



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

80593

C (15) Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen 10 07 1990

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

A 61K 35/48, 35/55, 37/22, C 07G 17/00

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	853664
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	24.09.85
(24) Alkuperäisyys - Löpdag	12.02.85
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	24.09.85
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.03.90
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	SE85/00070
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
13.02.84 SE 8400752	

(71) Hakija - Sökande

1. Hellgren, Lars, Bronsgjutaregatan 13, Västra Frölunda, Sverige, (SE)
2. Mylius, Erling A., Ragnhildsgatan 11, Trondheim, Norge, (NO)
3. Vincent, Jan, Linnegatan 31, Stockholm, Sverige, (SE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Hellgren, Lars, Bronsgjutaregatan 13, Västra Frölunda, Sverige, (SE)
2. Mylius, Erling A., Ragnhildsgatan 11, Trondheim, Norge, (NO)
3. Vincent, Jan, Linnegatan 31, Stockholm, Sverige, (SE)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä erektiota ja fertiliteettiä edistävän valmisteiden valmistamiseksi
Förfarande för framställning av ett preparat för befrämjande av erektion och fertilitet

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

DE C 670599 (30 h 7), SE C 309648 (A 61 K 17/00),
Biology of Reproduction vol. 3 (1970) nro 3, p. 347-352

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tämä keksintö koskee erektiota ja fertiliteettiä edistävää ainetta, joka sisältää aktiivisena aineosanaan sellaisia Cowperin ja/tai Bartholinin rauhasista peräisin olevia lipidifraktioita kuin ne, jotka saapuvat hyppytöiden paksuudesta. Keksintö koskee myös menetelmää tämän aineen tuottamiseksi ja sen käyttöä erektiota ja fertiliteettiä edistävissä koostumuksissa.

Uppfinningen avser ett erektions- och fertilitetsbefrämjande medel, vilket som aktiv ingrediens innehåller sådana från Cowpers och/eller Bartholins körtlar deriverade lipidfraktioner som de, vilka sammansätter tjocktarmen hos hopprättor. Uppfinningen avser även ett förfarande för framställning av medlet och dess användning i erektions- och fertilitetsbefrämjande kompositioner.

Menetelmä erektiota ja fertiliteettiä edistävän valmiste-
teen valmistamiseksi

Tämä keksintö koskee menetelmää mainitun aineen
5 tuottamiseksi, jota on eristetty miesten ja urosnisäkkäi-
den Cowperin rauhasista ja vastaavista elimistä; naisten
ja naarasnisäkkäiden suurista eteisrauhasista, Bartholi-
nin rauhasista, joista tästedes käytetään nimitystä rau-
haset.

10 Rauhasista saatavilla lipidiuutteilla on havaittu
olevan ominaisuuksia, jotka antavat aiheen hyvin perus-
tellusti odottaa, että nämä aineet edistävät erektiota,
ejakulaatiota, itiöiden liikkuvuutta ja niiden kykyä tun-
keutua proteiiniin ja naaraiden suvunjatkamiseliimiin. Tä-
15 mä aine voi siten olla aktiivisena aineosana tällä indi-
kaatiolla käytettävissä farmaseuttisissa koostumuksissa.

Miesten ja urosnisäkkäiden rauhasia kutsutaan Cow-
perin rauhasiksi (myös bulbo-uretaalisiksi rauhasiksi),
ne koostuvat symmetrisestä parista rakkulakoostumusrauha-
20 sia, joilla on mainittu konsistenssi ja jotka ovat har-
mahtavan keltaisia tai hieman ruskeita väriltään ja ta-
vallisen herneen tai salkopavun kokoisia. Niiden erityis-
kanava on pituudeltaan korkeintaan 4 cm ja avautuu virt-
saputkeen välittömästi sen kohdan lähellä, jossa virtsa-
25 putki avautuu peniksen paisuvaan.

Naisten ja naarasnisäkkäiden vastaavia rauhasia
kutsutaan Bartholinin rauhasiksi ja ne koostuvat kahdesta
harmahtavan keltaisesta, pyöreästä tai soikeasta rauha-
sesta, joka on tavallisen herneen tai salkopavun kokoinen
30 ja sijaitsevat emättimen suuaukon selänpuoleisella sivul-
la. Erityskanava on 1,5 - 2 cm:n pituinen ja avautuu
emättimen aukkoon. Ne vastaavat suoraan urosten Cowperin
rauhasia. Näiden rauhasien funktiota ei täysin tunneta.
Urosten Cowperin rauhasista tiedetään, että rauhasien
35 eritteen kokonaisuute koaguloi siemennestettä. Tällöin
muodostuu limahyytymä, joka estää siemennesteen takaisin-

virtauksen ejakulaation jälkeen. R.G. Hart, The mechanism of Cowper's secretion in coagulating cat semen, J. Reprod. Fert. 17 (1968) 223-226. J.J. Gueze ja J.W. Slot, Synthesis and secretion of glycoproteins in rat bulbourethral (Cowper's) glands, Biology of reproduction 15 (1976) 118-125.

Näistä rauhasista peräisin olevien lipidifraktioiden biologista vaikutusta ei ole aiemmin tutkittu. Siten tällä keksinnöllä, joka koskee lipidifraktioiden potenssivaikutusta urogeenitaalialueen eri osiin, on suuri merkitys näiden rauhasen toiminnan määrittämiselle. Miehil-
10 tä ja naisilta, häriltä, karjuilta, pässeiltä, lampailta ja lehmiltä otetuista näistä rauhasista saatuja lipidifraktioita on tutkittu ja niillä on farmakologissa ko-
15 keissa havaittu olevan suurin piirtein samanlaiset ominaisuudet kuin edellä esitettiin.

Tämän keksinnön tekijät ovat nyt yllättävästi löytäneet edellä mainituista lajeista peräisin olevien rauhasen lipidifraktiosta tekijän, joka näyttää vaikuttavan
20 sekä erektioon että ejakulaatioon samoin kuin itiöiden liikkuvuuteen ja niiden kykyyn tunkeutua proteiiniin ihmisissä ja eläimissä. Tämä tekijä näyttäisi olevan tehokas peptidilipidivälittäjäaine, joka on prostaglandiini/leukotrieenin kaltaista tyyppiä.

25 Tämä keksintö koskee menetelmää valmisteiden valmistamiseksi, joka koostuu ihmisten ja eläinten rauhasista saaduista lipidifraktioista, kuten hyppyrota paksusuolta supistavista fraktioista. Prostaglandiinit ja niiden kanssa samankaltaiset aineet supistavat hyppyrota paksusuolta ja siitä syystä hyppyrota paksusuolen supistumista
30 käytetään tällaisten aineiden biologisen aktiivisuuden arvosteluperusteena. Tähän liittyvä testi tehdään seuraavasti: Hyppyrotalta poistetun paksusuolen ylempi osa ripustetaan tavanomaiseen suolihauteeseen siten, että alempi kiinnitys on kiinteä kun taas ylempi kiinnityskohta on
35 kytketty tuntoelimeen, joka rekisteröi suolen supistumi-

sen ja relaksaation erilaisten aineiden vaikutuksen alaisena.

