



⑫ A Terinzagelegging ⑪ 8601881

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Werkwijze voor het winnen van voor de natuurlijke en kunstmatige bevruchting geschikte geslachtsproducten uit zoogdieren, werkwijze voor de bereiding van geneesmiddelpreparaten, diergeneeskundige preparaten, alsmede de toepassing van een werkzame stof voor het beïnvloeden van de geslachtsactiviteit van zoogdieren.**
- ⑤1 Int.Cl⁴: A61K37/38, C07K15/06, A61K7/06.
- ⑦1 Aanvrager: Innofinance Altalanos Innovacios Pénzintézet te Boedapest, Hongarije.
- ⑦4 Gem.: Drs. A. Kupecz c.s.
Octrooibureau Los en Stigter B.V.
Postbus 20052
1000 HB Amsterdam.

- ②1 Aanvraag Nr. 8601881.
- ②2 Ingediend 18 juli 1986.
- ③2 Voorrang vanaf 18 juli 1985.
- ③3 Land van voorrang: Hongarije (HU).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 276385 .
- ⑥2 - -

- ④3 Ter inzage gelegd 16 februari 1987.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Werkwijze voor het winnen van voor de natuurlijke en kunstmatige bevruchting geschikte geslachtsproducten uit zoogdieren, werkwijze voor de bereiding van geneesmiddelpreparaten, diergeneeskundige preparaten, alsmede de toepassing van een werkzame stof voor het beïnvloeden van de geslachtsactiviteit van zoogdieren.

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het winnen van de voor de natuurlijke en de kunstmatige bevruchting geschikte geslachtsproducten uit zoogdieren in het pre- en postnatale leven, in het infantiele stadium, in de voorpuberteit en in de volgroeide toestand (hierna samengevat als: media) door het regelen van de activiteit van hun geslachtsorganen. De uitvinding heeft eventueel ook verder betrekking op het verwekken van nakomelingen uit deze geslachtsproducten alsmede een, betrokken op de voor die soort karakteristieke levensprestatie, verveelvoudiging van de voortbrenging van geslachtsproducten. Voorts heeft de uitvinding betrekking op een werkwijze voor de bereiding van geneesmiddelpreparaten die toepasbaar zijn in de diergeneeskunde voor het beïnvloeden van de geslachtsactiviteit van zoogdieren, alsmede op dergelijke diergeneeskundige preparaten. Tenslotte heeft de uitvinding betrekking op werkzame verbindingen voor de beïnvloeding van de geslachtsactiviteit van zoogdieren.

Voor het stimuleren van de geslachtsfunctie resp. voor het induceren van de ovulatie worden in eerste aanzet bij gebruiks- en fokdieren veelal verschillende hormoonpreparaten, zoals bijv. steroïden, gonadotropine resp. in de laatste tijd GnRH en bepaalde zeer actieve analogen van dit hormoon toegepast. De thans bekende stoffen resp. werkwijzen induceren slechts de ovulatie van de reeds rijpe, maar om een of andere reden nog niet vrijgemaakte eicellen; ofwel zijn ze slechts daartoe geschikt, een in het normale verloop van de cyclus optredend beletsel door hormonale werking eenmalig, bij wijze van impuls weg te nemen en daardoor de ovulatie te induceren. Tot op heden is geen hormoonpreparaat of werkwijze bekend, welke de functie van de eierstok algemeen stimuleert, het rijpingsproces van de preantrale of primordiale follikels bevordert, hetzij het aantal van de in de ontwikkeling begrepen follikels verhoogt.

Er is thans ook nog geen preparaat resp. werkwijze bekend, met behulp waarvan uit niet geslachtsrijpe dieren resp. uit dieren waarin de ontwikkeling van de geslachtsproducten in een bepaalde vroege periode is staande gebleven, of
5 uit intacte dieren in vitro ofwel uit gonaden post mortem geslachtsproducten kunnen worden verkregen die geschikt zijn voor bevruchting.

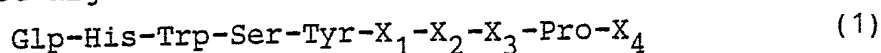
De functie van de gonaden resp. de productie van de geslachtsproducten ondergaat bij talrijke fokdieren als gevolg van een ongeschikte houding, en bij bepaalde hoogwaardige exotische wild- en pelsdieren als gevolg van de niet natuurlijke houding een terugontwikkeling of blijft staan. De tot nu toe bekende hormoonpreparaten zijn in het algemeen bij deze dieren werkingsloos gebleken.

15 De in de laatste tijd bekend geworden soortspecifieke GnRH-derivaten (J.A. King en R. P. Millar, J. Biol. Chem. 257, 10722-28 (1982); N. Sherwood et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 2794-2798 (1983)) alsmede het feit, dat de vakliteratuur over de aanwezigheid van verschillende GnRH-
20 achtige factoren in de gonaden resp. ovaria (R.M. Sharpe et al, Nature 290, 785-787 (1981); N. Dekel et al, Biol. Reprod. 28, 161-166 (1983)) bericht, werpt de vraag op naar speciale regulerende factoren en de wisselwerking met deze.

De in een oudere Hongaarse octrooiaanvraag nr.
25 4457/83 van dezelfde aanvraagster beschreven vis- resp. vogel-specifieke GnRH-derivaten zijn in het geval van vissen, die zich overigens in gevangenschap niet vermeerderen, geschikt om geslachtsproducten te winnen. Deze werking berust op een stimulering van de follikelonwikkeling.

30 Het doel van de onderhavige uitvinding is derhalve het verschaffen van een werkwijze waarmee de activiteit van de geslachtsorganen van zoogdierembryo's en zoogdieren zodanig kan worden gestimuleerd, dat geslachtsproducten die geschikt zijn voor natuurlijke of kunstmatige bevruchting kunnen worden verkregen en deze voor het verwekken van nakomelingen kunnen worden toegepast. Een verder doel van de uitvinding is de voortbrenging van geslachtsproducten van mannelijke en vrouwelijke zoogdieren, betrokken op de voor de
35 soort karakteristieke levensprestatie, te verveelvoudigen.

De uitvinding berust op de kennis, dat door toepassing van nonapeptide-(C₁-C₄-alkyl)-amiden resp. dekaeptidamiden met algemene formule (1)



5 waarin

X₁ een glycyldgroep of een willekeurig natuurlijk of synthetisch D-aminozuurrest voorstelt,

X₂ de rest van een, een alkylgroep met 1-4 koolstofatomen, een fenyl- of tryptofylgroep als zijketen bevattend L-amino-
10 nozuur voorstelt,

X₃ de rest van een, een alkylgroep met 1-4 koolstofatomen of een alkanoylamidegroep met 2-4 koolstofatomen als zijketen bevattend L-aminozuur voorstelt en

X₄ een glycyldamidegroep of alkylamidegroep met 1-4 koolstof-
15 atomen voorstelt,

alsmede van de zouten en metaalcomplexen hiervan dit doel kan worden bereikt, d.w.z. dat met deze verbindingen uit niet geslachtsrijpe alsmede uit zich in een seizoengebonden anoestrus of in een door een niet natuurlijke houding be-
20 paalde anoestrus bevindende zoogdieren in vivo en in vitro uit intacte dieren alsmede uit geslachtsorganen post mortem geslachtsproducten kunnen worden verkregen die geschikt zijn voor natuurlijke of kunstmatige bevruchting, hetzij de hoeveelheden ervan verveelvoudigd kunnen worden.

