

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

204 703 B

(21) A bejelentés száma: 5861/87
(22) A bejelentés napja: 1987. 12. 18.
(30) Elsőbbségi adatok:
945 114 1986. 12. 22. US

(51) Int. Cl.⁵

A 61 K 31/565
A 61 K 37/43

(40) A közzététel napja: 1991. 08. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1992. 02. 28. SZKV 92/02

(72) Feltaláló:

Wagner, Jack Fredrick, Greenfield, Indiana (US)

(73) Szabadalmaz:

Eli Lilly and Co., Indianapolis, Indiana (US)

(54) **Eljárás szinergetikus hatású, állattenyésztésben alkalmazható
kompozíció előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás szinergetikus hatású, állattenyésztésben alkalmazható kompozíció előállítására az endogén növekedési hormon koncentrációjának növelésére emlős haszonállatok véráramában.

A találmány szerinti eljárás lényege, hogy egyidejűleg egy ösztrogén és egy növekedési hormont felszabadító faktor szinergista hatást kiváltó mennyiségeit 1:1–300 tömegarányban összekeverjük.

HU 204 703 B

Az állattenyésztés és a biokémia területére tartozó találmány tárgya eljárás szinergikus hatású készítmény előállítására az endogén növekedési hormon koncentrációjának növelésére használlatok véráramában.

A peptidkémia és a fehérjehormonok kutatásában jelenleg megfigyelhető robbanásszerű fejlődésnek fontos részét képezi a növekedési hormon kutatása. Tanulmányozva a különféle állatok növekedési hormonjának termelését, kiderült, hogy a növekedési hormont felszabadító faktorként ismert viszonylag kis peptid fontos szerepet játszik valamennyi vizsgált fajnál a növekedési hormon termelésében és kiválasztásában. Érdekes módon a növekedési hormont felszabadító endogén faktor (GRF=growth hormon releasing faktor) nagyon hasonló peptidnek bizonyult mindazoknál a fajoknál, melyeknél a faktor aminosavsorrendjét megállapították. Ez valamennyi megvizsgált faj esetében egy 43 vagy 44 aminosavból álló peptid, és a patkány kivételével valamennyi esetben a peptid C-terminálisa amidált. A különféle növekedési hormont felszabadító endogén faktorok aminosavsorrendje teljesen hasonló; a borjú faktora azonos a kecskefélék faktorával.

A találmányban használt szakkifejezéseket az alábbiak szerint értelmezzük. A „növekedési hormont felszabadító faktor” kifejezést széles értelemben használjuk, és ideértjük mindazokat a peptideket, melyek fokozzák a gazdasági emlősök növekedési hormonjának termelését és felszabadulását. A faktor „endogén” jelzője arra utal, hogy a faktor az állat által termelt természetes anyag. Szintetikusan vagy rekombinációs technikával előállított növekedési hormont felszabadító faktor előtt betű rövidítéssel jelöljük, hogy melyik faj faktort másoltuk le, például „h” jelentése: humán, „b” jelentése: borjú stb. Ha a faktor savalakban van, ezt külön jelezzük, különben amidált állapotban van. Az „analóg” kifejezést olyan peptidekkel kapcsolatban használjuk, melyek a faktorról azonosan működnek, de kevesebb vagy eltérő sorrendű aminosavból állnak, mint a növekedési hormont felszabadító endogén faktorok. Az endogén faktornál kevesebb aminosavat tartalmazó szintetikus faktorokat számmal jelöljük, például a „hGRF29” jelölés azt jelenti, hogy a faktor a humán endogén növekedési hormont felszabadító faktor első 29 aminosavából áll.

Az emlős gazdasági állatok a növekedési hormon szintjének emelése ma már bizonyítottan kedvező következményekkel jár. A legszembetűnőbb ilyen ismert hatás a tejelő tehenek tejtermelésének növekedése. A hormonszint emelésével fokozódik a növekedés sebessége és javul a tápanyag-hasznosítás, amint azt az irodalmi adatok bizonyítják. Vágómarhánál hasonló kedvező hatásról még nem számoltak be, de figyelembe kell vennünk, hogy a növekedési hormon és a növekedési hormont felszabadító faktor még nehezen beszerezhető és drága, és feltehetően a szarvasmarhánál nem végeztek még egyik anyaggal sem etetési kísérleteket. Néhány éve természetellenesen kisgyermekeknél fokozták a növekedést a növekedési hormon közvetlen bejuttatásával. Ez nagy kiadásokkal jár, mert nehéz a hormonhoz hozzájutni. Nincs még összehasonlításra

alkalmas mennyiségű vizsgálat az emlős használlatoknál alkalmazott növekedési hormonokra vonatkozólag.