Koska nämä aineet supistavat hyppyyrotan paksusuolta, on olemassa hyvät perusteet otaksua, että ne sisältävät prostaglandiinin kaltaisia aineita. Rauhasista saatujen niiden lipidifraktioiden, jotka supistavat hyppyyrotan paksusuolta ja ovat keksinnön mukaisia aineita, ei ole kuitenkaan osoitettu sisältävän mitään tunnettuja prostaglandiineja (vrt. esimerkki ja kuviot 2, 3, 4 ja 5, joista havaitaan, että ei ole ollut mahdollista osoittaa prostaglandiineja PGI_2 , PGE_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ ja PGA_2 rauhasista saaduissa hyppyyrotan paksusuolta supistavissa lipidifraktioissa tunnettuja menetelmiä käyttämällä). Hyppyyrotan paksusuolen supistuksia voidaan siten käyttää arvosteluperusteena sille, että keksinnön mukaista tekijää, jolla on hedelmällisyyttä edistäviä ominaisuuksia, on läsnä rauhasista saadussa lipidiuutteessa.

Tekijä reagoi positiivisesti ninhydriinin kanssa, mikä osoittaa sen sisältävän aminoryhmiä. Kokeet, joissa käytettiin dispersiivistä röntgenanalyysiä (KEVEX), osoittavat rikin (S) läsnäolon tekijässä. Nämä kaksi seikkaa - positiivinen ninhydriinireaktio ja rikin läsnäolo - viittaavat siihen, että tämän tekijän ja leukotrieenien välillä on yhtäläisyyksiä. Leukotrieenit eivät kuitenkaan supista hyppyyrotan paksusuolta. Toisaalta ne supistavat voimakkaasti kohdun lihaksistoa, kuten myös keksinnön mukainen aine.

Kaasukromatografia-massaspektrometria-analyysi osoittaa monimutkaisen seoksen, jossa tietyt fragmentit kuitenkin viittaavat hermojen välittäjäaineiden kaltaisiin aineisiin, joiden molekyyllipaino on 200 - 1 000 m/e.

Fraktion, jolla on korkea biologinen aktiivisuus, NMR (ydinmagneettinen resonanssi) on osoittanut kaikki prostaglandiinin kaltaisten aineiden ominaispiirteet, kuten pitkä molekyyliketju, rasvahappojen läsnäolo ja terminaalinen $-\text{CH}_3$ -ryhmä.

Keksinnön mukaiseen menetelmään sisältyy prostaglandiinin uuttaminen ja erottaminen tavanomaisin menetelmin. Niinpä rauhasista voidaan ensin poistaa proteiinit, ts. tehdä etanoliuutto ja jäännös voidaan sitten uuttaa happamassa pH:ssa dietyylieetterillä, joka liuottaa lipidit. Rauhaset voidaan uuttaa myös suoraan happamissa olosuhteissa yhden tai useamman kerran liuottimella, erityisesti lipidiliuottimella, kuten etyyliasetaatilla, isopropanolilla, metanolilla, asetonilla, kloroformilla tai niiden seoksella, kuten kloroformin ja metanolin seoksella tilavuussuhteessa 2:1 ja etyyliasetaatin seoksella isopropanolin, metanolin tai asetonin, joka sisältää vaihtelevan tilavuusosuuden vettä tai edellä mainittujen lipidiliuottimien kanssa, edullisesti metanolilla tai etyyliasetaatin ja metanolin seoksella tilavuussuhteessa 3:1 ja säätää pH puskurin avulla arvoon 3,5 - 5, edullisesti 4,5, 0,1 M KH-ftalaatilla. Sitten poistetaan vesi tavanomaisesti, esimerkiksi kylmäkuivauksella. Uutteen voidaan myös antaa seistä yön yli pakastimessa lämpötilassa alle 0°C ja poistaa muodostuneet jääki-
teet suodattamalla matalassa lämpötilassa, alle 0°C:ssa. Työ on edullista tehdä typpiatmosfäärissä tuotteen suo-
jaamiseksi ilman hapen hapetusvaikutuksilta. Sitten näyte mahdollisesti haihdutetaan vesihauteessa (40°C), edulli-
sesti typpiatmosfäärissä. Tätä näytettä voidaan käyttää keksinnön mukaisena erektiota edistävänä aineena. Näyte liuotetaan mahdollisesti muutamaan millilitraan edellä mainittua lipidiliuotinta, edullisesti etyyliasetattiin ja säilytetään typpiatmosfäärissä -20°C:ssa.

Näyte voidaan sitten käsitellä tunnetuin menetelmin, jotka ovat tavanomaisia prostaglandiinin erottamisessa ja ottaa talteen fraktiot, jotka supistavat hyppyyrotan paksuudelta. Erottaminen voidaan tehdä kromatografisesti, esimerkiksi silikageelillä, edullisesti nk. kuivapylväskromatografiolla käyttäen eluenttina etyyliase-

taatin, iso-oktaanin, etanolin, veden, etikkahapon, kloroformin, isopropanolin ja muurahaishapon seoksia, edullisesti etyyliasetaatti-iso-oktaani)etanoli-etikkahappovesiseosta (tilavuussuhteessa 35:10:3:0,1:0,1) tai kloroformi-isopropanoli-etanolimuurahaishapposeosta (tilavuussuhteessa 45:5:0,5:0,3). Asiaankuuluvat fraktiot voidaan sitten eluoida ulos kloroformin ja metanolin seoksella, edullisesti tilavuussuhteessa 1:1.

Fraktiot voidaan erottaa silikageelilevyillä (TLC) tai pylväskromatografisesti samalla tai muunnetulla liuotinsysteemillä. Fraktiot, jotka supistavat hyppyyrotan paksusuolta, otetaan talteen ja säilytetään -20°C:ssa jatkoanalyysyä varten. Näitä fraktioita voidaan käyttää keksinnön mukaisena aineena, edullisesti kuiviinhaihdutuksen jälkeen. Ne voidaan myös puhdistaa edelleen kromatografisesti, edullisesti haihdutettuina ensin kuiviin. Fraktiot voidaan sitten puhdistaa kromatografisesti, edullisesti silikageelillä, esimerkiksi suurpainenestekromatografialla, käyttäen eluenttina fosforihapon, asetonitriilin ja metanolin seoksia, edullisesti fosforihappo-asetonitriili-metanoliseosta suhteessa 40:12:48.

Keksintöä kuvataan nyt tarkemmin viitaten liitteenä oleviin piirroksiin, joissa

kuvio 1 valaisee edullista menetelmää esimerkin 1 mukaisen aineen tuottamiseksi;

kuvio 2 valaisee prostaglandiinistandardien UV-adsorptiota eluutiotilavuuden funktiona suurpainenestekromatografiassa;

kuviot 3-5 valaisevat fraktioiden α_4 , α_5 ja vastaavasti α_6 , jotka on saatu esimerkissä 1 Silica Noelin DCC:llä tehdyssä kromatografiassa, UV-adsorptiota eluutiotilavuuden funktiona suurpainenestekromatografiassa.

Seuraavassa annetaan esimerkkejä keksinnön mukaisesta edullisesta valmistusmenetelmästä (viittaamme myös kuvion 1 katsaukseen).

Esimerkki 1

Tekijä eristetään rauhasista seuraavasti: Cowperin rauhaset poistetaan fertiileiltä uroksilta, jotka ovat juuri kuolleet. Preparaatti jäädytetään sitten välittömästi lämpötilaan -20°C . Bartholinin rauhaset poistetaan juuri kuolleilta fertiileiltä naarailta ja saadut preparaatit jäädytetään välittömästi -20°C :seen.

Lipidiuute saatiin esimerkin 1 mukaisista rauhasista seuraavalla menetelmällä: 23,5 g Cowperin rauhasia ja 16,1 g Bartholinin rauhasia hienonnettiin pieniin osiin ja homogenoitiin kumpikin erikseen Ultraturrax-laitteella 60 ml:ssa ja vastaavasti 20 ml:ssa etyyliaseetaatin ja metanolin seosta (tilavuussuhde 3:1). pH säädettiin 0,1 M kaliumvetyftalaatilla arvoon 4,5.