25 De bereiding van de verbindingen met algemene formule (1) is uit de Hongaarse octrooiaanvraag nr. 4458/83 alsmede uit het Amerikaanse octrooischrift 4.410.514 bekend.

De onderhavige uitvinding heeft derhalve tot doel een werkwijze voor het winnen van voor de natuurlijke en de
30 kunstmatige bevruchting geschikte geslachtsproducten van zoogdieren in het pre- en postnatale leven, in het infantiele stadium, in de voorpuberteit en in de volgroeide toestand (hierna samenvattend aangeduid met media) door het regelen van de activiteit van hun geslachtsorganen, en verder eventu-
35 eel voor het verwekken van nakomelingen uit deze geslachtsproducten en voor, betrokken op de voor die soort karakteristieke levensprestatie, verveelvoudiging van de voortbrenging van geslachtsproducten. Hiertoe wordt de onderhavige werkwijze gekenmerkt doordat men de media tenminste eenmaal, ten

hoogste echter 60 maal, bij voorkeur 1-5 maal met verbindingen met algemene formule (1) in een hoeveelheid van 0,01-500 µg/kg lichaamsgewicht, bij voorkeur 1-100 µg/kg lichaamsgewicht, behandelt en tussen de afzonderlijke behandelingen pauzen
5 inlast van tenminste 2 uur, ten hoogste echter 7 dagen, bij voorkeur 2-8 uur. De verbindingen worden bij voorkeur in de vorm van oplossingen, poeders, injecties of spray's toegepast, terwijl de toediening intramusculair, intraperitoneaal, subcutaan, intrauterinair enz. kan plaatsvinden.

10 Bij vele diersoorten wordt door de werkwijze volgens de uitvinding de productie van geslachtsproducten verhoogd, bij andere dieren (klinische gevallen) wordt de verminderde of pauzerende geslachtsactiviteit genormaliseerd en bereikt de voor die soort typische intensiteit. De werkwijze
15 volgens de uitvinding is tevens geschikt voor het opwekken van een hyperproductiviteit van de geslachtsorganen en daarmee voor de verveelvoudiging van de voor die soort karakteristieke hoeveelheid aan geslachtsproducten (superovulatie).

Door de werkwijze volgens de uitvinding wordt de
20 functie van de kiemhuid gestimuleerd en daardoor neemt het aantal motiele zaadcellen in het ejakulaat toe.

De werkwijze volgens de uitvinding is verder geschikt om een hyperproductie van de hypofyse teweeg te brengen, na welke de hypofyse ongevoelig wordt en daardoor
25 een onverschilligheidstoestand intreedt; op deze wijze is de werkwijze ook geschikt voor conceptievoorkoming.

Met de werkwijze volgens de uitvinding kunnen de eindproducten onder natuurlijke en onder kunstmatige alsmede onder in het laboratorium gehandhaafde levensomstandigheden
30 worden vervaardigd.

De beschreven, door dosering van de GnRH-analogen in verschillend ritme geregelde vormen van de geslachtelijke functies zijn tot op heden nog niet gepubliceerde, nieuwe verschijnselen.

35 De voornaamste voordelen van de werkwijze volgens de uitvinding kunnen als volgt worden samengevat.

a) Door toepassing van de werkwijze kan de gonadenactiviteit van onder niet natuurlijke omstandigheden gehouden zoogdieren worden verbeterd resp. tot de normale werking wor-

den teruggebracht, waardoor de dieren geschikt worden gemaakt voor het voortbrengen van nakomelingen.

b) Met de werkwijze kan een hyperproductie van de eierstokken worden geïnduceerd, waardoor, met betrekking tot 5 het voor de betreffende soort karakteristieke aantal ovulaties, een veelvoud aan eicellen kan worden gewonnen. Deze kunnen na een in vitro bevruchting in de vorm van embryo's worden bewaard of door als ontvanger fungerende dieren worden voldragen.

10 c) Met de werkwijze kan bij infantiele exemplaren van zoogdieren een hyperstimulatie van de gonaden en daardoor een superovulatie worden geïnduceerd. Op deze manier kunnen uit een medium reeds nakomelingen worden gewonnen op een tijdstip, waarop het medium zelf nog niet geslachtsrijp 15 is.

d) De werkwijze is onder speciale laboratoriumomstandigheden, in orgaanculturen, geschikt voor het aanmaken van in vitro bevruchtbare eicellen uit intacte eierstokken post mortem. Op deze wijze kunnen uit hoogwaardige fokdieren 20 ook na de dood van het medium nakomelingen worden gewonnen.

e) Het verhandelen van de met de werkwijze aangemaakte geslachtsproducten maakt de door de afstand tussen de grote werelddelen verhinderde hybridisatie van de soorten mogelijk en derhalve is de mogelijkheid tot het fokken van 25 nieuwe verbruiksdiersoorten gegeven.

f) Met de werkwijze kunnen onder industriële productie-omstandigheden uit willekeurige leeftijdsgroepen van mannelijke en vrouwelijke zoogdieren grote hoeveelheden eicellen, zaadcellen of embryo's worden aangemaakt, hetgeen 30 bijvoorbeeld de oprichting van embryobanken en de intercontinentale verhandeling van nakomelingen mogelijk maakt.

g) Met de werkwijze kan de door het seizoen bepaalde anoestrus en de verhinderde spermatogenese van zoogdieren worden weggenomen. Daardoor kunnen op elk tijdstip 35 nakomelingen worden voortgebracht, hetgeen tot een betere benutting van de economische voorwerpen leidt.

h) De werkwijze is geschikt voor de kunstmatige vermeerdering van onder natuurbescherming staande zeldzame diersoorten.

i) Met de werkwijze kan zowel in mannelijke alsook in vrouwelijke zoogdieren de hypofyse ongevoelig worden gemaakt en daardoor kan een ongewenste drachtigheid ook in die gevallen worden vermeden, waarin de bekende conceptievoor-
5 komingsmiddelen niet toepasbaar zijn.

De werkwijze volgens de uitvinding wordt aan de hand van de volgende uitvoeringsvoorbeelden nader toegelicht.

VOORBEELD I

Het opwekken van een superovulatie in infantiele
10 vrouwelijke ratten

60 stuks infantiele vrouwelijke ratten van 21 dagen oud en met een gewicht van 7-8 g werden intraperitoneaal behandeld met in een fysiologische keukenzoutoplossing opgelost D-Phe⁶, Gln⁸-GnRH. Afhankelijk van de soort behandeling wer-
15 den de dieren in meerdere groepen ingedeeld. In de 1-8 dagen durende behandelingsreeks werden voordoses van 1 resp. 2 µg/dag resp. tweemaal daags toegediend.