A legalaposabban természetesen a humán növekedési hormont felszabadító faktort tanulmányozták. Úgy találták, hogy az endogén humán növekedési hormont felszabadító faktor erősen módosítható anélkül, hogy a növekedési hormon termelésére és kiválasztására kifejtett serkentő hatása csökkenne. Elkészítették a humán növekedési hormont felszabadító faktor 23–40 aminosavból álló analógjait, és úgy találták, hogy amidált és szabad sav állapotukban egyaránt aktívak. Különböző változásokat végeztek ez endogén peptiden, így például a peptid első aminosavját, a tirozint kicserélték hisztidinnel, 3-metil-hisztidinnel vagy N-acetil-tirozinnal. Ezek a származékok is hatásosak voltak.

A különböző fajok növekedési hormont felszabadító endogén faktorainak hasonlóságát ismerve, talán nem meglepő, hogy az egyik faj faktora egy másiknál is hatásos lehet. Kräft és munkatársai [Domestic animal Endocrinology 2: 133–139, (1985)] például kimutatták, hogy a humán endogén faktor és annak egy 40 aminosavból álló, szabad sav formában levő analógja (hGRF40 sav) aktív a patkányban, Rhesus majomban, nyúlban, juhban, szarvasmarhában és csirkében.

A növekedési hormont felszabadító faktor és a növekedési hormon termelése és kiválasztása közötti összefüggéseknek kiterjedt irodalma van. Az alábbi cikkek áttekintést és bevezetést adnak az említett témával kapcsolatban:

Ling és munkatársai, Ann. Rev. Biochem., 54: 403–23 (1985), Baird és munkatársai, Neuroendocrinology, 42: 273–76 (1986), Kensinger és munkatársai, Fed. Proc., 45: 280 (1986), Wehrenberg és munkatársai, Endocrinology 114: 1613–16 (1984).

Több esetben úgy találták, hogy ha ösztrogéneket juttattak az ember vagy állatok szervezetébe, az ugyancsak az endogén növekedési hormonok koncentrációjának növekedését eredményezte. Franz és munkatársai [J. Clin. Endocr., 25: 1470–80 (1965)] például megállapították, hogy ha normális koplatatott férfiaknak diétisztilbösztrolt adtak nagy dózisban, a növekedési hormon koncentrációjuk megemelkedett. Trenkle [J. An. Sci., 31: 389–93 (1970)] ökröknél figyelte meg a növekedési hormon koncentrációjának fokozódását, ha a szokásos étrendjüket fejenként napi 10 mg sztilbösztrolal egészítette ki.

Wiedemann és munkatársai etinil-ösztradiolt vagy „konjugált ösztrogéneket” adott be intravénásan normális férfiaknak [J. Clin. Endocr. and Metab., 42: 942–52 (1976)]. A szerzők a növekedési hormon szignifikáns emelkedését figyelték meg hat személy közül ötnél.

A fiziológusok ezért általában egyetértenek abban, hogy ösztrogének bevitelével megemeli a növekedési hormon koncentrációját, vagy a hormon koncentrációjának növekedése irányába hat.

A találmány tárgya szinergista hatáson alapuló készítmény előállítása az endogén növekedési hormon koncentrációjának megemelésére emlős használlatok

véreben oly módon, hogy az állatoknak egy ösztrogént és növekedési hormont felszabadító faktort adunk be egyidejűleg, szinergista hatást kiváltó mennyiségekben.

A találmány szerinti eljárás szignifikáns javulást jelent, minthogy a szinergista hatás a kezelt állatokban azt eredményezi, hogy a vártnál lényegesen nagyobb mennyiségben termelődik és választódik ki a növekedési hormon.