Lipidiuutteen annettiin seistä yön yli pakastimes-
sa ja poistettiin sen jälkeen vesikiteet suodattamalla
lämpötilassa alle 0°C . Näyte väkevöitiin sitten haihdut-
tamalla vesihauteessa (40°C) typpiatmosfäärissä. Täten
saatiin Cowperin rauhasista 0,43 g ja Bartholinin rauha-
sista 0,15 g tuotetta. Näyte säilytettiin sitten lämpöti-
lassa -20°C typpiatmosfäärissä.

Biologinen tekijä erotettiin muunnetun kuivapyl-
väskromatografiamenetelmän avulla, joka menestyksellises-
ti erottaa biologisesti aktiiviset lipidit uutteen muista
aineista. Käytettiin kolonnia, joka koostui 10 (kymmenes-
tä) teflonrenkaasta, joiden korkeus oli 2 cm ja sisäläpi-
mitta 2,5 cm ja jotka oli pakattu tiiviisti putkeen. Ku-
kin rengas vastasi fraktiota, joka kattoi Rf-arvon kahden
peräkkäisen desimaalin välisen alueen. Kolonni täytettiin
aktivoitulla Silica Woelm DCC:llä täristäen. Kumpikin
mainituista 0,43 ja 0,15 g:n näytteistä laitettiin erik-
seen yhteen tällaiseen kolonniin ja eluoitiin liuotin-
seoksella kloroformi-isopropanoli-etanoli-muurahaishappo
(tilavuussuhde 45:5:0,5:0,3).

Liuotinsyöttö pidettiin vakiona 1-2 cm näytteen

yläpuolelle sijoitetun erotussuppilon suuaukon avulla. Liuotinrintaman tulo kolonnin pohjan kohdalle osoitettiin sähköisellä tuntoelimellä tuotetulla akustisella varoitussignaaleilla. Loppupiste osoitettiin toisella signaalilla. Sitten poistettiin putken yläpäässä oleva kierrekorkki, niin että sisällä oleva osista koostuva teflonkolonni voitiin työntää akselin suuntaisesti ylöspäin männän avulla. Teflonrenkaat oli helppo irrottaa toisistaan yksi kerrallaan nopein leikkausliikkein. Lopuksi renkaat sijoitettiin 10 teflonkolonniin, jotka oli järjestetty varta vasten samanaikaista eluointia varten. Tuloksena olevat fraktiot eluointiin muutamalla ml:lla kloroformi-metanoliseosta (tilavuussuhde 1:1) ja biologinen aktiivisuus testattiin hyppyyrotan paksusuolella. Fraktioiden 4, 5 ja 6 - renkaista 4, 5 ja 6 ylhäältäpäin laskettuna käytetään tästedes nimityksiä alfa-4, alfa-5 ja alfa-6 - havaittiin supistavan hyppyyrotan paksusuolta ja niillä oli kokeissa 1-7 esitetyt ominaisuudet. Tämä päti kumpaankin edellä mainituista fraktioista sekä Cowperin että Bastholinin rauhasista saatuun. Fraktio haihdutettiin kuiviin typpi-atmosfäärissä vesihauteessa (40°C) ja puhdistettiin seuraavasti, vaikkakin tämä puhdistusvaihe on valinnanvarainen.

Suurpainenestekromatografia-(HPLC)-analyysi

Asianmukaisista rauhasista eristetyt fraktiot alfa-4, alfa-5 ja alfa-6 analysoitiin suurpainenestekromatografiolla, josta käytetään lyhennettä HPLC. Erotus tehtiin 5 µm:n RP-HPLC-kolonnilla. Käytettiin järjestelmää, joka koostui Consta Metric-111-HPLC-pumpusta (Lab. Data Control) ja vaihtelevalla aallonpituudella toimivasta detektorista Consta Metric Spectromonitos III (LDC). Detektori kytkettiin REC-2-rekisteröintilaitteeseen (Pharmacia) ja integraattoriin (HP 3888 A). Kolonnijärjestelmä koostui esikolonnista 49 x 4,6 mm LD, joka oli täytetty 40 µm:n käänteisfaasimateriaalilla (Pelliguar LC-18) ja

analyttisestä kolonnista 250 x 4,6 DL, Supelcosil LC-18, joka oli täytetty 5 μ m:n pallomaisilla hiukkasilla.

HPLC-järjestelmästä eluoituneet prostaglandiinit detektoitiin UV-alueella tapahtuvan adsorption avulla.

5 Prostaglandiinit, joista ei ollut muodostunut johdoksia, detektoitiin allonpituudella 199,5 nm. Kuivapylväskromatografiassa saadut, Cowperin ja vastaavasti Bartholinin rauhasista peräisin olevat, kuiviin haihdutetut fraktiot alfa-4, alfa-5 ja alfa-6 liuotettiin kukin 2 ml:aan abso-
10 luuttista etanolia. Kustakin näistä 2 ml:n näytteistä otettiin 20 μ l:n annoksia. Cowperin ja Bartholinin rauhasista saaduista fraktioista alfa-4, alfa-5 ja alfa-6 käsiteltiin kustakin viisi tällaista 20 μ l:n näytettä kolonnissa. Fraktioiden erottamiseen kolonnilla käytettiin
15 kolmikomponenttista eluenttia, joka sisälsi fosforihappoa (0,1 M), asetonitriiliä ja metanolia suhteessa 40:12:48. Näytteet otettiin sitten systemaattisesti kolonnista ja niistä analysoitiin hyppyyrotan paksusuolen supistaminen. Fraktiosta alfa-4 saadut fraktioiden, joiden retentioajat
20 (RT) olivat 3-6 ja 12-15, alfa-5:n fraktioiden, joiden retentioajat olivat 3-6 ja 12-15 ja alfa-6:n fraktioiden, joiden retentioajat olivat 8-10, havaittiin supistavan hyppyyrotan paksusuolta. Tämä pätee sekä Cowperin että Bartholinin rauhasen fraktioihin alfa-4, alfa-5 ja alfa-
25 6.

Verrattaessa joukkoon prostaglandiinistandardeja, kuten PGE_2 , PGI_2 ja PGE_1 ja myös PGF_2 ja PGA_2 , ei seoksessa ollut havaittavissa mitään näistä prostaglandiineista (vrt. kuviota 2, joka valaisee UV-adsorptiota aallonpi-
30 tuudella 199,5 nm mainittujen standardien eluutiotilavuuden ja retentioajan funktiona HPLC:ssä, kuvioihin 3, 4 ja 5, jotka valaisevat samaa käyrää kuivapylväskromatografiassa saaduille fraktioille α_4 , α_5 ja α_6). Biologisen aktiivisuuden havaittiin kuitenkin olevan monimutkainen,
35 kun fraktiointi tehtiin HPLC:llä. Pääasiallinen biologi-

nen aktiivisuus havaittiin HPLC-fraktioissa alfa-4:12-15, alfa-5:12-15 ja alfa-6:8-10.

5 Kaasukromatografia-massaspektrometria-analyysillä saatiin tulokseksi monimutkainen seos, jossa kuitenkin havaittiin tiettyjä fragmentteja, jotka viittasivat hermojen välittäjäaineiden kaltaisten aineiden, joiden molekyyllipaino on 200 - 1 000 m/c (alfa-6:8-10), läsnäoloon.