Na de beëindiging van de behandelingen werden alle dieren met etherdamp gedood en hun eierstokken werden na het
20 intreden van de dood, 24 uur na de laatste behandeling door middel van operatie verwijderd. De evaluatie geschiedde visueel en aan de hand van histologische proeven. In de eierstokken van de contrôledieren werden meerdere zich in ontwikkeling bevindende follikels gevonden, maar geen bereikte de
25 grootte van Graafse follikels, ook waren noch corpora lutea noch een corpus haemorrhagicum aanwezig. Daarentegen kon bij alle behandelde groepen een hormoonwerking worden aangetoond, die zich manifesteerde in de groei van de follikels, de omvorming tot Graafse follikels, de ovulatie van grote folli-
30 kels en de ontwikkeling van normale corpora lutea. Tevens waren de eileiders en baarmoeder vergroot. Van de 50 behandelde dieren toonden in totaal 4 geen reactie op de behandeling. Bij de dieren, die 4 dagen lang tweemaal daags 2 µg GnRH-analoog hadden gekregen en op de vierde dag, 6 uur na
35 de 2 µg-dosis met een dosis van 10 µg waren behandeld, bevonden zich in de eierstokken een grote hoeveelheid van direct voor de ovulatie staande, week geworden Graafse follikels. Het aantal van de uiteindelijk rijpe Graafse follikels per dier bedroeg 60-90, terwijl in het geval van volwassen

dieren de normale waarde bij 12 ligt. Een tweede groep dieren werd op dezelfde wijze behandeld met dien verstande, dat de behandeling zich over 6 dagen uitstrekte. In het geval van deze groep werd de superovulatieprestatie geëvalueerd naar
5 het aantal van de in de eierstokken ontstane normale corpora lutea. Evenals in het geval van de eerder uitvoerig beschreven resultaten bedroeg het aantal corpora lutea per dier ook hier 60-90. De histologische evaluatie bevestigde dit resultaat volledig.

10 Op de beschreven wijze werden enerzijds reeds in nog infantiele exemplaren van de soort rijpe eicellen aange- maakt, terwijl anderzijds het aantal eicellen, in vergelijking met de fysiologische waarde van de volwassen dieren, verveel- voudigd werd.

15 VOORBEELD II

Het opwekken van superovulatie bij infantiele vrou- welijke muizen

Op de in voorbeeld I beschreven wijze werden in totaal 105 vrouwelijke muizen behandeld, die 28 dagen oud
20 waren en een gewicht van 5-6 g hadden. De gedurende 1-8 dagen behandelde dieren kregen dagelijks tweemaal 1-5 μg D-Phe⁶, Gln⁸, desGly¹⁰-GnRH-ethylamide. Tussen de afzonderlijke behan- delingen lag een periode van 4 uur. De eierstokken werden 27 uur na de laatste injectie verwijderd.

25 De eierstokken van de contrôlegroep bezaten een matgele kleur en homogene structuur, terwijl in vele eierstok- ken zich 1-2 groeiende follikels bevonden. In de groepen van de behandelde dieren kon de werking van het hormoon worden waargenomen bij alle eierstokken, vergrote eileiders en de
30 baarmoeder. Bij de dieren, die dagelijks eenmaal een dosis van 1 μg en op de derde dag, 4 uur na de 1 μg -dosis, 5 μg van het genoemde GnRH-analoog hadden gekregen, waren in de eier- stokken definitief uitgerijpte, week aanvoelende Graafse follikels gevonden en wel 45-70 stuks per dier. Bij een over-
35 eenkomstige, maar gedurende 5 dagen behandelde groep hadden zich in plaats van de Graafse follikels normale corpora lutea in het genoemde aantal gevormd. Het resultaat van de histolo- gische onderzoeking stemde overeen met de visuele evaluatie.

De resultaten bevestigden de resultaten van de

werkwijze volgens voorbeeld I.

VOORBEELD III

Het opwekken van superovulatie bij infantiele konijntjes

5 20 onder de omstandigheden van massaproductie geboren jonge konijntjes van het ras "Witte Parel" in de leeftijd van 42 dagen werden gedurende drie dagen tweemaal daags intraperitoneaal met telkens 5 μ g D-Phe⁶, Gln⁸-GnRH behandeld. Vervolgens werden de dieren in twee groepen onderverdeeld. De
10 ene groep werd op de vierde dag met 50 μ g werkzame stof behandeld, terwijl de andere groep met etherdamp werd gedood. Het aantal rijpe Graafse follikels in de voor de behandeling gedode groep diende als contrôle ter vaststelling van de door de dosis van 50 μ g optredende verandering. Bij de in leven
15 gelaten dieren werd het intreden van de ovulatie gevolgd bij twee dieren door middel van een 10 uur durend, onder een narcose uitgevoerd laparoscopisch onderzoek (spiegeling van de buikholte). De behandeling met 50 μ g had na 26 uur 30-45 ovulaties resp. corpus haemorrhagicum per dier ten gevolge, ter-
20 wijl de eierstokken van de contrôledieren inactief waren.

Met deze werkwijze konden reeds uit infantiele exemplaren van konijntjes rijpe eicellen worden aangemaakt en het aantal ervan, betrokken op de fysiologische waarde, worden verveelvoudigd.

25 VOORBEELD IV

Het opwekken van superovulatie bij infantiele varkens

20 infantiele vrouwelijke biggen, die 100 dagen oud waren, werden gedurende 6 dagen tweemaal daags intramusculair
30 met telkens 10 μ g D-Phe⁶, Gln⁸-GnRH behandeld. Ter evaluatie werd bij elk contrôledier een eierstok verwijderd; de onderzoekingsmethoden kwamen overeen met de in voorbeeld III beschreven methoden; het aantal gevormde Graafse Follikels en het aantal van de na de ovulatie gevormde corpora lutea wer-
35 den vergeleken. Het intreden van de ovulatie werd met de laparoscopie gade geslagen. De op de zevende dag toegediende dosis van 100 μ g D-Phe⁶, Gln⁸-GnRH had na 41 uur bij de 10 behandelde biggen 15-36 ovulaties ten gevolge. De behandeling van de infantiele biggen leidde tot hetzelfde resultaat als

in het geval van de in voorbeelden I-III genoemde diersoorten.

VOORBEELD V

Het opwekken van een superovulatie bij infantiele

5 schapen

10 Jerke-lammers van 50 dagen oud werden gedurende 5 dagen tweemaal daags met 10 µg D-Phe⁶, Gln⁸, desGly¹⁰-GnRH-ethylamide intramusculair behandeld. Een op de zesde dag toegediende dosis van 70 µg werkzame stof had per dier 3-9 ovulaties ten gevolge. Bij de contrôledieren trad geen verandering op. De evaluatie vond zowel bij de behandelde dieren alsook bij de contrôledieren door middel van laparoscopie plaats. De resultaten stemden overeen met de in voorbeelden I-III beschreven resultaten.

15

VOORBEELD VI

Het opwekken van superovulatie bij infantiele runderen

8 infantiele kalveren van 65 dagen oud werden gedurende 8 dagen driemaal daags met 2 µg D-Phe⁶, Gln⁸, desGly¹⁰-GnRH-ethylamide behandeld. Na een pauze van een dag, werden op de tiende dag de dieren intramusculair met 100 µg werkzame stof behandeld. Na de laatste injectie werden beide eierstokken verwijderd; in het algemeen werden per eierstok ca. 5-11 ontwikkelde Graafse follikels gevonden. De helft van de follikels voelde niet meer hard aan, en bevond zich derhalve onmiddellijk vóór de ovulatie.

