Inhibition der Spermienmotilität (**Fig. 7**). Ähnliche Wirkungen auf Spermatozoen sind unter Verwendung eines nicht-verwandten Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitors, Wortmannin, beobachtet worden.

[0078] In diesem Beispiel ist die Aktivität von Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitoren zur Rettung von Spermatozoen gegenüber schädlichen Agenzien, welche bei assistierten Fertilisationstechniken erzeugt werden, gezeigt worden. Daher stellt die Erfindung eine entscheidende Verbesserung der ART dar, was zu einer höheren Fertilisationsrate und zu einer Eliminierung einiger der schwerwiegendsten Nachteile dieser Techniken führt.

#### Literaturreferenzen

Edwards RG "Widening perspectives of intracytoplasmic sperm injection" (1999). *Nature Medicine* 5, 377–378.  
 Luetjens CM, Payne C, Schatten G "Non-random chromosome positioning in human sperm and sex chromosome anomalies intracytoplasmic sperm injection (1999). *The Lancet* 353, 1240.  
 Vanhaesebroeck b, Leever S, Panayotou G, Waterfield MD "Phosphatidylinositol-3-kinases: a conserved family of signal transducers" (1997). *Trends. Biochem. Sci.* 22, 267–72.  
 Vlahos CJ, Matter WF, Brown RF, Traynor Kaplan AE, Heyworth PG, Prossnitz ER "Investigation of neutrophil signal transduction using a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase" (1995). *J. Immunol.* 154, 2413–22.  
 Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF "A specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)" (1994). *J. Biol. Chem.* 269, 5241–48.

#### Patentansprüche

1. In-Vitro-Verfahren zur Verbesserung der Fertilisationsaktivität von Spermatozoen, insbesondere zur Steigerung der Spermatozoen-Motilität, umfassend das Behandeln der Spermatozoen in vitro mit einem Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)-Inhibitor, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogen davon.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Behandeln der Spermatozoen mit dem Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)-Inhibitor auf Samenflüssigkeit, umfassend die Spermatozoen, durchgeführt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, weiter umfassend das Abtrennen der Spermatozoen durch Spermatozoen-Abtrennungsmethoden, verwendet bei assistierten Reproduktionstechniken (ART).

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das Abtrennen der Spermatozoen durch eine Methode, ausgewählt aus der "wash und spin-Methode", der Sedimentationsmethode, der direkten "swim-up-Methode", der "Pellet-und-swim-up-Methode" und der Auftriebsdichtegradientenmethode, durchgeführt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das Abtrennen der Spermatozoen durch die direkte "swim-up-Methode" durchgeführt wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Verfahren an Säugetier-Spermatozoen, insbesondere an humanen Spermatozoen, durchgeführt wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Spermatozoen mit einer Menge des PI3K-Inhibitors im Bereich von ungefähr 0,01 bis 1000 µM, ungefähr 5 bis 500 µM oder ungefähr 10 bis 100 µM behandelt werden.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Behandeln der Spermatozoen mit dem PI3K-Inhibitor das Inkubieren der Spermatozoen für einen Zeitraum im Bereich von ungefähr 30 Minuten bis 10 Stunden oder ungefähr 1 bis 8 Stunden oder ungefähr 2 bis 6 Stunden bei einer Temperatur von ungefähr 37°C umfaßt.

9. Spermatozoen, erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8.

10. Verwendung eines PI3K-Inhibitors, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogen davon, zur Verbesserung in vitro der Fertilisationsrate bei assistierten Reproduktionstechniken (ART).

11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei die assistierten Reproduktionstechniken ausgewählt sind aus der In-Vitro-Fertilisation (IVF), des Intra-Eileiter-Transfers von Gameten (GIFT) oder der Intrauterinen Insemination (IUI).

12. Verwendung eines Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)-Inhibitors, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogen davon, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung der Infertilität, insbesondere der männlichen Infertilität.