A találmányt általában emlős haszonállatoknál, mindenekelelt teheneknél hasznosíthatjuk. A borjak vagy szarvasmarhák alkotják a találmány szempontjából legelőnyösebb állatok csoportját. A szarvasmarhák mellett a sertések ugyancsak előnyös állatoknak számítanak. A sorrendben a harmadik előnyös csoportot képezik a szarvasmarhák és sertések után a juhok. A találmány felhasználható más gazdasági állatoknál is, ideértve a kecskét, tevé, lovat és hasonlókat, de ezeknél az állatoknál való alkalmazása kevesebb közvetlen jelentőséggel bír.

Mint a fentiekben utaltunk már rá, az egyik fajból származó növekedési hormont felszabadító faktor egy másik fajban is növeli a növekedési hormon koncentrációját. Ennek értelmében a találmány gyakorlati alkalmazásánál nem szükséges ugyanabból a fajból származó hormont felszabadító faktort alkalmaznunk, mint amilyen fajt kezelni kívánunk. Noha előnyös ugyanazon faj faktorát felhasználni – például adott birkáknak valamelyik más juhféle növekedési faktort felszabadító faktorát beadni, de a találmány szerinti kedvező hatást elérhetjük akkor is, ha bármelyik emlősállat vagy az ember hormont felszabadító faktorát juttatjuk be bármelyik gazdasági emlősállatba. Így például gazdasági vagy kényelmi szempontokból kiindulva, a humán növekedési hormont felszabadító faktort beadhatjuk sertéseknek, juhoknak vagy szarvasmarháknak, a borjúút juhoknak vagy sertéseknek, a sertésfélékét szarvasmarháknak vagy juhoknak stb., azzal a biztos tudattal, hogy a találmányban ismertetett kedvező hatás megnyilvánul.

Természetesen használhatunk állati szervezetből nyert növekedési hormont felszabadító faktort is, de gyakorlati szempontból sokkal előnyösebb azt szintetikus vagy rekombinációs technikával előállítani. Ma már megszokottak mind a szintetikus úton, mind a rekombinációs technikával előállított peptidek. A növekedési hormont felszabadító faktornak is számos típusát előállították már ily módon. Lásd e tárgyban a 4 585 756 és a 4 605 643 számú USA szabadalmak irodalmi összeállítását.

Kimutatták, hogy nemcsak a teljes növekedési hormont felszabadító faktor, hanem annak több analógja is hatásos a növekedési hormon termelése és felszabadítása szempontjából. Így például elkészítették a humán faktor 23., 27., 29., 30., 31., 34., 37. és 40. aminosavból álló analógjait, és hatékonyak találták őket. Az első 29 aminosav tűnik azonban a legaktívabbnak. Kimutatták továbbá, hogy mind az amidált, mind a szabadsav állapotban levő analógok és teljes faktorok hatásosak.

Ezek szerint általánosságban megállapíthatjuk, hogy

az inakt növekedési hormont felszabadító faktor és annak analógjai, mind amidált, mind szabadsav állapotokban fokozzák a homológ vagy más fajokban a növekedési hormon koncentrációját. A találmányban használt „növekedési hormont felszabadító faktor” kifejezés tehát magába foglalja valamennyi emlős növekedési hormont felszabadító faktort, ezeknek valamennyi hatékony analógját, mind az amidált, mind a szabadsav formájában. A szakemberek előtt ismert, hogyan lehet felismerni a hatásos analógokat, és hogyan állapítható meg egy adott faktortípusnál az a dózis, mellyel egy adott fajnál az optimális eredményt érhetjük el.

Noha a találmány szerint bármelyik ösztrogén anyag felhasználható, az eredményesség szempontjából csak azok az ösztrogének kerülhetnek ténylegesen alkalmazásra, melyeket a táplálékként hasznosított állatoknak beadhatunk. A fiziológusok általánosan elfogadott szóhasználata szerint, ösztrogéneknek tekintjük azokat az anyagokat, melyek egy normális nőivarú állatnak beadva, a méh és az emlők növekedését okozzák. Sok ilyen anyag ismert – főképpen szteroidok – és ezek hatékonyak a találmány szempontjából. Az ösztrogének összehasonlító vizsgálatára lásd: Applezweig, „Steroid Drugs, McGraw-Hill, 1. (1962) és 2. (1964) kötet.