10 NMR-analyysiä (ydinmagneettista resonanssia) käytettiin fraktion alfa-5:12-15, jolla oli korkea biologinen aktiivisuus, tutkimiseen - sillä oli kaikki prostaglandiinien kaltaisten aineiden ominaispiirteet, kuten pitkä ketju, rasvahappojen läsnäolo ja terminaalinen CH₃-ryhmä.

Esimerkki 2

15 Kuolleilta miehiltä otetut Cowperin rauhaset (50 g) homogenoitiin 50 ml:n kanssa metanolia Ultraturax-laitteessa. pH säädettiin arvoon 4,5 0,1 M kaliumve-
tyfosfaatilla. Utteen annettiin seistä yön yli pakastimessa, minkä jälkeen jääkiteet poistettiin suodattamalla
20 lämpötilassa alle 0°C. Näyte väkevöitiin sitten haihduttamalla se kuiviin vesihauteessa typpi-atmosfäärissä.

Seuraavassa esitetään joukko kokeita, jotka valaisevat keksinnön mukaisen tekijän biologista vaikutusta.

Koe 1

25 Tekijän vaikutus ihmisten ja nisäkkäiden (härkä) paisuvaisten lihaskollageeniansaisiin ja vaikutus peniksen valtimoiden sileään lihakseen.

30 Miehen ja koirasnisäkkäiden erektio aiheutuu peniksen jäykistyvien kudosten, ts. paisuvaisten (corpora cavernosa) ylitäyttymisestä. Nämä sisältävät sienimäistä kudosta, joka koostuu kollageenikudoskimpuista ja sileistä lihaskuiduista, jotka muodostavat laajan verkoston, nk. paisuvaisten ansaat. Muodostuneet ontelot voivat laajentua ja supistua, ts. täyttyä verellä ja tyhjentyä siitä, nopeasti. Erektion yhteydessä paisuvaisten sileä li-

35

haksisto relaksoituu. Lisäksi valtimot, jotka syöttävät verta paisuvasiin, ts. penisvaltimot, laajentuvat. Peniksen erektio päättyy, ts. penis relaksoituu samalla tavalla, paisuvaisten lihaskuitujen ja penisvaltimoiden vastaavan supistumisen seurauksena.

Joukko koiraseläimiä teurastettiin, kultakin irrotettiin koko penis ja kuljetettiin se laboratorioon puskuriliuoksessa (Krebsin liuos) lämpötilassa $+4^{\circ}\text{C}$. Osia päässien paisuvasista poistettiin samalla tavalla. Ansa-
10 verkostossa olevan lihaksiston keskiosasta leikattiin pitkiä liuskoja, joiden pituus oli 1,5 cm ja leveys noin 4 cm. Samalla tavalla leikattiin penisvaltimon lihaksistosta liuska, jonka pituus oli 1,5 cm ja leveys noin 3 mm. Leikkely saatettiin loppuun 1-2 tunnin kuluessa eläimen teurastuksesta. Liuskoja pidettiin Krebsin liuoksessa
15 korkeintaan yksi vuorokausi eikä niissä ilmennyt tänä aikana aktiivisuuden heikkenemistä.

Tekijän vaikutusta eristettyihin lihassäikeisiin tutkittiin Grass Force Displacement Transducer -laitteella, joka oli kytketty Grass-monikanavapiirturiin. Tässä
20 kokeessa käytettiin standardeina PGE_2 ja $\text{PGF}_{2\alpha}$. Välttämällä liiallista jännitystä biologiseen tutkimukseen käytetyn järjestelmän kiinnitysvälineissä voitiin säilyttää kudoksen spontaani liikkuvuus. Cowperin rauhasista peräisin olevaa tekijää tiputettiin eristetyille lihassäikeille, jolloin havaittiin selvä relaksaatio peniksen ansa-
25 verkoston lihaksissa. Sama reaktio - vaikkakin heikompi - saatiin aikaan Bartholinin rauhasista peräisin olevalla fraktiolla. PGE_2 :lla pitoisuutena 50 ng/ml saatiin samanlainen vaikutus, tosin äärimmäisen heikko, kun taas $\text{PGF}_{2\alpha}$
30 samana pitoisuutena käytettynä sai aikaan kohonneen lihastonuksen.

Cowperin rauhasista saatua tekijää tiputettiin penisvaltimolle, joka oli kiinnitetty biologiseen analyysiin käytettyyn laitteistoon samalla tavalla kuin edellä
35

mainitut lihassäikeet. Havaittiin lihaksiston selvä relaxsaatio, kun tekijää tiputettiin penisvaltimolle. $\text{PGF}_{2\alpha}$ pitoisuutena 50 ng/ml ja PGE_2 samana pitoisuutena johtivat sitä vastoin penisvaltimon voimakkaaseen supistumiseen.

- 5 Tämä näyttää osoittavan selvästi, että käytetyt kaksi prostaglandiinityyppeä toimivat pääasiallisesti erektion vastaisesti, kun taas rauhasista peräisin olevat lipidifraktiot edistävät voimakkaasti erektiota.

Koe 2

- 10 Rauhasista saatava tekijä supistaa miesten ja koirasnisäkkäiden virtsaputken lihaksistoa. Virtsaputki koostuu limakalvokanavasta, josta suurimman osan sulkee sisäänsä lihaskerros, joka koostuu sisemmästä pituussuunnassa kulkevasta lihaksistosta ja ulommista poikittaissuuntaisista kerroksista. Se on parhaiten kehittynyttä virtsaputken ta-
- 15 kaosassa. Virtsaputken etuosassa esiintyy vinosti kulkevia lihaskimppuja. Miesten sukuelinten eturauhasleikkausten yhteydessä poistetaan eturauhasvyöhykkeestä osa virtsaputkea, joka preparoidaan ja säilytetään Krebsin puskurissa. Biolo-
- 20 gisessa kokeessa preparoidut lihasliuskat kiinnitettiin edellä kuvattuun bioanalyysilaitteistoon, joka oli äärimmäisen herkkä. Kudoshauteeseen lisättiin O_2 :n (95 %) ja CO_2 :n (5 %) seosta lämpötilassa 37°C . Cowperin rauhasista saatua tekijää tiputettiin lihasliuskoille, jolloin havaittiin
- 25 virtsaputken lihaksiston huomattava supistuminen. Sama vaikutus, vaikkakin vähemmän voimakas, havaittiin Bartholinin rauhasista saadulla tekijällä. Kummatkin tekijät oli uutettu ihmisten rauhasista. Nämä tulokset on myöhemmin vahvistettu käyttämällä härän virtsaputkea; $\text{PGF}_{2\alpha}$ johti saman-
- 30 laiseen virtsaputken lihaksiston supistumiseen, kun taas PGE_2 relaxsoi lihaksistoa. Mainitulla tekijällä käsitellyn virtsaputken lihaksiston supistumisen täytyy edistää ejakulaatiotapahtumaa. On totta, että tämän toiminnan mittausmenetelmä on epäsuora, mutta tällä hetkellä ei ole olemassa
- 35 menetelmiä, joilla tätä funktiota voitaisiin mitata suoraan ihmisillä.

Koe 3

Tekijä edistää siittiöiden motiliteettia. On tunnettua, että E-tyypin prostaglandiineilla ei ole vaikutusta siittiöiden liikkuvuuteen. Prostaglandiini $F_{2\alpha}$:lla on mahdollisesti siittiöiden motiliteettia heikentävä vaikutus. Kokeissa, joita teimme tekijällä, siittiöiden motiliteettia tutkittiin mikroskoopin alla. Tässä yhteydessä liuotettiin Bartholinin ja vastaavasti Cowperin rauhaset fysiologiseen suolaliuokseen ja lisättiin liuokset aktiivisia siittiöitä sisältävään liuokseen.