13. Verwendung eines Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)-Inhibitors, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogen davon, zur Herstellung eines Medikaments zur Verbesserung der Fertilisationsaktivität von Spermatozoen, insbesondere zur Steigerung der Spermatozoenmotilität.

14. Verfahren zum Behandeln von Spermatozoen in vitro zur ART-Therapie mit einem Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)-Inhibitor, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogen davon.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die ART aus der In-Vitro-Fertilisation (IVF), dem Intra-Eileiter-Transfer von Gameten (GIFT) oder der Intrauterinen Insemination (IUI) ausgewählt sind.

16. Medium zur Aufbewahrung und/oder zum Transport von Spermatozoen, umfassend einen Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)-Inhibitor, wobei der PI3K-Inhibitor ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002), und Derivaten und Analogen davon.

17. Medium nach Anspruch 17 zur Aufbewahrung und/oder zum Transport von Säugetier-Spermatozoen, insbesondere humanen Spermatozoen.

18. Medium nach einem der Ansprüche 17 oder 18, umfassend eine Menge von PI3K-Inhibitor im Bereich von ungefähr 0,01 bis 1000 µM, ungefähr 5 bis 500 µM oder ungefähr 10 bis 100 µM.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

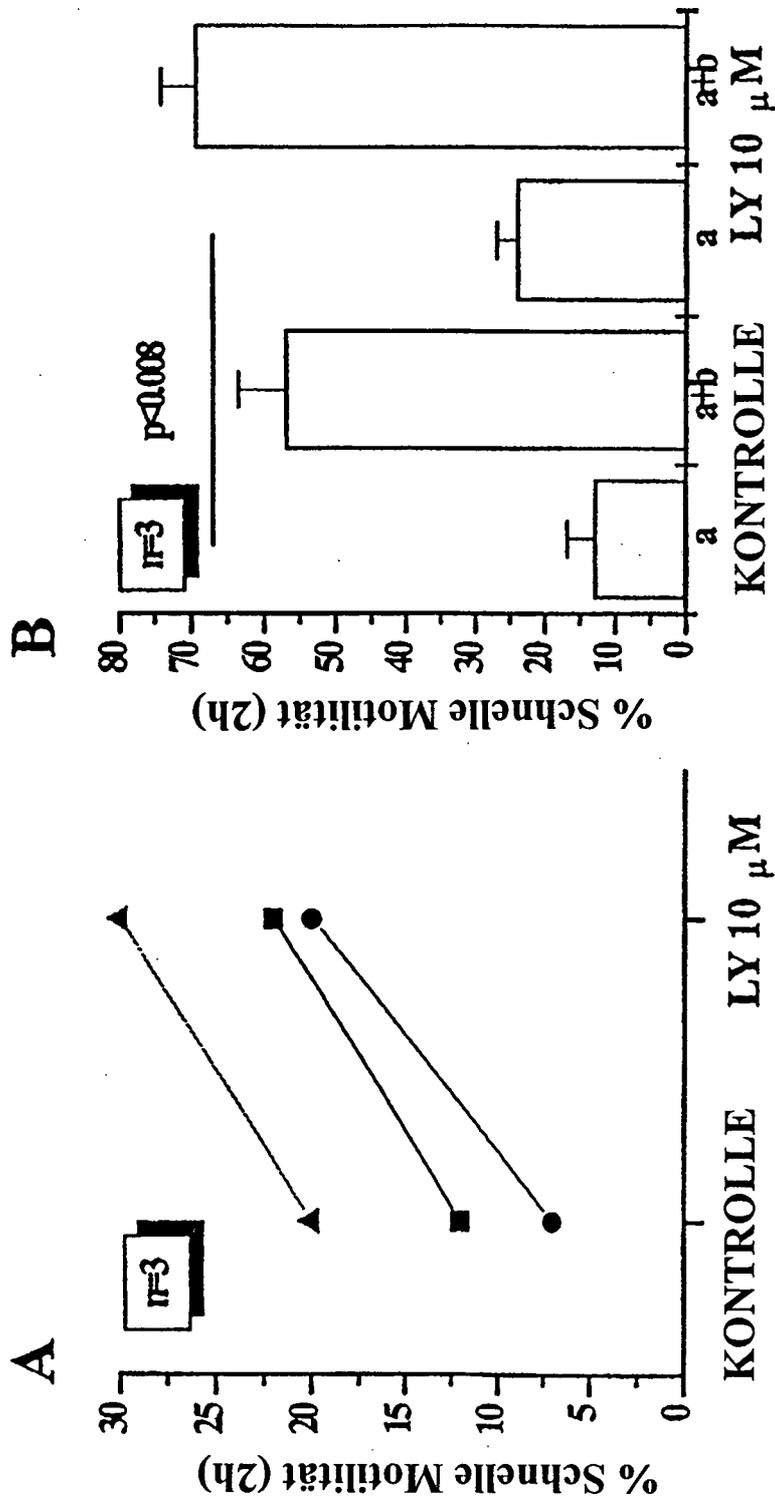


Fig. 1

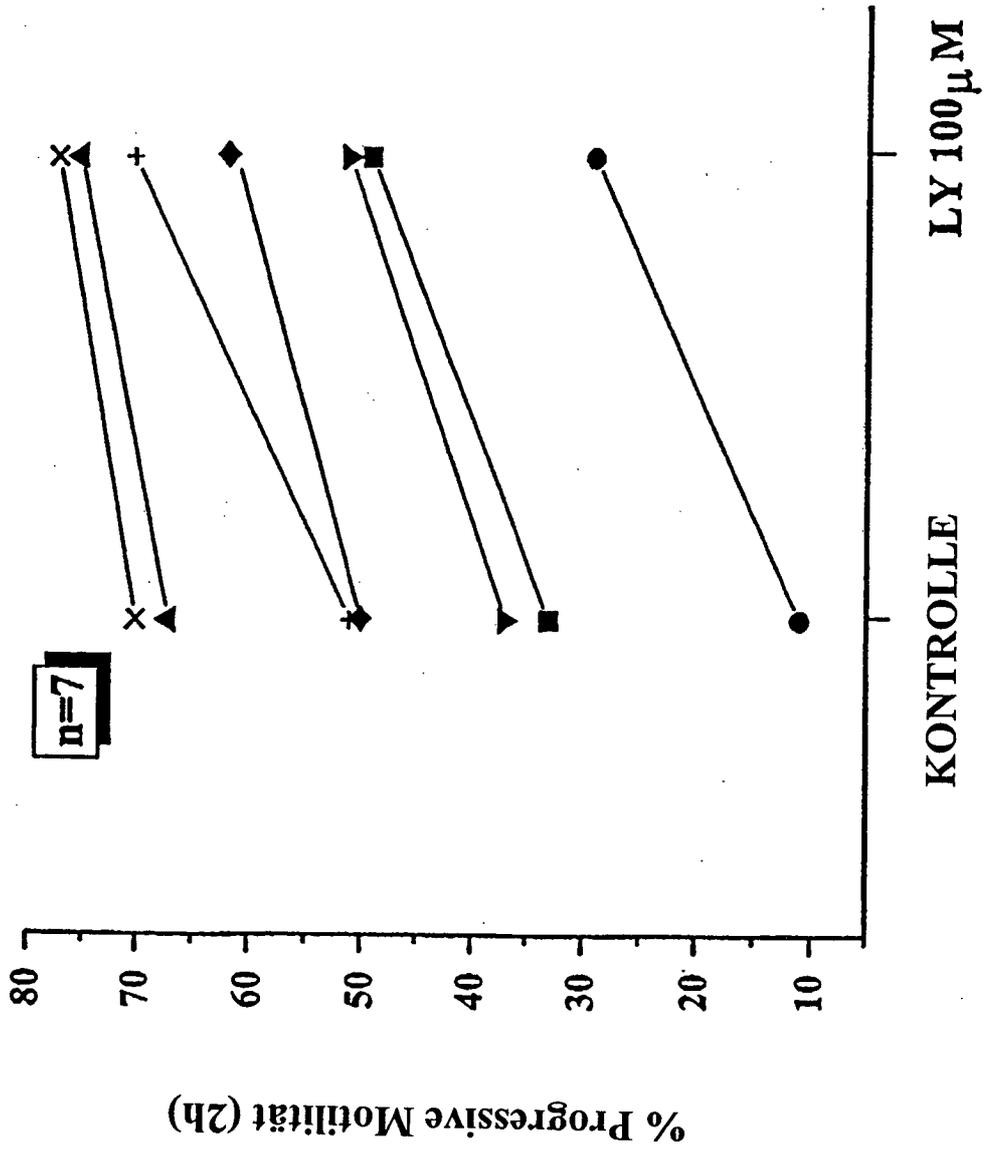


Fig. 2