Deze proefneming bewijst, dat ook in het geval van runderen zelfs uit infantiele dieren meerdere rijpe eicellen kunnen worden gewonnen, terwijl het volwassen rund normaler-
30 wijs slechts één eicel ovuleert.

VOORBEELD VII

Behandeling van fysiologische oligospermie bij chimpansees ten behoeve van het bereiken van normospermie

Voor in kleine groepen levende diersoorten, in het bijzonder echter voor de primaten is het in de vakliteratuur
35 meermaals gepubliceerde feit karakteristiek, dat weliswaar alle mannetjes in de troep een actieve libido hebben, maar slechts de leiderdieren copuleren, terwijl de ondergeschikte mannetjes fysiologisch en reversibel oligospermisch zijn. In

het onderhavige geval werd behalve het van het leiderdier verzamelde en in de spermabank opgeslagen sperma, uitgesproken ten behoeve van de inseminatie, nog het sperma van 4 ondergeschikte mannetjes (alle geslachtsrijp) benodigd. Vóór de behandeling werden de dieren onder narcose langs elektrische weg tot ejaculatie gebracht. De ejaculaten werden onder een microscoop geëvalueerd naardichtheid en motiliteit en vervolgens aan een diepvriesproef (-196°C) onderworpen. Eigen vroegere spermatologische onderzoeken hadden namelijk 10 getoond, dat microscopisch slecht vaststelbare defecte zaadcellen het diepvriezen niet overleven. Het na het diepvriezen verkregen gunstige spermabeeld toonde aan, dat de spermiogenese normaal verloopt. Het vóór de behandeling van de onderzochte mannetjes genomen ejaculaat vertoonde een 15 fysiologische oligospermie. Vervolgens kregen de 60-90 kg zware chimpansees wekelijks eenmaal $100\text{ }\mu\text{g}$ D-Phe⁶, Gln⁸, desGly¹⁰-GnRH-ethylamide in 1 ml fysiologische keukenzoutoplossing toegediend. De toediening vond intramusculair plaats met een drukluchtinschietapparaat. In de ejaculaten, die in 20 de vierde week na de eerste behandeling onder narcose, langs elektrische weg werden gewonnen, kon een gehalte van 40-60% spermium-voorzinnen worden geregistreerd, waarvan de motiliteit na de diepvriesproef beneden 10% lag. In de ejaculaten, die 60 dagen na de eerste behandeling werden gewonnen, was 25 het gehalte aan defecte zaadcellen kleiner dan 30% en de motiliteit groter dan 60%. Kwantitatieve en kwalitatieve eigenschappen van de ejaculaten kwamen overeen met die van het uit het leiderdier gewonnen ejaculaat alsmede met de opgaven van de vakliteratuur. Bij het diepvriezen van de in een ver- 30 houding 1:1 verdunde ejaculaten nam de 60%-ige motiliteit slechts af tot 45%. Sperma van deze kwaliteit is zowel vers alsook diepgevroren geschikt voor inseminatiedoeleinden.

Op de beschreven wijze kan uit ondergeschikte mannetjes voor de bevruchting geschikt, in de spermabank op- 35 slaanbaar sperma in een geschikte hoeveelheid en van geschikte kwaliteit worden gewonnen.

VOORBEELD VIII

Het opwekken van spermiogenese bij een door een seizoen bepaald oligospermische Wisentstier ten behoeve van

de winning van voor inseminatie en voor diepvriesopslag geschikt ejaculaat

Van een zich in een dierentuin bevindende ca. 700 kg zware Wisentstier werd in de maand mei onder narcose langs 5 elektrische weg een zaadmonster genomen. Vastgesteld werd, dat de stier zich in de toestand van seizoenbepaalde oliegospermie bevond. De symptomen waren als volgt: in het gezichtsveld van de voor spermaonderzoekingen in het algemeen gebruikte, 1500x vergrotende microscoop bedroeg het spermium- 10 aantal 5-20, terwijl het aandeel van de defecte zaadcellen 75-80% bedroeg en de dikte van het sperma 0,5 was. Sperma van deze kwaliteit is ongeschikt voor bevruchting.

Het dier werd nu intramusculair (door middel van een drukluchtinschietapparaat) wekelijks tweemaal met telkens 15 200 µg D-Phe⁶, Gln⁸-GnRH behandeld. Op de vijftienvijftigste dag na aanvang van de behandeling werd het dier tweemaal, met een tussenperiode van 1 uur, tot ejaculatie gebracht. De beide ejaculaten werden verenigd; de dichtheid bedroeg 4, de motiliteit 55%. Het sperma werd diepgevroren en vervolgens werd de 20 door het diepvriezen optredende motiliteitsvermindering bepaald. Deze bedroeg slechts 5%.

Met deze werkwijze lukte het, de spermiogenese van het fokdier zo te beïnvloeden, dat in plaats van het voor bevruchting niet toepasbare ejaculaat een zowel in verse toestand 25 alsook na een diepvriesopslag voor de bevruchting van meerdere koeien (in totaal 14) geschikt sperma van zeer goede kwaliteit kon worden gewonnen.

VOORBEELD IX

Het opwekken van spermiogenese bij door het seizoen 30 bepaald oligospermische roodvossen (*Vulpes vulpes*)

De spermiogenese van in een dierentuin gehouden, door het seizoen bepaald oligospermische roodvossen diende te worden beïnvloed, opdat de in fokstations gehouden edelzilver- en blauwvossen kunnen worden geïnsemineerd, teneinde bijzondere 35 en hoogwaardige hybridevellen te kunnen produceren. Uit de vakliteratuur is bekend, dat de gezamenlijke ondersoorten van de vossen slechts eenmaal per jaar loops zijn en dat buiten deze ene periode de gonaden van beide geslachten volledig inactief zijn. Tussen het optreden van oestrus bij de afzon-

derlijke ondersoorten bestaat een verschil in tijd van meerdere maanden (roodvos: januari, blauwvos: april tot mei). De resultaten van de onderzoeken werden met het spermabeeld van een zich in de seizoens gebonden oestrus bevindende populatie vergeleken, waarbij de gemiddelde ejaculaathoeveelheid 2 ml, de dichtheid 3 en de motiliteit 50-60% bedroeg. Dit werd als fysiologische waarde beschouwd.