A gyakorlatban azonban a tápanyagként hasznosított állatoknál a számba jöhető ösztrogének: az ösztron, ösztradiol, zeranól, valamint ezek észterszármazékai. Alkalmazható ösztrogéneknek tekintjük az ösztradiol és zeranól egy vagy mindkét hidroxilcsoportján, vagy az ösztron egyetlen hidroxilcsoportján észterezett egyszerű észtereket, mint amilyenek az 1-6 szénatomszámú alkanoátok vagy a benzoátok. A legelőnyösebb jellemző ösztrogének a zeranól, ösztradiol, ösztradiol-benzoát és az ösztradiol-dipropionát.

A találmány lényege: egy ösztrogén és egy növekedési hormont felszabadító faktor egyidejű bejuttatása a szervezetbe.

Így például előnyös a folyamatos bejuttatás, olyan adagolási állapotot vagy eszközt használva, melynél a hatóanyagok szinte molekuláról molekulára jutnak be a szervezetbe.

Az egyidejű bejuttatást azonban többféle más módon is megoldhatjuk. A hatóanyagokat beadhatjuk lökésszerűen, például ozmotikus vagy mechanikus pumpával, mely előre meghatározott időközönként adott mennyiségű hatóanyagot bocsát ki. A növekedési hormont felszabadító faktor lökésszerű adagolása valóban előnyös, minthogy kimutatták, hogy a növekedési hormon elválasztása epizodikus, és ebből következően a faktor lökésszerű bejuttatása hatásosabb a folyamatosnál. A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja: az ösztrogén folyamatos bejuttatása, például beültetett szilikonpolimerből és a hormont felszabadító faktor lökésszerű bejuttatása. A találmány értelmében az ilyen bejuttatási mód egyidejű, minthogy mindkét hatóanyag egyidejűleg jelen van az állat szervezetében akkor, amikor a receptorszervek készek, hogy reagáljanak rájuk.

Amikor a növekedési hormont felszabadító faktort lö-

késszerűen juttatjuk be, az egyes bejuttatási eseményeknek olyan gyakorisággal kell követniük egymást, hogy a növekedési hormon felszabadulása a normálisnál nagyobb gyakorisággal történjen. A bejuttatás gyakorisága fajonként változó, általában azonban napi 8–24, még előnyösebben 12–24 lökészerű faktorbejuttatást jelent. Figyelemmel kell lennünk arra, hogy a növekedési hormon kiválasztása az állat nemének és állapotának is függvénye, és bizonyos körülmények között a növekedési hormont felszabadító faktor lökészerű bejuttatásának gyakorisága eltérhet a fent megállapítottól.

Az ösztrogén és a hormont felszabadító faktor adagolásának időtartamát gazdasági szempontok határozzák meg. Ez azt jelenti, hogy annyi ideig alkalmazzuk a kezelést, ami elég ahhoz, hogy a megnövekedett növekedési hormon-szint gazdasági szempontból kedvező hatása megnyilvánuljon. A kezelés előnyösen az állatok egy adott életszakaszára esik, például a tejelő szarvasmarháknál legelőnyösebben a tejelválasztás időszakára; a húsmarháknál és a borjaknál a növekedés vagy a hizlalás befejező idejére.

A találmány szerint a kezelés legelőnyösebb időtartama legalább 90 nap. Előnyös lehet a 30 napos kezelés is, minthogy úgy hisszük ez a periódus még elég hosszú ahhoz, hogy a megnövekedett növekedési hormonkoncentráció kifejthesse hatását, és gazdasági előnyei a kezelt állatoknál megnyilvánuljanak. Ahhoz, hogy bármiféle kedvező eredményt kapjunk, úgy véljük, legalább egy 14 napos kezelésre szükség van.

A találmány szerinti kezelés kívánt hatását abban látjuk, hogy megnő a kezelt állatok vérében a növekedési hormon koncentrációja. A növekedési hormon ugyanis a szervezetben addig nem fejt ki hatását, amíg az öt termelő mirigyből ki nem választódik és nem jut a véráramba. A kezelés kívánt hatását tehát nem annyira a növekedési hormon megnövekedett mennyiségű termelésében, hanem a véráramban jelentkező megemelkedett hormonszintben kell látnunk.