Voitiin osoittaa, että Bartholinin rauhasista peräisin oleva tekijä paransi erityisen voimakkaasti siittiöiden liikkuvuutta. Cowperin rauhasista saadulla tekijällä oli samanlainen, vaikkakin vähemmän voimakas, vaikutus samana pitoisuutena käytettynä. Fysiologisella suolaliuoksella ei ollut vaikutusta. Ihmisten, lampaiden ja härkien siittiöt tyhjennetään ejakulaatiossa emättimeen ja ne pyrkivät kohti munasolua oman liikkumiskykynsä turvin. Siten on olemassa hyvät perusteet otaksua, että tekijä helpottaa siittiöiden aktiivista vaeltamista emättimen ja kohtuontelon läpi.

Koe 4

Tekijä edistää siittiöiden tunkeutumista tuoreen munanvalkuaisen läpi. Kananmuna rikottiin ja munanvalkuaisesta laitettiin mikroskooppilevylle. Munanvalkuaiseen vietiin sitten kapillaariputki ja munanvalkuaista imettiin putkeen. Kahdelle kellolasille laitettiin siittiönäytteet, joista toiseen oli lisätty tekijää ja toiseen ei. Sekä Bartholinin että Cowperin rauhasista saatua tekijää, jotka molemmat olivat ihmisperäisiä, käytettiin vastaavissa koemenetellyissä. Munanvalkuaista sisältävät putket sijoitettiin siittiönäytteisiin ja kiinnitettiin plastisiinilla (muovailuvahalla). Kapillaariputket sijoitettiin pystyyn ja kellolasit, joille kapillaariputket oli sijoitettu, laitettiin sitten lämmityskammioon. Siittiöiden kykyä kulkea munanvalkuaisen läpi tutkittiin sitten mikroskoopin alla 60, 120 ja 180 minuutin kuluttua. Havaittiin selvästi, että

Bartholinin rauhasista saatu tekijä paransi merkittävästi siittiöiden kykyä kulkea munanvalkuaisen läpi; Cowperin rauhasista saadulla tekijällä oli samanlainen, vaikkakin heikompi, vaikutus.

- 5 Siittiöiden kyvyllä tunkeutua munasolujen proteiinin läpi on mitä suurin merkitys hedelmöitymiselle.

Koe 5

- Tekijä koaguloi siemennestettä (nestettä, johon siittiöt ovat suspendoituneina). Siemennesteessä olevat
10 fibrinolyttiset entsyymit saavat aikaan koaguloituneiden siittiöiden täydellisen tai osittaisen hajoamisen. On tunnettua, että härkien ja päässien Cowperin rauhasen eritteen kokonaisuute koaguloi siemennestettä. Funktionaalisesti ilmaistuna siemennesteestä muodostuu hyytymä, mikä on tärkeä
15 piirre ejakulaatiotapahtumassa. Se myös estää siemennesteen takaisinvirtauksen ejakulaatiovaiheen aikana ja edistää eläinten fertiliteettiä, erityisen huomattavasti pässeillä.

- Tekijän kykyä koaguloida siittiöitä valaisee seuraava:
20 va: 0,5 ml nestemuodossa (vapaasti virtaavassa tilassa) olevia siittiöitä laitettiin koeputkeen 37°C:ssa. 0,5 ml tekijää (Cowperin rauhasista) liuotettiin fysiologiseen suolaliuokseen ja lisättiin nestemäisiin siittiöihin. Siittiöiden havaittiin koaguloituvan nopeasti, jolloin muodostui kiinteä hyytymä. Tämän hyytymän havaittiin palaavan
25 nestemuotoon noin 10 minuutin kuluttua. Bartholinin rauhasista saadun tekijän lisääminen sai aikaan samanlaisen, vaikkakin heikomman, koaguloitumisen.

Koe 6

- 30 Tekijä supistaa naisten munanjohdin-kohtuliitoskohdan (UTJ) sileää lihaksistoa. Kun tekijää laitetaan UTJ:n sileälle lihaksistolle, saadaan aikaan yhdistelmäväste. Tämä johtuu siitä, että naaraan kohtu-munatorviliitoskohta sisältää kolme erilaista lihaskerrosta, jotka reagoivat
35 spesifisesti prostaglandiiniyryhmän lipidivälittäjäaineisiin. Lihaskudosta eristettiin UTJ:sta, joka otettiin terveiltä

fertiileiltä naisilta, joille oli tehty sterilisaatio tai kohtuleikkaus. Rengas- ja pitkittäislihassäikeitä asetettiin biologiseen analyysiin käytettävään laitteistoon, joka sisälsi Krebsin bikarbonaattipuskuria. Normaalin käytännön mukaisesti lisättiin hapen ja hiilidioksidin seosta ja testit tehtiin lämpötilassa 37°C . Tekijän havaittiin saavan aikaan pitkittäislihaksiston supistuminen ja rengasmaisen lihaksiston relaksaatio.

Koe 7

10 Tekijä supistaa emättimen lihaksistoa. Lehmien emättimen seinämistä eristettyä sileää lihaksistoa sijoitettiin bioanalyysiyksikköön. Häristä saatu Cowperin rauhasista peräisin oleva tekijä sai aikaan lihassuikaleiden merkittävän supistumisen. On hyvin tunnettua, että peniksen valtimot laajenevat erektiossa, verta tulee enemmän paisu-

15 seen, joka täyttyy tämän seurauksena ja tapahtuu erektio

Ejakulaatiossa virtsaputkea ympäröivä lihaksisto vetäytyy kokoon useiden autonomisten supistusten tapahtumissa ja ruiskuttaa siemennesteen peniksestä suurella paineella. Ejakuloidussa siemennesteessä olevat siittiöt joutuvat emättimeen ja liikkuvat, joko aktiivisen liikkumisen tai passiivisen vaeltamisen kautta, kohtuonteloon, josta siittiöt vaeltavat edelleen ja saavuttavat munasolun, johon ne sitten tunkeutuvat.

25 Koe 8 - Erektiotesti

Apinat (marakatit), jotka olivat 3-4 vuoden ikäisiä ja painoivat 4,5 - 5,0 kg, nukutettiin antamalla ketalaria 1,8 ml + mahdollisesti vielä 0,5 ml. Kunkin apinan penis pidettiin paikallaan pitkän imulaitteen avulla.

30 Seuraavia aineita ruiskutettiin valkokalvon läpi paisuaiseen (sileään lihaksistoon) ruiskulla (kärki 26 G); ruiskutettavan liuoksen lämpötila oli 30°C .

1. 0,5 ml fysiologista natriumkloridia (NaCl), joka ei saanut aikaan reaktiota;

35 2. 0,5 ml (15 mg) papaveriinia, joka edisti muutaman minuutin kuluessa erektiota; erektio kesti 1-2 tuntia;

3. 0,5 ml (2 mg) fenoksibentsamiinia, joka sai aikaan samanlaisen, mahdollisesti pidempään kestäväen reaktion kuin papaveriini;

5 4. esimerkissä 2 saatua kylmäkuivattua ainetta liuotettuna 0,5 ml:aan fysiologista NaCl typpipuhalluksen jälkeen. Testi tehtiin kolmella apinalla. Havaittiin erektio ja se kesti kahdella eläimellä 2-4 tuntia ja jopa 24 tuntia yhdellä eläimellä.