Vijf geslachtsrijpe mannelijke roodvossen van gemiddeld 8 kg gewicht werden, beginnend in april, gedurende 7 weken wekelijks tweemaal met 1, 5, 10, 50 µg D-Phe⁶, Gln⁸-GnRH behandeld. In de derde week na aanvang van de behandeling werden spermamonsters genomen. In de monsters bedroeg het aantal zaadcellen ca. 60-70% van de fysiologische waarde, terwijl het aantal gedegenereerde spermiën hoger was dan 40%. De defecte vormen waren voornamelijk jonge vormen (plasma-druppels aan het middelste deel van het halsdeel). In de zevende week na aanvang van de behandeling werd onder narcose opnieuw ejaculaat verzameld. Van de gezamenlijke dieren kon op succesvolle wijze zaad worden genomen, waarbij het volume van het ejaculaat 1,2 - 3,1 ml bedroeg, de dichtheid bij 3 lag, de motiliteit 65% was en numeriek de fysiologische waarde wezenlijk overtrof. (De mannelijke dieren waren in deze periode van de vrouwelijke gescheiden, zodat tot een lediging door middel van copulatie geen mogelijkheid bestond.) De spermamonsters werden naar kwaliteit in groepen ingedeeld en diepgevroren. Na het verdunnen en diepvriezen en tenslotte het ontdooien bedroeg de motiliteit van het tot -196°C gekoelde sperma 45%. Onder toepassing van het diepgevroren sperma kon - bij gebruikmaking van de GnRH-programmering (zie voorbeeld XVII) en de inseminatietechniek - bij blauwvossen een normale drachtigheid worden verkregen.

Door een bij de vijf vossen uitgevoerde eenmalige ejaculaatafname konden 56 voor bevruchting geschikte spermadoses worden bereid. De techniek is voor het produceren van hybride-edelvellen in grote hoeven geschikt.

VOORBEELD X

Behandeling van een wegens een gedegenereerd spermabeeld onvruchtbare Siberische tijger

Een zich in de dierentuin bevindende 8 jaar oude

Siberische tijger van 120 kg leefde sedert 3 jaren met een
tijgerin tezamen. In de oestrus van het vrouwtje vonden regel-
matig paringen plaats, maar dit leidde niet tot nakomelingen.
Dat een drachtigheid door de schuld van het vrouwtje niet tot
5 stand kwam moest worden uitgesloten, aangezien de tijgerkat
vroeger van een ander mannetje reeds drachtig was geweest en
haar jongen ook had grootgebracht.

Van het tijgermannetje werd onder narcose, langs
elektrische weg een spermamonster genomen. Het ejaculaat was
10 zeer dun, per gezichtsveld waren 4-5 gedegenerende spermiën
zichtbaar, die een trillende beweging uitvoerden. De vorm van
de degeneraties was karakteristiek voor de jongere fasen van
de spermatogenese. Het dier werd wekelijks eenmaal intramus-
culair (door middel van een drukluchtinschietapparaat) met
15 100 µg D-Phe⁶, Trp⁷, Leu⁸-GnRH, opgelost in 1 ml fysiologi-
sche keukenzoutoplossing, behandeld. De tijger werd te zamen
met zijn tijgerin gehouden en ook gedurende de behandelings-
periode vonden regelmatig paringen plaats. Het wijfje werd
drachtig en baarde drie gezonde kleine tijgers. Uit het tijd-
20 stip van de geboorte kan worden bepaald, dat de vruchtbare
copulatie 40-50 dagen na de eerste behandeling plaatsvond.

De werkwijze is dientengevolge geschikt voor de
behandeling van het gedegenerende spermabeeld van een on-
vruchtbare mannelijke tijger en op deze wijze voor het ver-
25 wekken van nakomelingen.

VOORBEELD XI

Stimulering van fysiologische normospermie bij een
Bengaalse tijger ter verkrijging van hyperspermie welke diep-
vriezen mogelijk maakt.

30 Een zich in een dierentuin bevindende 8 jaar oude
Bengaalse tijger van ca. 200 kg paarde regelmatig, zijn
vrouwtje was vroeger in elk jaar drachtig geweest. Onder ken-
nis hiervan werd van de tijger onder narcose, langs elektri-
sche weg in de paringstijd een spermamonster genomen. Vast-
35 gesteld werd, dat de dichtheid van het sperma 3, de motili-
teit 30% en de ejaculaathoeveelheid 0,2 ml bedroegen. Het
ejaculaat vertoonde het beeld van fysiologische normospermie.
Een dergelijke geringe hoeveelheid ejaculaat kan vanwege
technische redenen niet diepgevroren worden. Om een leverbe-

schadiging te voorkomen mag de narcose ten hoogste om de 4 dagen worden uitgevoerd en ten hoogste gedurende 4-5 uur worden gehandhaafd. Deze wijze van spermaverzamelen is niet uitvoerbaar.

5 Het mannetje werd in een gescheiden kooi opgesloten en gedurende 12 dagen dagelijks met 10 µg D-Phe⁶, Gln⁸, desGly¹⁰-GnRH-ethylamide behandeld. De werkzame stof werd in 1 ml fysiologische keukenzoutoplossing opgelost en door middel van een drukluchtinschietapparaat intramusculair toege-
10 diend. Op de twaalfde dag werd het dier onder narcose, langs elektrische weg tweemaal, met een uur tussentijd tot ejaculatie gebracht, waarbij 1 ml resp. 0,8 ml sperma werd gewonnen. De dichtheid van het verenigde monster bedroeg 4, de motiliteit lag bij 70%. De spermamonsters werden diepgevroren en in 21
15 afzonderlijke doses verdeeld voor kunstmatige bevruchting. Na het ontdooien van het sperma bedroeg de motiliteit 60%.

Op deze wijze kon van een Bengaalse tijger in een spermabank opslaanbaar sperma in een aanmerkelijke hoeveelheid worden gewonnen.

20 VOORBEELD XII

Behandeling van een door een niet natuurlijke houding veroorzaakte aspermie bij een orang-oetang

Een zich in een dierentuin bevindende 18 jaar oude mannelijke orang-oetang van ca. 350 kg was als jong dier op-
25 gesloten. Hij had na elkaar drie eigenaars gehad. Volgens de anamnese had hij nog nooit een vrouwelijke metgezel gehad, maar was hij steeds alleen gehouden en had nooit gepaard. Hij leefde sedert 11 jaar in de dierentuin zonder soortgenoten en zonder vrouwtjes. Zijn gedrag was flegmatisch, inactief, en
30 gekenmerkt door ziekenhuissymptomen. De dierentuin kreeg een aanbod, volgens welk een instituut het dier zou kopen, wanneer het tot de Borneo-ondersoort behoorde en vruchtbaar was. Het chromosomenonderzoek wees uit, dat het dier tot de Borneo-ondersoort behoorde, d.w.z. een buitengewoon zeldzaam exem-
35 plaar was (op de hele wereld zijn er slechts 153 exemplaren). In de anamnese stelde het feit, dat de voor de mannelijke primaten karakteristieke agressiviteit en het regelmatige masturberen sedert het tijdstip van de ca. 5-6 jaar geleden ontstane ziekenhuissymptomen volledig hadden opgehouden, de

vruchtbaarheid in twijfel. Van het dier werd onder narcose, langs elektrische weg een spermamonster genomen. In het ejaculaat was uitsluitend de afscheiding van de bijklieren gelegd, driemaal telkens een druppel, in totaal 0,1 ml.

- 5 In het ejaculaat konden geen beweeglijke spermiën worden gevonden, er waren enkel enige inactieve zaadcellen aanwezig. (Bij het microscopisch onderzoek werden in 10 gezichtsvelden in totaal 1-2 stuks geteld.)