A növekedési hormont felszabadító faktor és az ösztrogén bejuttatásának a módja különféle lehet. Természetesen a hormont felszabadító faktort parenterálisan kell bevinni, mert szájon keresztül történő beadásnál nem szívódik fel. Az ösztrogént adhatjuk orálisan is, ha kell, de ez esetben sokkal nagyobb dózisra van szükség, mint parenterális adagolásnál, vagyis az ösztrogén esetében is előnyös a parenterális módot választani. Orális ösztrogén beadás történhet a szokásos módokon, azaz a táplálékba keveréssel, bólusz alakjában, tablettaként vagy folyadékként stb.

Mindkét hatóanyag megfelelő térfogatra hígítható, és intravénásan, intramuszkulárisan vagy szubkután befecskendezhető mechanikus pumpával. E pumpák, melyek alkalmazására az alábbiakban a példákban kitérünk, különböző típusúak lehetnek. Valamennyinél az állat testének alkalmas helyén időlegesen rögzített tű szerepel. Ugyanazt az eredményt érhetjük el az állatok bőre alá időlegesen beültetett pumpákkal is, melyek működtethetők elemmel vagy kémiai folyamatokkal.

A két hatóanyagot bejuttathatjuk ugyanazzal a készítménnyel vagy eszközzel.

A peptidet olaj-viasz keverékben tartalmazó készítményből a növekedési hormont felszabadító faktor előnyösen csak lassan szabadul fel. Évekkel ezelőtt hasonló készítményt alkalmazott a 2 493 202 számú USA szabadalom a penicillin bevitelére. Davis és munkatársai [J. Dairy Sci., 66: 1980–82 (1983)] olaj-viasz készítményt használnak a növekedési hormonnak juhokban történő bejuttatására. Ezek a készítmények általában 5–10% viaszt tartalmaznak valamilyen növényi olajban. Alkalmas viasz a karnaubaviasz, a méhviasz stb. legáltalánosabban használt olaj a földimogyoró- vagy szezámolaj. A növekedési hormont felszabadító faktor koncentrációja a készítményben és a befecskendező készítmény mennyisége természetesen a napi igényelt dózishoz könnyen kiszámítható.

Az ösztrogének nagyon alkalmasan bejuttathatók beültetett szilikon-polimer eszközökből. Lásd például a 4 191 741 számú USA szabadalmat, mely egy különösen alkalmas eszközt alkalmaz az ösztradiol bejuttatására.

Mindkét hatóanyag bejuttatható mikrokapszulákkal. A gyógyszerek és egyéb anyagok mikrokapszulákban való bejuttatását már több éve kutatják. Erre az alábbiakban néhány irodalmi hivatkozást adunk meg.

Goosen és munkatársai élő szöveteket vagy sejteket zárt mikrokapszulákba a beültetéshez. A használt kapszulákat féligáteresztő membránból készítették el. Előnyösek az alginátok; lásd: 4 487 758 USA szabadalom. Hasonló hatást érnek el a Damon Corporation szabadalmai: 4 352 883 és 4 409 331 számú USA szabadalmak.

Polilaktol- és poliglükolsavakat használ a mikrokapszulákhoz a 4 479 911 számú USA szabadalom és a PCT Publication 83/03061.

A mikrokapszulák elkészítésére talán a legszélesebb körben a cellulózésztereket – például cellulóz-acetátot és cellulóz-butírat – használják; lásd például a 3 954 678, a 3 859 228 számú USA, és az 1 297 476 számú brit szabadalmakat.

Újabban peptidok bevitelére diffúzió által működtetett, beültetett eszközöket használnak, amik alkalmasak lehetnek a növekedési hormont felszabadító faktor bejuttatására is. A 4 452 775 számú USA szabadalom olyan mátrixot ír le, mely koleszterinből és megfelelő kötő- és síkosítóanyagból áll; a 4 526 938 számú USA szabadalomban egy hidrogélt képző polimerről találunk kitanítást. Ezeket a polimereket az említett szabadalmak szerint elkészíthetjük, és a növekedési hormont felszabadító faktortal együtt alkalmazva ismert módon olyan készítményeket állíthatunk elő, hogy azokkal a kezelendő állatokban a faktor kívánt dózistartományát beállíthatjuk.