10 On ollut mahdollista osoittaa, että ihmisen ja nisäkkäiden rauhasista (Cowperin ja Bartholinin rauhasista) peräisin oleva tekijä edistää selvästi sekä erektiota ja ejakulaatiota ja hedelmöittää munasolun:
laajentamalla peniksen paisuvaisen lihaksistoa;
laajentamalla penisvaltimon lihaksistoa;
15 supistamalla virtsaputken lihaksistoa;
supistamalla emättimen lihaksistoa;
supistamalla kohtu-munatorviliitoskohdan pitkittäisiä lihas-
kimppuja;
vahvistamalla siittiöiden aktiivista liikkuvuutta;
20 lisäämällä siittiöiden kykyä läpäistä albumiinia (proteiinia); ja
koaguloimalla siemennestettä.

Yhdistettynä siihen tunnettuun tosiasiaan, että rauhasuute voitelee urogenitaalisia limakalvoja, saadaan täten
25 osoitetuksi, että tällä tekijällä on todellista merkitystä erektion, ejakulaation ja siittiöiden liikkuvuuden sekä siittiöiden proteiininlöpäisykyvyn edistämisessä. Tekijää voidaan siten käyttää fertilitettä parantavana aineena.

Tapaa, jolla tämä tekijä saa aikaan vaikutuksensa
30 in vivo -tilanteessa, voidaan valaista lähtemällä urauurtavasta työstämme rauhasen elektronimikroskooppitutkimusten alalla [L. Hellgren, E. Mylius ja J. Vincent, The ultra-structure of the human bulbo-urethral gland, J. Submicrose Cytol 14 nro 4 (1982) 683-689]. Tekijällä voidaan
35 daan ajatella olevan joko suora tai epäsuora vaikutus tai näiden kahden yhdistelmä. Suoran vaikutuksen voidaan

ajatella kohdistuvan siittiöihin kokeiden 1-7 mukaisesti. Tekijän epäsuora (hormonaalinen) vaikutus penisvaltimon, emättimen, virtsaputken ja munanjohtimen lihaksistoon voidaan saavuttaa verenkierron kautta. Sitä, että näin on todennäköisesti asianlaita, tukevat elektronimikroskooppiva-
5 vaintomme, joiden mukaan Cowperin ja Bartholinin rauhasen erityysjyväset sijaitsevat rauhasen verisuonissa, jolloin jyväsien sisältö lyhentyä todennäköisesti suoraan verenkiertoon.

10 Tekijää voidaan käyttää fertiliteettiä ja erektiota edistävänä aineena. Näitä aineita voivat olla sellaiset Cowperin ja Bartholinin rauhasista saatavat lipidifraktiot kuin ne, jotka supistavat hyppyyrotan paksusuolta, esimerkiksi ensimmäinen epäpuhdas kokonaislipidiuute ja erityi-
15 sesti aktiiviset fraktiot, jotka eluoituvat kuivapylväs-kromatografiassa tai suurpainenestekromatografiassa esimerkiksi 1. Aineet voivat esiintyä myös koostumuksissa yhdessä tavanomaisten jatkeaineiden kanssa. Koostumukset voivat olla ruiskeina annettavissa olevien nesteiden, suihkeiden,
20 tablettien, suspensioiden, liuosten, siirappien, peräpuikkojen ja kapselien muodossa. Näyteliuokset haihdutetaan edullisesti kuiviin, liuotetaan fysiologiseen keittosuola-liuokseen ja infektoidaan.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä erektiota ja fertiliteettiä edistävän valmisteiden valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että
5 se valmistetaan seuraavien vaiheiden mukaisesti ainakin yhdestä rauhasesta, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluvat nisäkkäiden, ihmisten mukaanluettuna, Cowperin ja Bartholinin rauhaset,

a) rauhanen jauhetaan hienoksi,

10 b) hienoksi jauhettu rauhanen uutetaan happamassa pH:ssa lipidiliuottimella, joka on etyyliasetaatti, metanoli, vesi tai niiden seos,

c) saadusta uutteesta poistetaan vesi,

d) liuotin haihdutetaan pois uutteesta,

15 e) saatu jäännös fraktioidaan kromatografisesti ja

f) valitaan ne fraktiot, jotka supistavat hyppyytösten paksusuolta, jolloin valitut fraktiot sisältävät erektiota ja fertiliteettiä edistävän valmisteiden.

20 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lisävaiheen, jossa kohdassa a) saatu hienoksi jauhettu rauhanen vapautetaan proteiineista uuttamalla se etanolilla ennenkuin saatu jäännös uutetaan vaiheen b) mukaisesti.

25 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lisävaiheen, jossa vaiheessa f) valitut fraktiot puhdistetaan kromatografisesti.

30 4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kromatografiaprosessi suoritetaan silikageelillä, jolloin eluoidaan etanoli-, vesi-, kloroformi-, isopropanolimuurahaishapposeoksella.

35 5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että seos on kloroformi, isopropanoli, etanoli ja muurahaishappo tilavuussuhteessa 45:5:0,5:0,3.

6. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että jatkopuhdistuksen lisävaihe
suoritetaan suurpainenestekromatografian avulla, jolloin
eluoidaan fosforihapon, asetonitriilin ja metanolin seok-
5 silla.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että fosforihapon, asetonitriilin
ja metanolin tilavuussuhde on 40:12:48.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av ett preparat för befrämjande av erektion och fertilitet, k ä n n e -
5 t e c k n a t därav, att det framställs i enlighet med följande steg, ur åtminstone en körtel som valts ur en grupp bestående av Cowpers och Bartholins körtlar hos däggdjur, inklusive människor,

a) körteln finmales

10 b) den finmalda körteln extraheras under surt pH med ett lipidlösningsmedel som utgörs av etylacetat, metanol, vatten eller en blandning av dessa,

c) vattnet avlägsnas ur det erhållna extraktet,

d) lösningsmedlet avdunstas från extraktet,

15 e) den erhållna återstoden extraheras kromatografiskt och

f) de fraktioner som sammandrager tjocktarmen hos hoppråttan utväljs, varvid de utvalda funktionerna innehåller det erektions- och fertilitetsbefrämjande preparatet.
20

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det omfattar ett extrasteg varvid vid steget a) den erhållna finmalda körteln befrias från proteiner genom att extraheras med etanol innan den
25 erhållna återstoden extraheras enligt steg b).

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar ett extrasteg varvid de vid steget f) utvalda funktionerna renas kromatografiskt.

30 4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att kromatograferingsprocessen utföres med silikagel, varvid elueringen sker med etanol-, vatten-, kloroform-, isopropanolmyrsyrablandning.

5. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e -
35 t e c k n a t därav, att blandningen utgörs av kloro-

form, isopropanol, etanol och myrsyra i volymförhållandet 45:5:0,5:0,3.

5 6. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att extrasteget med den ytterligare
reningen sker med hjälp av högtrycksvätskekromatografi,
varvid elueringen sker med en blandning av fosforsyra,
acetonitril och metanol.

10 7. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att volymförhållandet fosforsyra,
acetonitril och metanol är 40:12:48.