- Het dier werd nu wekelijks tweemaal met 100 µg
10 D-Phe⁶, Gln⁸, desGly¹⁰-GnRH-ethylamide behandeld. De behandeling vond plaats op de in voorbeelden I-XI beschreven wijze. Gedurende de behandelingsperioden werden de bewegingen van het dier levendiger, actiever, maar dat kon niet als een toename van de libido worden beoordeeld, omdat het ook door de
15 angst voor de inschietinjecties kon zijn veroorzaakt. De behandeling werd op de zevenenveertigste dag na de eerste injectie beëindigd. Het dier werd in een hernieuwde narcose tweemaal, met een tussenperiode van een uur tot ejaculatie gebracht, waardoor in totaal 3,2 ml sperma werd gewonnen. De
20 dichtheid van het sperma bedroeg 3, de motiliteit was 35%. Het aandeel van de gedegenerende zaadcellen bedroeg 20%, waarbij het zich praktisch slechts handelde om jonge ontwikkelingsvormen (plasmadruppels aan het middelste gedeelte van het halsdeel).

- 25 Vanwege de buitengewoon hoge waarde van het dier en ook in het belang van de ongedeedheid van het de behandelings uitvoerende personeel werd de behandeling niet verder voortgezet. Het gecontroleerde spermabeeld, dat overeenkwam met de voor vruchtbare primaten karakteristieke waarden, was
30 voldoende voor de koper.

Op deze wijze kon de vruchtbaarheid van een buitengewoon zeldzaam, waardevol dier weer worden teruggebracht en door het opslaan van zijn sperma kon er in de internationale catalogus aangetekende genreserve worden gevormd.

35 VOORBEELD XIII

Ovariale remming bij leeuwen ten behoeve van contraceptie

In dierentuinen over de gehele wereld wordt de leeuw als een van de grote roofdieren getoond. Voor de ver-

schillende panorama's en safariparken is het noodzakelijk beide geslachten tegelijkertijd in een en dezelfde levensruimte te tonen. Onder de grote roofdieren is de leeuw de enige die zich in gevangenschap bij toereikende voedings-
5 verhoudingen goed vermeerdert. Vanwege de absolute verzadiging van de "leeuwenmarkt" is het uitwerken van een conceptievoorkomende werkwijze wenselijk, welke voor het dier ongevaarlijk is, in zijn uiterlijke verschijning en zijn gedrag geen veranderingen opwekt en ondanks een vruchtbare
10 copulatie de conceptie voorkomt. De conceptievoorkoming op basis van sexuele steroïden leidt binnen korte tijd tot ziekelijke vervetting en tot het verlies in demonstratiewaarde van het dier.

Een zich in een dierentuin bevindende intacte,
15 vruchtbare leeuwin van ca. 200 kg, die in haar leven reeds vijfmaal geworpen had, werd om de 3 weken tweemaal met D-Phe⁶, Gln⁸-GnRH behandeld en weliswaar aanvankelijk met 50 µg, na 4 uur met 500 µg en vervolgens werd een pauze ingelast van 3 weken. Deze om de drie weken plaatsvindende behandeling werd
20 aan het begin van de oestrus tot aan de vijftigste dag na het voor die soort karakteristieke eindtijdpunt van de oestrus (dus van april tot aan augustus) uitgevoerd. Het dier toonde een normaal gedrag en paarde gedurende de oestrus regelmatig, terwijl het betreffende mannetje volgens het onderzoek normo-
25 sperm was. De leeuwin werd gedurende de behandelingsduur niet drachtig en noch in haar gedrag noch in haar uiterlijk waren afwijkingen van het normale waar te nemen.

VOORBEELD XIV

Het induceren van geslachtsactiviteit van zich on-
30 der de omstandigheden van massaproductie in de puberteit bevindende vrouwelijke jonge varkens ten behoeve van het voor de eerste keer teweegbrengen van de conceptie-bereide toestand

Onder de voorwaarden van massaproductie wordt nagestreefd, de voor het handhaven van het bestand voorziene
35 fokdieren zo snel mogelijk voor de fok in te zetten alsmede de bevruchting en het biggenwerpen in het belang aan de aanpassing aan een continue technologie te synchroniseren. De gonadenactiviteit van in een grote massa gehouden, door intensieve voeding tot snelle groei gedwongen vrouwelijke jonge

varkens is in de periode van de prepuberteit en puberteit labiel, derhalve komt het zelden en over de totale populatie verstrooid voor, dat de op zich zelf conceptiebereide toestand later door een drachtigheid wordt gevolgd.

- 5 Ten behoeve van de proef werden in een varkensfokstation van de ter beschikking staande 200 toekomstige fokzeugen - op grond van de beste ontwikkeling, het beste voederbenuttend vermogen enz. - 60 dieren uitgezocht. Deze werden willekeurig in 2 groepen van elk 30 dieren onderverdeeld.
- 10 Beide groepen werden, zoals overeenkomt met de technologie op dit station, gedurende 24 uur noch gevoederd noch gedrenkt. De dieren werden op het tijdstip van hun verkiezing intramusculair met in fysiologische keukenzoutoplossing opgelost D-Phe⁶, Gln⁸-GnRH behandeld. De injecties met doses van tel-
- 15 kens 20 µg van de genoemde verbinding werden met tussenpozen van 24 uur nog tweemaal herhaald. Zowel in de onbehandelde contrôlegroep alsook in de behandelde groep trad de conceptiebereide toestand bij het eerste dier 5 dagen na de verkiezing van het dier in. Beide bestanden werden in dezelfde stal, in
- 20 dezelfde luchtruimte, onder identieke omstandigheden gedurende de van de technologie afkomstige toelaatbare 26 dagen gehouden. Gedurende deze periode geraakten van de onbehandelde contrôlegroep 3 dieren (10%), van de behandelde groep 21 dieren (70%) succesvol in de conceptiebereide toestand. Als
- 25 succesvol werden slechts die gevallen geboekt, waarbij de conceptiebereide toestand was gevolgd door een normale drachtigheid en geboorte.

- In deze proefreeks strekte de doelstelling zich niet uit tot de nauwkeurige instelling van het ovulatietijdpunt,
- 30 omdat niet voldoende fokberen ter beschikking stonden. Derhalve was de doelstelling de "eerste succesvolle conceptiebereide toestand" binnen 26 dagen. Het aandeel van 10% drachtige dieren in de contrôlegroep kwam overeen met het bedrijfs-gemiddelde. Derhalve betekent de door de behandeling ingetreden
- 35 den 60%-ige verhoging een belangrijk economisch nut.

VOORBEELD XV

Behandeling van gedurende een langere tijd onvruchtbare chinchilla's

20 Chinchilla's, die tenminste sedert 2 jaar onvrucht-

baar waren, werden door middel van een intraperitoneale injectie gedurende 3 dagen dagelijks tweemaal met telkens 10 µg D-Phe⁶, Gln⁸-GnRH behandeld. Op de vierde dag werd 75 µg van het hormoonanaloog toegediend. Vervolgens werden de dieren overeenkomstig de technologie bij de bokken gelaten. 12 van de chinchilla's wierpen jongen binnen 4 maanden.