Mindkét hatóanyagot bevihetjük továbbá ozmotikus módon működő pumpákkal is. Az ilyen készülékek elkészítéséhez főként az Alza Corporationt említhetjük. Az ozmózissal működő pumpákban a hatóanyagot tartalmazó tartályt féligáteresztő hártya választja el a szervezettől, és ez szabályozza a hatóanyag kijutási sebességét.

A találmány szerinti hatóanyagoknak különösen előnyös és alkalmas beviteli módja az, ahol a hatóanyagok

bevitele különálló eszközökből történik. Ennél az eljárásnál az ösztrogént egy beépített eszközből adagoljuk, ami az eszköz élettartama alatt lényegében folyamatosan juttatja az ösztrogén kívánt dózisát a szervezetbe. Erre különösen alkalmas egy szilikon-polimer eszköz. A növekedési hormont felszabadító faktort viszont egy beültetett pumpa segítségével vagy injektálható dózis alakjában, például olaj-viasz készítményként vagy polimerizált mátrix formájában juttathatjuk be. A növekedési hormont felszabadító faktor adagolása lehet folyamatos vagy, ahogy fentebb tárgyaltuk, epizodikus. Amikor a faktort beültetett mechanikai pumpával juttatjuk be, az epizodikus adagolás könnyen elérhető beprogramozott pumpával, ami kívánt időközök eltelével adagol.

A növekedési hormon szintjének találmány szerinti növekedését úgy érzük el, hogy az ösztrogén és a hormont felszabadító faktor olyan mennyiségeit juttatjuk az állatba, melyek szinergista hatásuk révén fejtik ki hatásukat a hormonszintre. Ezek a mennyiségek tehát együttesen nagyobb növekedést okoznak a hormonszintben, mintha külön-külön alkalmaznánk őket. A növekedési hormont felszabadító faktor hatásos mennyisége juhoknál, kecskéknél és sertéseknél általában 0,5–3 mg, szarvasmarháknál 3–12 mg naponta. A találmányban napi dózisoról vagy dózistartományról beszélünk, de ezt természetesen folyamatosan vagy lökésszerűen adagokban juttatjuk be a 24 óra alatt.

Juhoknál, kecskéknél és sertéseknél az előnyös adag napi 1–2 mg hormont felszabadító anyag, míg szarvasmarháknál ez a mennyiség 4–8 mg naponta. Szakemberek előtt nyilvánvaló, hogy a növekedési hormont felszabadító faktor kutatása még intenzíven folyik és hatásosabb analógok is felfedezhetők. Ezekből a hatásosabb analógokból természetesen az itt ismertetettéknél kisebb dózismennyiségekre lesz szükség. A legoptimálisabb dózis függ az állat méreteitől, egészségi és tápláltsági állapotától, a bejuttatás folyamatos vagy epizodikus módjától, a növekedés vagy tejtermelés kívánt fokozásától, az alkalmazott növekedési hormont serkentő faktor minőségétől. Egyszerű kísérletekkel meghatározhatjuk a faktor adagolási sebességét, és azt a napi optimális dózist, mellyel a legjobb szinergista hatás elérhető.

Az ösztrogénből szarvasmarháknál naponta általában 10–500 µg-ot, sertéseknél, juhoknál és kecskéknél 3–150 µg-ot alkalmazunk. Előnyös dózis szarvasmarháknál a napi 10–100 µg, sertéseknél, juhoknál és kecskéknél a napi 3–35 µg. Még előnyösebb szarvasmarháknál naponta 50–100 µg-ot, sertéseknél, kecskéknél és juhoknál 15–35 µg-ot adagolni. Az ösztrogénből előnyös ugyanazt a mennyiséget használni, amennyit általában használunk, ha anabolikumként alkalmazzuk.

A szakemberek előtt nyilvánvaló, hogy a növekedési hormont felszabadító faktor és az ösztrogén optimális dózisát egy adott állatcsoportnál a tartási körülmények között kísérletileg kell megállapítani az állattenyésztésben ismert alapvető vizsgálati eljárások segítségével.