FIG.1

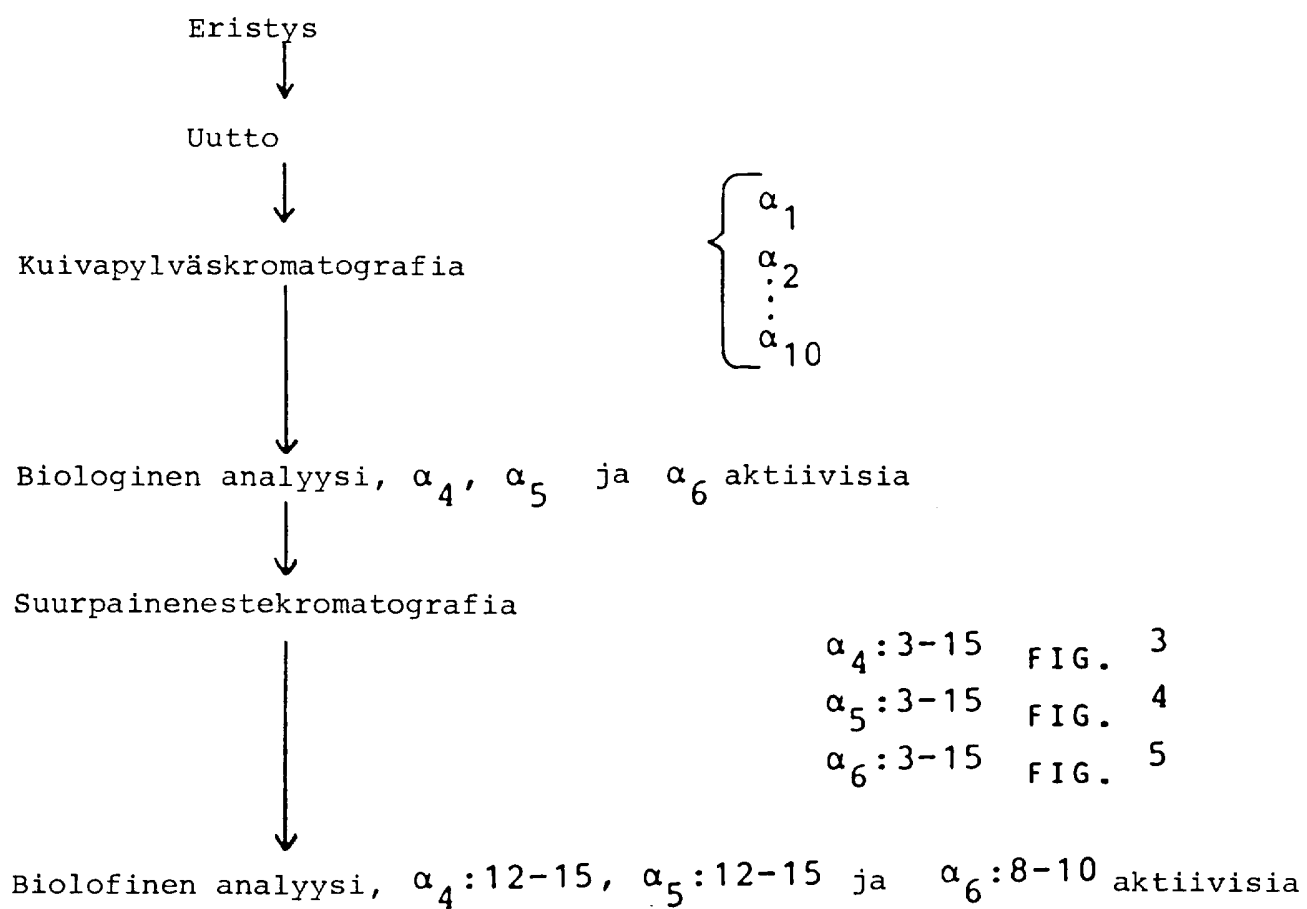
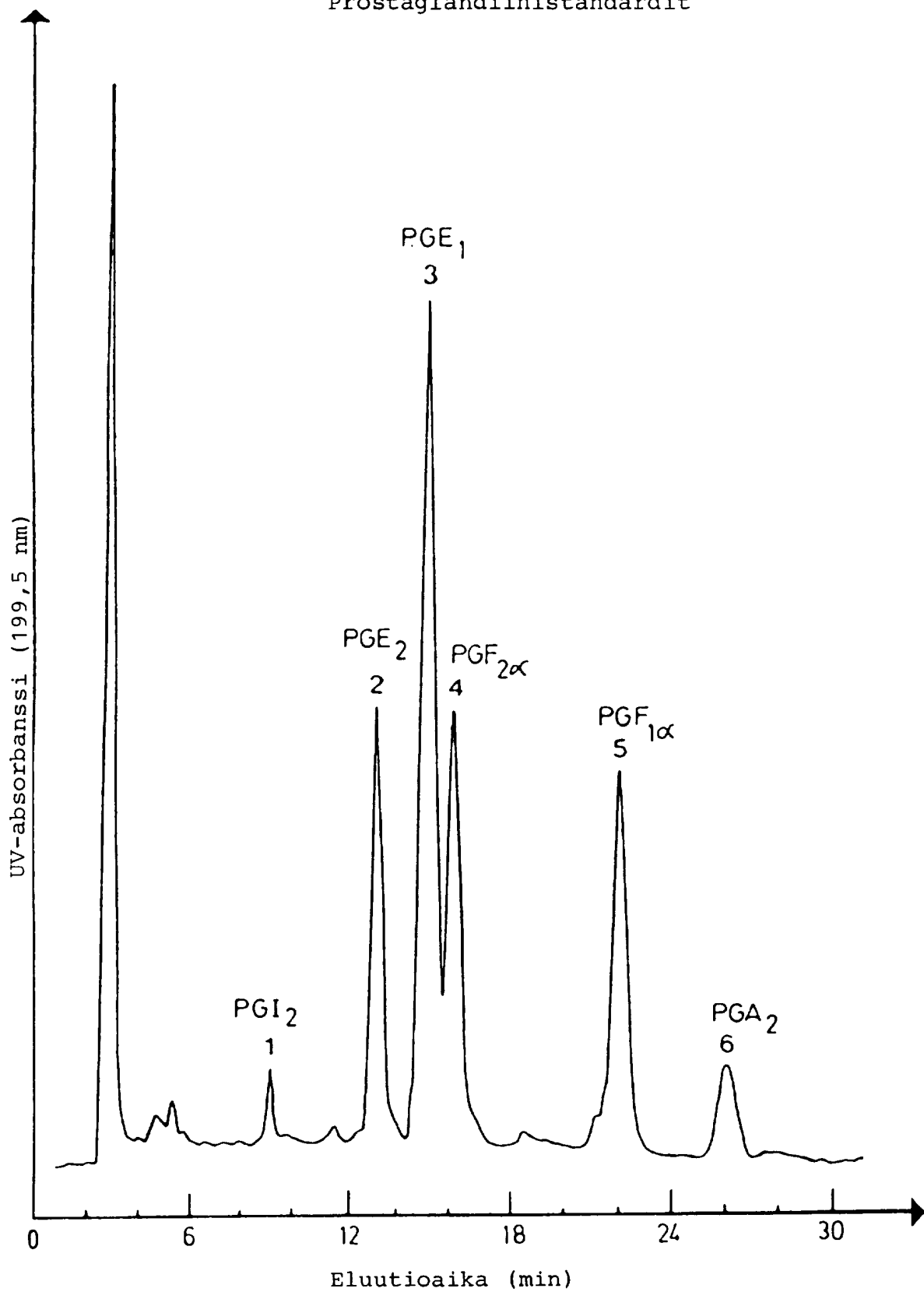