Parallel aan deze proef werden 3 bijzonder waardevolle chinchilla's ("Black"-mutanten), die langer dan 2 jaar onvruchtbaar waren, gedurende 3 dagen tweemaal daags met telkens 10 µg D-Phe⁶, Gln⁸-GnRH behandeld. De werkzame stof werd als intraperitoneale injectie toegediend. Op de vierde dag werd het hormoonanaloog in een dosis van 75 µg toegediend, waarna de dieren zoals gebruikelijk bij de bok werden gelaten. Binnen 4 maanden wierpen alle drie de dieren jongen.

15 Met deze werkwijze konden gedurende langere tijd onvruchtbare, hoogwaardige pelsdieren opnieuw voor de fok worden gebruikt.

VOORBEELD XVI

De opheffing van de seizoenbepaalde anoestrus van 20 volwassen wilde katten (*Felis silvestris*)

Twee zich in een dierentuin bevindende vrouwelijke wilde katten van gemiddeld 6 kg, waarvan de cyclus onder natuurlijke omstandigheden in de maanden februari/maart valt, werden in augustus met D-Phe⁶, Gln⁸, desGly¹⁰-GnRH-ethylamide 25 behandeld. Voorafgaande aan de behandeling werd de buikholte onder narcose geopend ter inspectie van de toestand van beide eierstokken. Nadat de buikholte weer was dichtgenaaid, werden de dieren onder inlassing van tweedaagse pauzes in totaal viermaal met de werkzame stof behandeld, welke, in een fysiologische keukenzoutoplossing opgelost, intramusculair werd 30 toegediend. Tussen de eerste en de tweede injectie werd een pauze van twee uur gehouden; de eerste dosis bedroeg 100 µg, en de tweede 500 µg. Na 48 uur volgde de derde dosis (100 µg) en na twee verdere uren de vierde (500 µg). Op de nulde, 35 tweede, vierde en achtste dag werden de buikholtes onder narcose geopend, en werd de verandering van de toestand van de eierstokken visueel beoordeeld. Na beëindiging van de behandelingen werden beide eierstokken operatief verwijderd, gefixeerd en histologisch geëvalueerd.

40 Op de nulde dag waren bij beide dieren in de linker

eierstok 3-4 vermoedelijk secundaire follikels, een terug- gevormd oud corpus luteum en in de rechter eierstok 5-6 vermoedelijk secundaire follikels te zien. Door de behandeling hadden na 4 dagen alle secundaire follikels zich ontwikkeld tot Graafse follikels, de ovulatie had plaatsgevonden en op de plaats van de follikels bevonden zich in de omvorming tot corpora lutea begrepen corpora haemorrhagica. Naast de laatstgenoemde groeiden follikels in een visueel niet telbare hoeveelheid, die zich door de werking van de verdere behandeling verder ontwikkelden en na de laatste 500 µg-dosis met intrafollikulaire luteinisatie atretiseerden. De visuele bevindingen werden door de histologische proeven in volle omvang gesteund.

De door de beschreven behandeling ingetreden ovulatie bewijst, dat bij katachtigen ook buiten het seizoen bevruchting kan worden verkregen en ook in een niet natuurlijke houding nakomelingen kunnen worden voortgebracht.

VOORBEELD XVII

Behandeling van een zich in een seizoenbepaalde anoestrus bevindend blauwvoswijfje ten behoeve van het opwekken van een vruchtbare oestrus

Een zich in de seizoenbepaalde anoestrus bevindend blauwvoswijfje werd in december onder narcose laparoscopisch onderzocht. Vastgesteld werd, dat beide eierstokken inactief waren en geen zich ontwikkelende follikels of Graafse follikels bevatten.

Het dier werd gedurende 10 dagen tweemaal daags intramusculair met 1-5 µg D-Phe⁶, Gln⁸-GnRH behandeld. Op de tiende dag vond onder narcose een hernieuwd laparoscopisch onderzoek plaats. In beide eierstokken bevonden zich grote corpora lutea, waarvan het aantal - dat als gevolg van technische tekortkomingen slechts kon worden geschat - 10-20 bedroeg. Tegelijkertijd werd vastgesteld, dat de baarmoederhals open was.

Eveneens in december werd een vanwege mammaire verkommering tot uitsluiting van de fok veroordeeld wijfje op soortgelijke wijze dagelijks tweemaal met telkens 2 µg D-Phe⁶, Gln⁸-GnRH behandeld. De werking van de behandeling werd gevolgd aan de verandering van de toestand van de baarmoeder-

hals. Op de zesde dag na de eerste behandeling opende de baarmoederhals zich. Daarna werd een dosis van 50 μ g toegediend. Na 16 uur werd de toestand van de eierstokken door spiegeling onderzocht; de ovulatie kon elk moment op gang komen. Nu werd de buikholte volledig geopend, waarbij de eierstokken door operatie werden verwijderd, en uit de in totaal 11 Graafse follikels werden de eicellen door punctie verwijderd. Zes normale eicellen werden gevonden, die door een normaal corona radiata waren bedekt.

10 Met deze werkwijze werd de aanmaak van voor in vitro bevruchting geschikte eicellen, van embryo's in een seizoenbepaalde anoestrus, zonder storing van de normale jaarlijkse cyclus, mogelijk gemaakt. Dit biedt de mogelijkheid voor de productie van bijzondere hybridenakomelingen
15 onder toepassing van weinig waardevolle ontvangstdieren.

VOORBEELD XVIII

Stimulering van de eierstokfunctie van infantiele huiskatten (*Felis catus domesticus*) met D-Phe⁶, Gln⁸-GnRH

5 jonge katten met een leeftijd van 45 dagen, die
20 elk een gewicht van ca. 0,3 kg hadden, werden met tussenpozen van 2 dagen in totaal viermaal met telkens 100 μ g D-Phe⁶, Gln⁸-GnRH behandeld. De werkzame stof werd in een fysiologische keukenzoutoplossing opgelost en intramusculair toegediend. Na beëindiging van de behandeling werden beide eier-
25 stokken onder narcose operatief verwijderd en visueel gecontroleerd. Aansluitend werden de eierstokken in formaline gefixeerd en aan histologische onderzoeken onderworpen. In beide eierstokken waren 5-7 stuks corpora haemorrhagica aanwezig. Onder de schors werden van de heldere, boterkleurige eierstok
30 goed afscheidbare, zich in ontwikkeling bevindende follikels gevonden, waarvan enige de grootte van Graafse follikels hadden.

Deze resultaten bewijzen eenduidig, dat de eierstok van nog infantiele huiskatten door de werking van de be-
35 schreven werkwijze de voor het geslachtsrijpe dier karakteristieke histologische en morfologische bijzondere vormen heeft. Op deze wijze wordt het dier, voorafgaande aan de in traditionele zin opgevatte biologische puberteit, geschikt om voor de bevruchting in vitro geschikte eicellen aan te

maken.