Az elmondottak bővebb szemléltetésére az alábbiakban példákat adunk meg. A példák kizárólag szemléltető célzatúak, így a találmány oltalmi körét nem korlátozzák.

1. példa

Körülbelül 32 kg súlyú ürüket anyagcsere-vizsgáló ketrecben koplaltatunk 7 napon át a kísérlet megkezdése előtt. Az állatok felébe 25 nappal a kísérlet megkezdése előtt ösztradiolt tartalmazó szilikon-polimer eszközt ültetünk be, melyből a kísérleti periódus alatt naponta kb. 25 µg ösztradiol szabadul fel. A kezelést megelőzően két nappal mindegyik állat mindegyik jugularis vénájába beültetünk egy Silastic (Dow Corning Corporation) kanült. Egy-egy kísérleti csoport négy állatból áll, ezek közül kettőbe van, kettőbe nincs beültetve ösztradiolt tartalmazó eszköz. Három kísérleti csoport van: az egyik napi 1,5 mg, a másik napi 0,33 mg növekedési hormont felszabadító faktort kap, a harmadik a kontrollcsoport. A kezeléshez használt humán növekedési hormont felszabadító faktort Merrell és munkatársainak szilárd fázisos szintetikus módszerével [Biochemistry, 20: 5020 (1982)] állítottuk elő.

A faktort az egyik kanülon keresztül infuzáljuk 5 napon át folyamatosan egy Harvard perisztaltikus pumpával. A faktort fiziológias sóoldatban hígítjuk annyira, hogy az infuzátumból 0,5 millilitert kelljen bevinni percenként.

Az infúzió megkezdése előtti naptól a befejezés utáni első négy napig hat vérmintát veszünk minden állattól. Az állatoknak napi kétszer egy óra áll rendelkezésükre a táplálkozásra, mely idő alatt tetszés szerinti mennyiségű táplálékot fogyaszthatnak el. Az etetések között 12 óra van. Két vérmintát veszünk az etetések előtti egyórás időtartam alatt és egy mintát az egyes etetések befejeztekor. További vérmintákat veszünk egy órával az infúzió megkezdése előtt, a megkezdésekor, 10 perccel és 60 perccel a megkezdése után, illetve az infúzió befejezése után 10, 20, 30 és 60 perccel.

A vérmintából elválasztjuk a plazmát a többi alkotórésztől, és a szokásos radioimmunológiai eljárással meghatározzuk benne a növekedési hormon koncentrációját.

Az I. táblázatban összefoglaltuk a kapott eredményeket, az egyes időkben kapott adatok átlagát feltüntetve. „+”-jellel jelöltük azokat az adatokat, ahol az állatokba ösztradiolt tartalmazó eszközt ültettünk be.

(Táblázat a következő oldalon)

I. táblázat

hGRF-kezelés mg/nap	Ösztradiol	Előkezelés	Plazma növekedési hormon konc. ng/ml					utókezelés
			infúziós periódus (nap)					
			1	2	3	4	5	
kontroll	+	2,8	3,3	4,3	2,9	5,2	4,2	2,4
	–	9,8	10,7	12,8	11,9	9,9	5,8	9,3
0,33	+	5,2	8,9	6,9	7,3	5,7	8,5	5,5
	–	5,3	8,1	10,3	11,6	7,9	8,0	3,5
1,50	+	6,2	30,4	36,3	48,9	48,5	62,2	13,3
	–	9,2	20,4	30,0	29,6	24,8	25,0	6,9

2. példa

A kísérletet lényegében az 1. példa kísérlet felállításában végezzük el. A vizsgálatokban humán növekedési hormont felszabadító faktor analógját használjuk, melyben a 27. helyen levő metionin helyett szerin van. A faktort rekombinációs eljárással állítottuk elő. Négy kísérleti csoport van: a naponta 0,75, 1,5 és 3,0 mg faktorról kezelt állatok, illetve a kontrollcsoport. Mindegyik kísérleti csoportban négy bárány van, ezek közül kettőbe az 1. példában leírtak szerint ösztadiolos készüléket ültetünk be.