FIG.2

80593

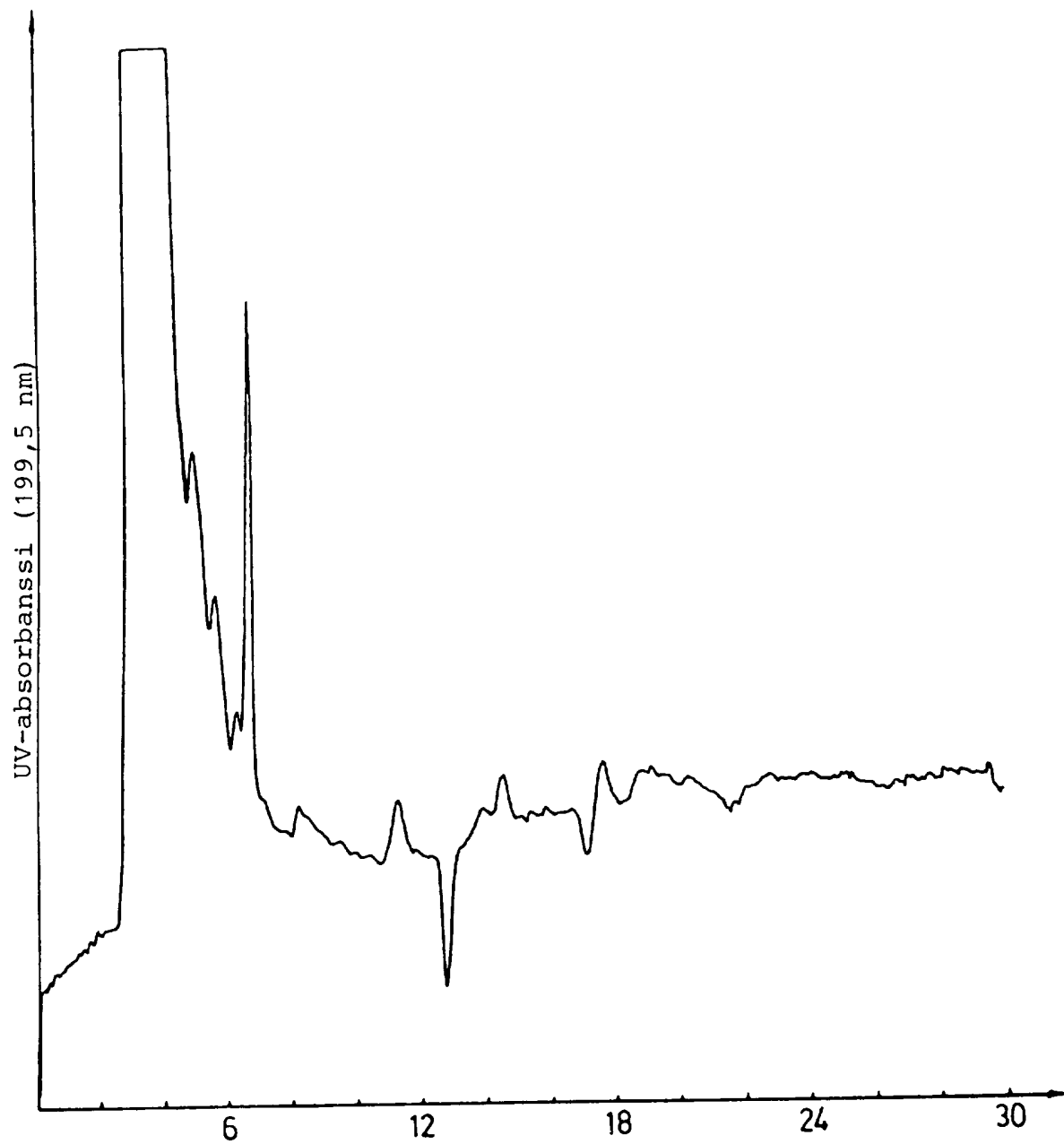
Prostaglandiiniinistandardit



80593

FIG. 3

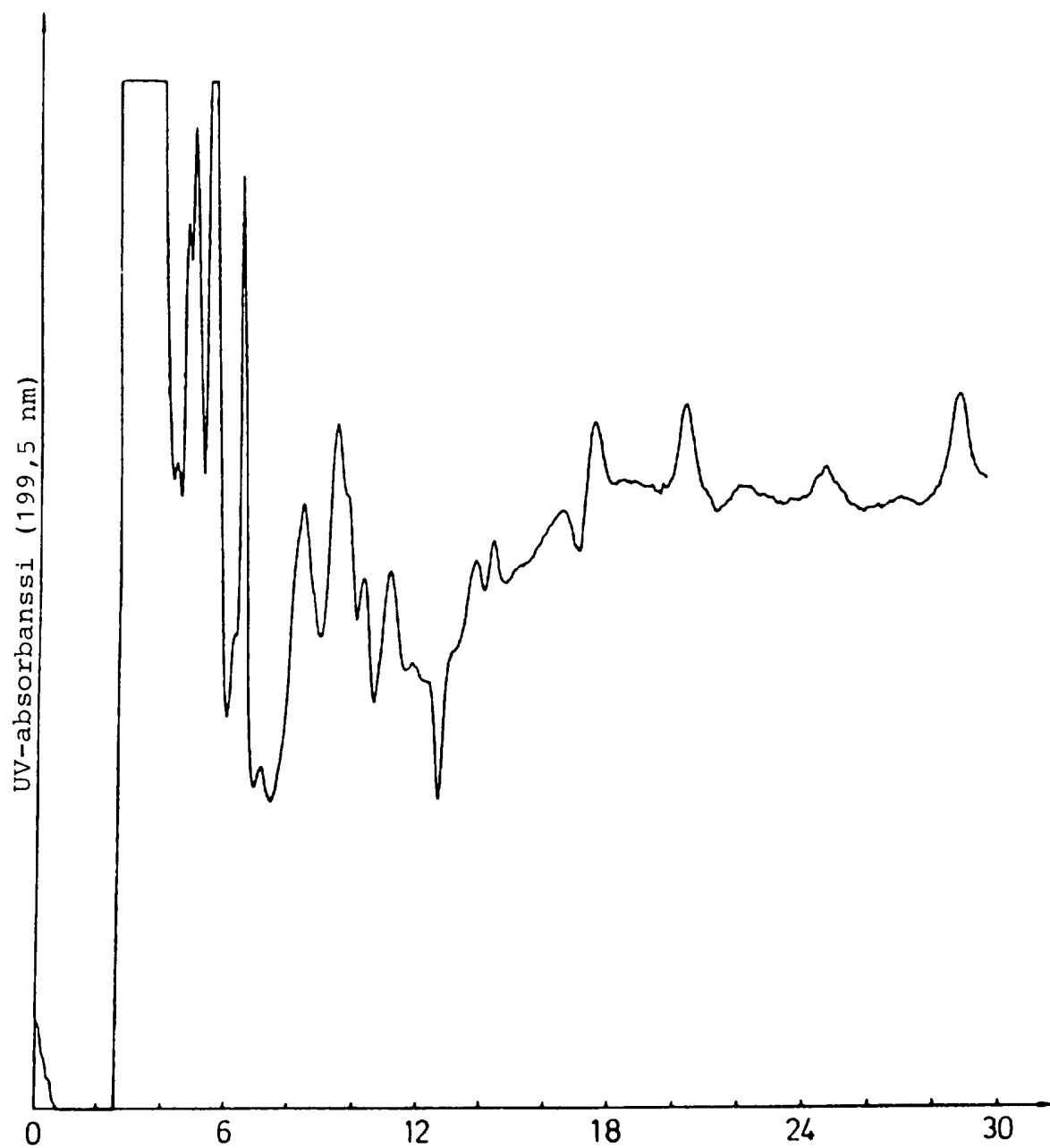
α_4 : 3-15



80593

FIG. 4

α_5 : 3-15



80593

FIG. 5
 α_6 : 3-15