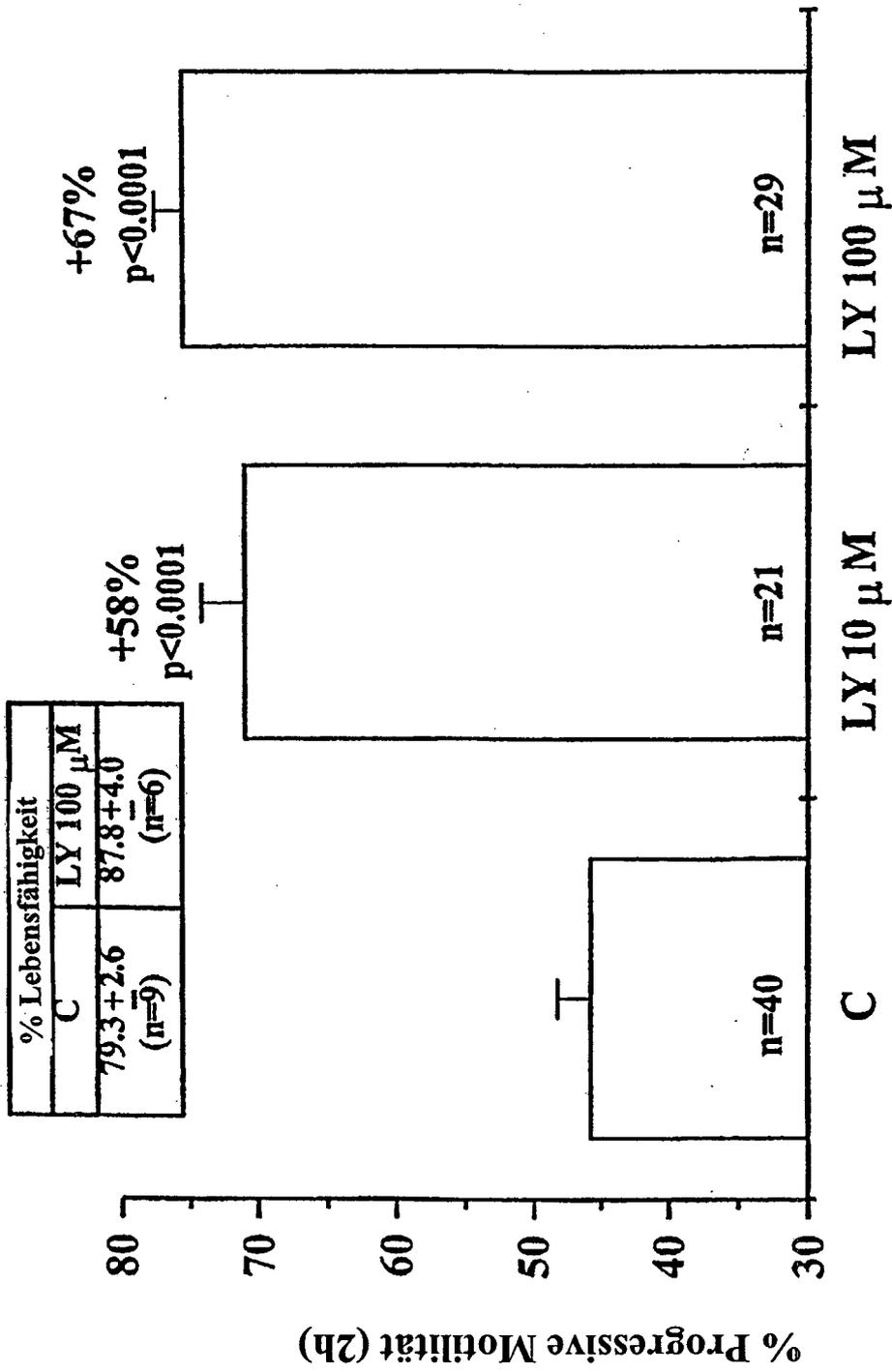


Fig. 3

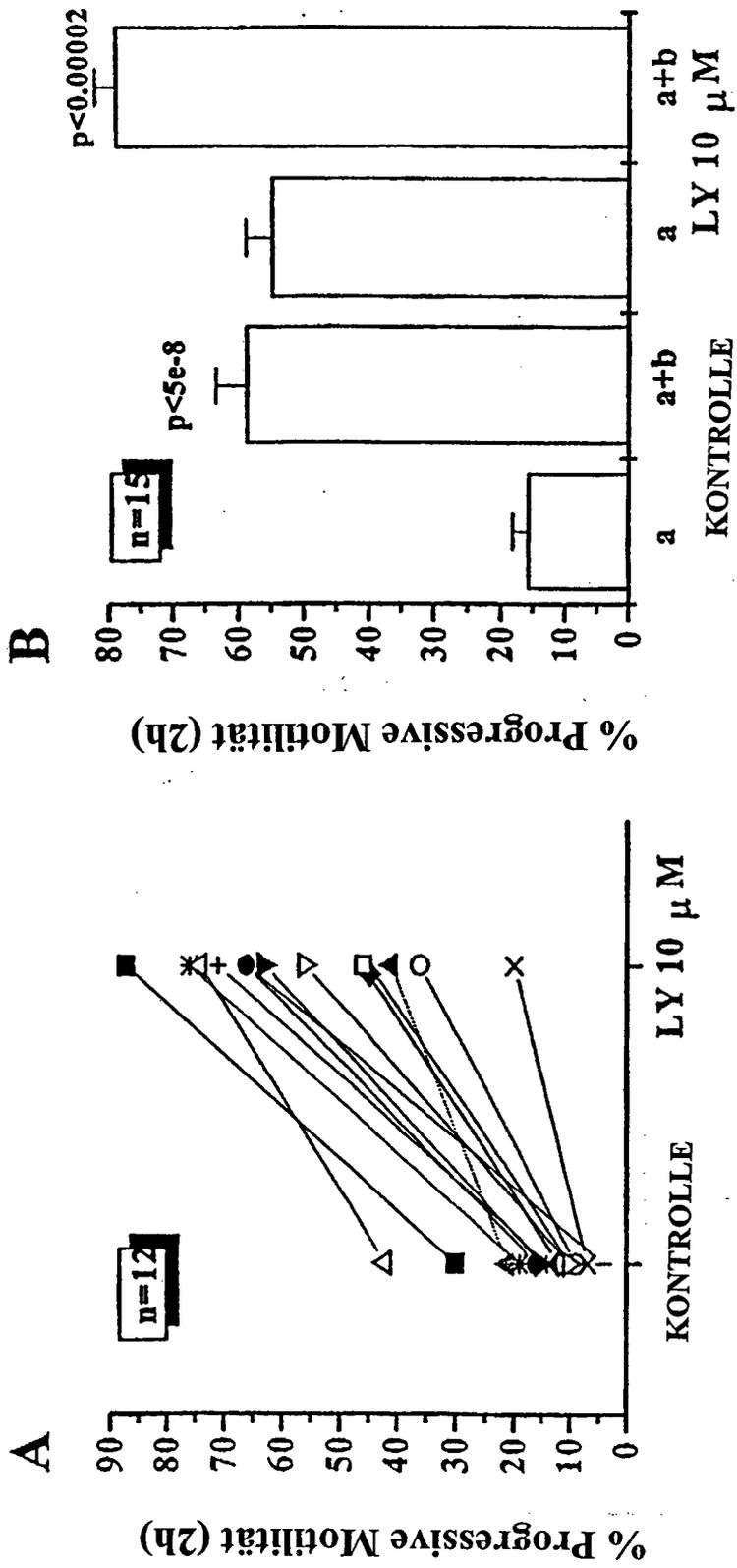


Fig. 4

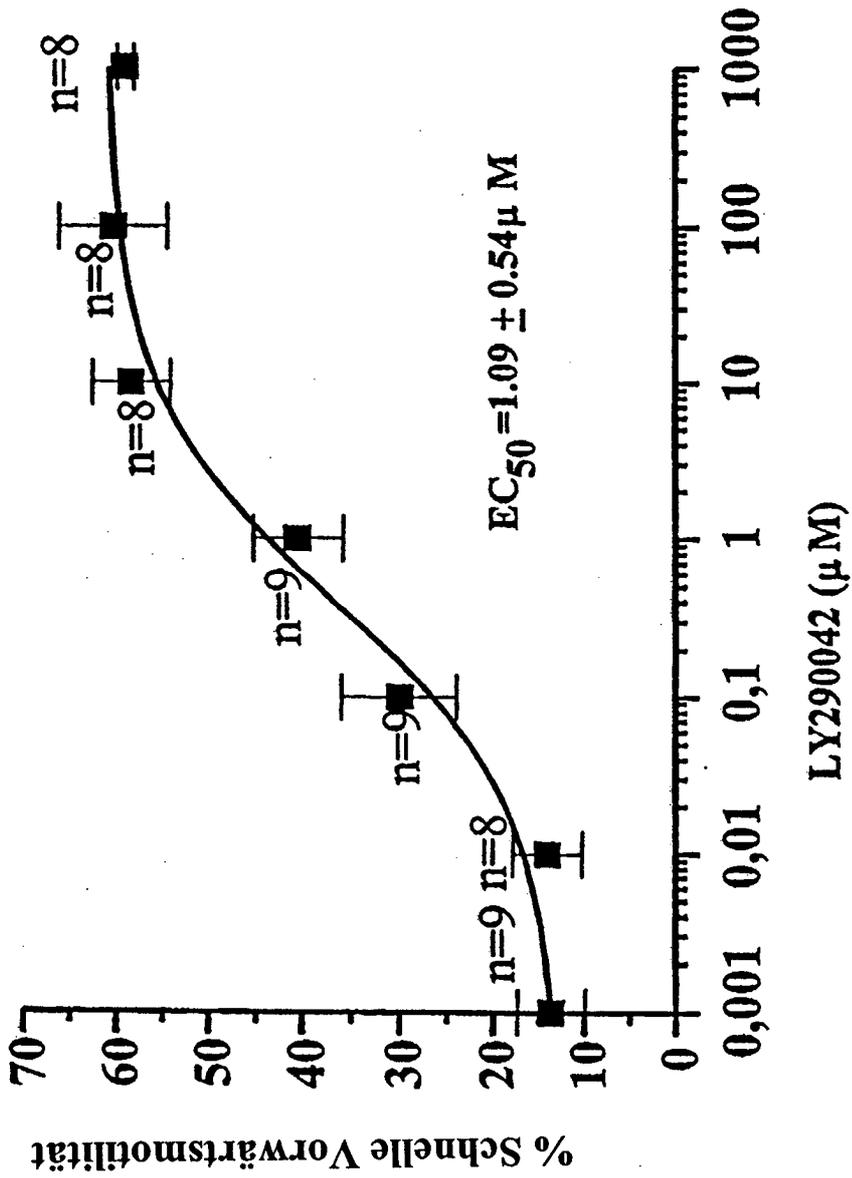


Fig. 5

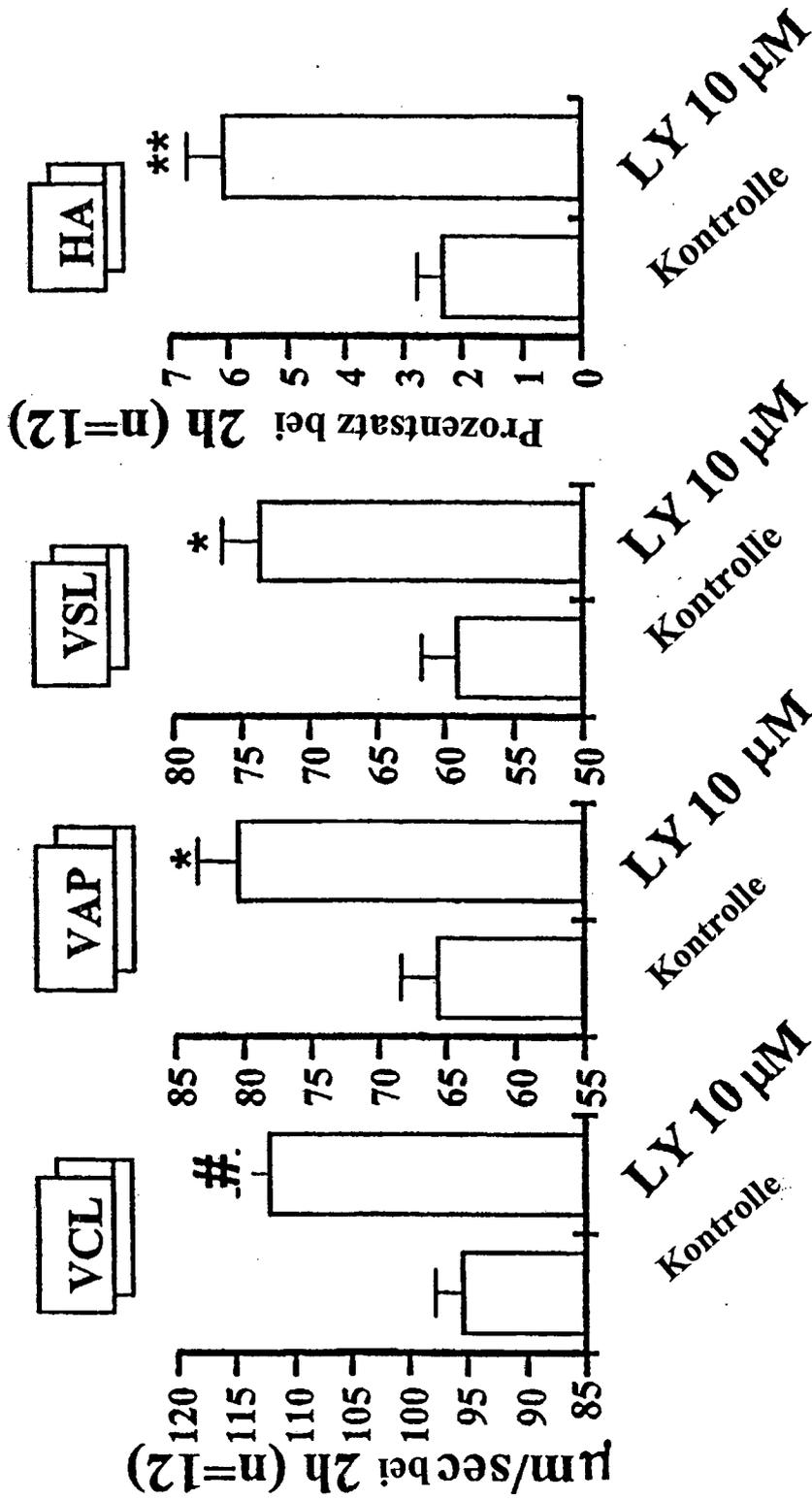


Fig. 6

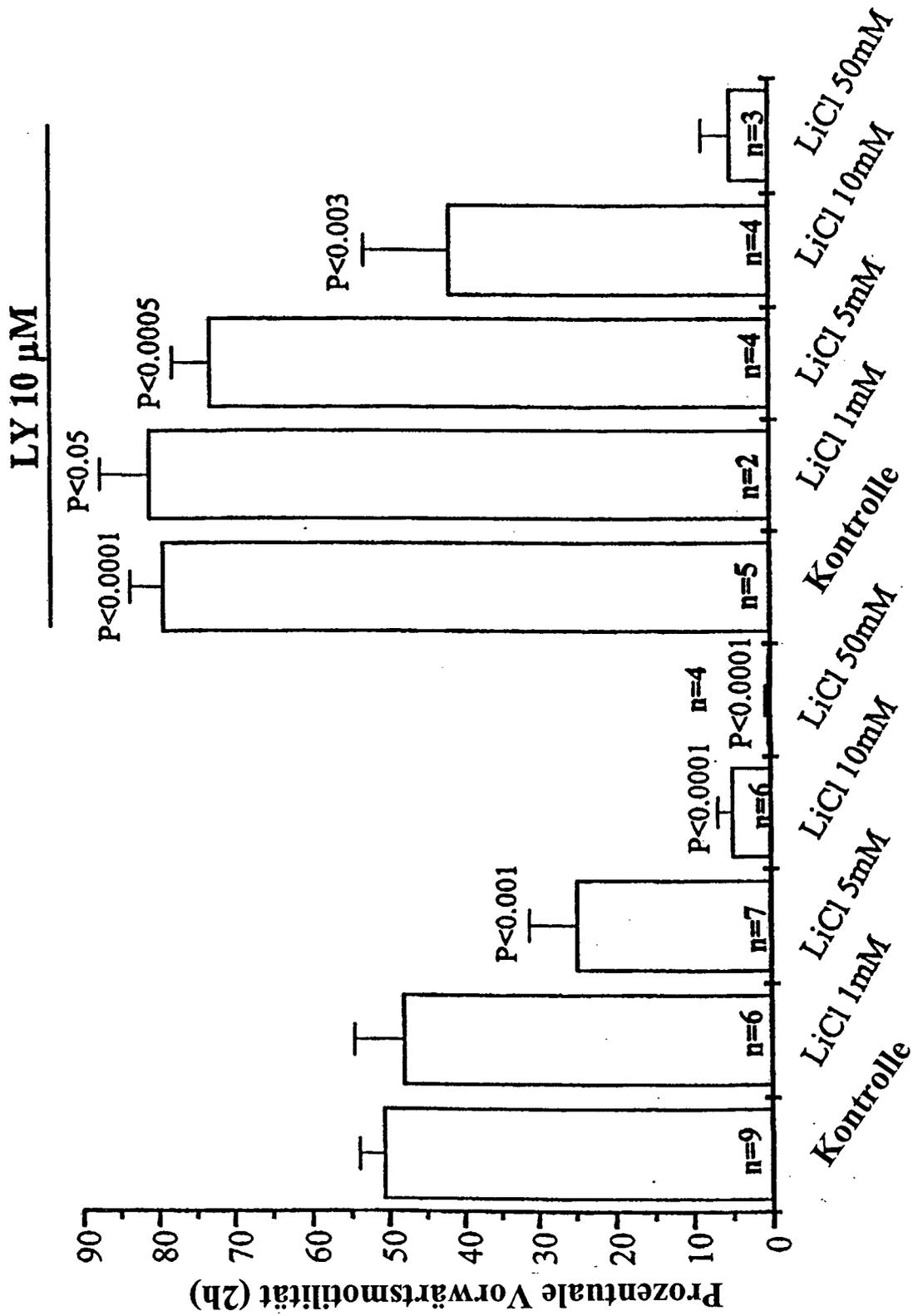


Fig. 7