VOORBEELD XIX

Stimulering van eierstokfunctie bij infantiele huiskatten met D-Phe⁶, Trp⁷, Leu⁸-GnRH

5 5 jonge katten met een leeftijd van 45 dagen, die elk een gewicht van ca. 0,3 kg hadden, werden met D-Phe⁶, Trp⁷, Leu⁸-GnRH behandeld. Vóór de behandeling werd de linker eierstok operatief verwijderd. Aan de dieren werd met tussenpozen van 2 dagen in totaal driemaal een dosis van telkens
10 100 µg in de vorm van met een fysiologische keukenzoutoplossing bereide oplossing intramusculair toegediend. Na beëindiging van de behandeling werd de overgebleven (rechter) eierstok door middel van operatie verwijderd, visueel gecontroleerd en vervolgens na fixering aan histologische onderzoeken
15 ken onderworpen.

Voorafgaande aan de behandeling waren de operatief verwijderde eierstokken volledig homogeen en hadden een botergele kleur, terwijl zich ontwikkelende follikels daarin noch visueel noch door histologisch onderzoek konden worden
20 waargenomen. Na de behandeling werden in de eierstokken 7-8 stuks corpora haemorrhagica en vele (niet telbare) zich in de ontwikkeling bevindende follikels gevonden.

Dit resultaat bevestigt de volgens voorbeeld XVIII verkregen bevindingen ook voor een ander hormoonanaloog volledig en verschaft verdere ervaringen omtrent de fysiologie
25 van de verdere cyclus van de eierstokken.

VOORBEELD XX

Stimulering van de primordiale follikels van infantiele vrouwelijke huiskatten (*Felis cattus domesticus*)

30 5 jonge katten met een leeftijd van 45 dagen, die elk een gewicht van ca. 0,3 kg hadden, werden met D-Phe⁶, Gln⁸-GnRH behandeld. Voorafgaande aan de behandeling werd onder narcose de linker eierstok operatief verwijderd. Vervolgens kregen de dieren gedurende 3 dagen dagelijks driemaal,
35 met tussenpozen van 4 uur, in totaal negenmaal telkens 0,1 µg werkzame stof, welke intramusculair werd toegediend in de vorm van een met een fysiologische keukenzoutoplossing en propyleenglycol bereide suspensie. Na beëindiging van de behandeling werd de overgebleven eierstok operatief verwijderd,

visueel gecontroleerd en na fixering aan histologische onderzoeken onderworpen. Visueel waren beide eierstokken homogeen en hadden een botergele kleur, terwijl de behandelde eierstok iets groter was. In de onbehandelde eierstokken konden
5 slechts primordiale follikels histologisch worden waargenomen, terwijl aan het snijvlak van de behandelde eierstokken een niet telbare hoeveelheid (meerdere honderdtallen) zich in een ontwikkeling bevindende, de verschillende stadia van antrumvorming tonende follikels werd geregistreerd.
10 Met deze werkwijze lukte het om meerdere honderdtallen primordiale follikels van de eierstok tegelijkertijd te stimuleren.

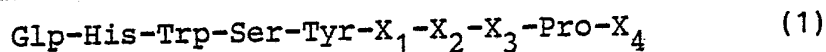
VOORBEELD XXI

Aanmaak van rundereicellen ten behoeve van het kwe-
15 ken van embryo's in vitro uit een orgaancultuur post mortem
Uit runderen werden 30-55 minuten nadat deze in een slachthuis waren verdoofd en vervolgens doodgebloed, de intacte eierstokken verwijderd en onder laboratoriumomstandigheden in een volledig adjuvans gelegd. Aan de voedingsvloei-
20 stof werd D-Phe⁶, Gln⁸, desGly¹⁰-GnRH-ethylamide toegevoegd in een concentratie van 10^{-9} tot 10^{-8} g/ml. De in de orgaancultuur bewaarde eierstokbestanden ovuleerden binnen 16-43 uur. Van de eicellen, die uit de eierstokken door in vitro spontaan plaatsvindende ovulaties en een aansluitende punctie
25 waren verkregen, was 85% in staat tot voortzetting van de meiose (de reductieve celdeling) en konden met krachtig rundersperma in vitro succesvol worden bevrucht. De eerste twee celdelingen van de in vitro bevruchte eicellen in de cultuur werden waargenomen.

30 Met deze werkwijze werd de mogelijkheid geschapen, net als bij de wereldwijd verbreide technologie van de inseminatie bij runderen, om onmiddellijk levende embryo's te "insemineren", d.w.z. te transplanteren. In de slachthuizen bestaat de mogelijkheid voor het aanmaken van een hoeveel-
35 heid embryo's welke de behoefte ver overtreft.

CONCLUSIES

1. Werkwijze voor het winnen van voor de natuurlijke en kunstmatige bevruchting geschikte geslachtsproducten van zoogdieren in het pré- en postnatale leven, in de infantiele leeftijd, in de voorpuberteit en in volgroeide toestand
- 5 (in het vervolg samengevat met media) door het regelen van de activiteit van hun geslachtsorganen, en verder eventueel voor het verwekken van nakomelingen uit deze geslachtsproducten en voor - betrokken op de voor die soort karakteristieke levensprestatie - verveelvoudiging van de voortbrenging van
- 10 geslachtsproducten, m e t h e t k e n m e r k , dat men de media tenminste eenmaal, ten hoogste echter 60 maal, bij voorkeur 1-5 maal met verbindingen met algemene formule 1



waarin

- 15 X_1 een glycyldgroep of een willekeurig natuurlijk of synthetisch D-aminozuurrest voorstelt,
- X_2 een L-aminozuurrest voorstelt, dat als zijketen een alkylgroep met 1-4 koolstofatomen, een fenyl- of tryptofylgroep bevat,
- 20 X_3 een L-aminozuurrest voorstelt met als zijketen een alkylgroep met 1-4 koolstofatomen of een alkanoylamidegroep met 2-4 koolstofatomen bevat en
- X_4 een glycyldamidegroep of alkylamidegroep met 1-4 koolstofatomen voorstelt,
- 25 in een hoeveelheid van 0,01-500 $\mu\text{g/kg}$ lichaamsgewicht, bij voorkeur 1-100 $\mu\text{g/kg}$ lichaamsgewicht, behandelt en tussen de afzonderlijke behandelingen pauzes inlast van tenminste 2 uur, ten hoogste echter 7 dagen, bij voorkeur 2-8 uur.

2. Werkwijze voor de bereiding van geneesmiddel-
- 30 preparaten die toepasbaar zijn in de diergeneeskunde voor de beïnvloeding van de geslachtsactiviteit van zoogdieren, m e t h e t k e n m e r k , dat men verbindingen met algemene formule (1), waarin de betekenissen van X_1 , X_2 , X_3 en X_4 dezelfde zijn als in conclusie 1 is gedefinieerd, met de in de ge-
- 35 neesmiddelbereiding gebruikelijke drager- en/of hulpstoffen vermengd en tot geneesmiddelpreparaten formuleert.

8601331

3. Diergeneeskundige preparaten, g e k e n m e r k t
d o o r een gehalte aan verbindingen met algemene formule (1)
volgens conclusie 1.

4. Toepassing van verbindingen met algemene formule
5 (1) volgens conclusie 1 voor de beïnvloeding van de geslachts-
activiteit van zoogdieren.