A faktort szubkután infuzáljuk egy Silastic kanülön keresztül IVAC modell 630 pumpa (IVAC Corporation, San Diego, USA) segítségével. A növekedési hormont felszabadító faktort fiziológiás sóoldattal úgy hígítjuk meg, hogy minden állatba 48 ml infuzátumot kelljen adni naponta.

Az 1. példában leírtak szerint minden állatból vérmintát veszünk és analizáljuk. A nyert eredményeket hasonlóan az 1. példa eredményeihez a II. táblázatban foglaltuk össze.

II. táblázat

hGRF-kezelés mg/nap	Ösztadiol	Előkezelés	Plazma növekedési hormon konc. ng/ml					utókezelés
			infúziós periódus (nap)					
			1	2	3	4	5	
kontroll	+	11,6	5,9	10,0	6,2	10,2	8,8	8,7
	–	3,2	5,6	9,2	7,9	7,2	9,9	5,3
0,75	+	5,8	14,0	11,4	20,6	18,4	25,4	8,3
	–	7,0	11,6	10,0	12,4	16,2	10,3	4,1
1,50	+	10,4	23,4	26,5	25,1	28,1	27,8	8,4
	–	10,8	15,2	20,4	15,5	19,2	19,4	4,2
3,00	+	8,6	27,0	23,2	25,2	31,8	37,2	10,7
	–	7,2	15,0	17,4	27,6	28,4	30,0	8,2

3. példa

A kísérletet lényegében az 1. példa alapján végeztük, 1,5 mg/nap növekedési hormont felszabadító faktort adagolva.

A kísérletben állatonként és naponta 4-4 vérmintát vettünk, 9 napon át. A kapott hormonszintek az alábbiak:

Ösztadiol és GRF hatása a külön-külön és kombinációban a plazma növekedési hormon koncentrációja ürökben (egyedi eredmények – 9 nap)

Kezelés	Állat száma	Plazma növekedési hormon ng/ml	Átlagérték ng/ml
kontroll	404	7,3	
	434	2,2	
	444	4,8	
	471	5,7	5,0

Kezelés	Állat száma	Plazma növekedési hormon ng/ml	Átlagérték ng/ml
ösztadiol	413	14,1	
	454	11,3	
	464	10,0	
	406	23,5	14,8
GRF	427	96,6	
	428	25,3	
	436	37,9	
	438	28,6	47,1
ösztadiol + GRF	405	70,0	
	415	94,9	
	463	61,7	
	492	31,8	64,6

Az eredményeket a 3. naptól analizáltuk a kísérlet végéig. A plazma GH átlagos koncentrációját a II. táblázat mutatja.

Ösztadiol és GRF hatása a külön-külön és kombinációban a plazma növekedési hormon koncentrációja ürökben (A kezelés utolsó 7 napjának átlaga)

Kezelés	Állatok száma*	Plazma GH ng/ml**
kontroll	4	5,3
ösztadiol	3	11,7
GRF	3	32,4
ösztadiol + GRF	4	70,7
	átlagos hatás	valószínűség
	ösztadiol	0,02
	GRF	0,0005
	kombináció	0,08

* A 406 és 427 sz. állatokat eltávolítottuk a kezelésből

** A GH-mérés standard hibája 7,8–9,0 volt.

Az ösztadiol és GRF hatása szignifikáns volt ($P = 0,02$, illetve $0,0005$). A szinergetikus hatást ($P = 0,08$ egyértelműen megállapítottuk; az ösztadiol és GRF együttes hatása lényegesen felülmúlja az additív hatást.

25

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás szinergetikus hatású, állattenyésztésben alkalmazható kompozíció előállítására az endogén növekedési hormon koncentrációjának növelésére emlős haszonállatok véráramában, *azzal jellemezve*, hogy egyidejűleg egy ösztrogén és egy növekedési hormont felszabadító faktor szinergista hatást kiváltó mennyiségeit 1:1–300 tömegarányban összekeverjük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a növekedési hormont felszabadító faktorként borjú növekedési hormont felszabadító faktort alkalmazunk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az ösztrogénként ösztadiolt, vagy annak 1–6 szénatomszámú alkanoátját vagy benzoátját alkalmazzuk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a növekedési hormont felszabadító faktorként a sertésfélék növekedési hormont felszabadító faktort alkalmazzuk.