

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 164201 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 0619/84

(51) Int.Cl.5

A 61 K 37/38

(22) Indleveringsdag: 10 feb 1984

(41) Alm. tilgængelig: 12 aug 1984

(44) Fremlagt: 25 maj 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 11 feb 1983 IT 47699/83

(71) Ansøger: *ISTITUTO FARMACOLOGICO SERONO SPA; Via Ludovisi, 35; Rom, IT

(72) Opfinder: Manlio *Barbetti; IT

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft A/S

(54) Blandinger af follikelstimulerende hormon og luteiniseringshormon, fremgangsmåde til fremstilling af blandingerne og anvendelse af disse

(56) Fremdragne publikationer

GB pat. nr. 1065127

US pat. nr. 2356803

Andre publikationer: Theriogenology, 1978, 10(2-3), s. 167-174

(57) Sammendrag:

619-84

En blanding af follikelstimulerende hormon og luteiniseringshormon ekstraheres fra svinehypofyser på en sådan måde, at der fremstilles en fraktion, som er rig på FSH, og en fraktion, som er rig på LH, og disse blandes således, at der opnås det ønskede FSH/LH-mængdeforhold. Præparatet kan anvendes til at inducere superovulation i husdyr.

DK 164201 B

Den foreliggende opfindelse angår blandinger af follikelstimulerende hormon (FSH) og luteiniserende hormon (LH), fremgangsmåde til fremstilling af blandingerne og anvendelse af blandingerne til induktion af superovulation i husdyr.

- 5 Multipelovulation eller superovulation induceret i køer, geder og får er en grundlæggende forudsætning for at opnå bestemte mål, som er af største interesse for landbrugsøkonomien: Programmerede drægtigheder, tvillinge-drægtigheder og navnlig fostertransplantationer.

- 10 I husdyravl tjener fostertransplantationen til at opnå en maksimal mængde æg fra en hun, der har særlig ønskelige egenskaber (fx en høj mælkeproduktion), hvilke æg befrugtes med sæd fra udvalgte hanner. Disse genetisk overlegne fostre transplanteres til andre dyr, der vil være velegnet til at fuldføre drægtigheden.

Skematisk kan fostertransplantationen underinddeles i to trin:

- 15 I første trin induceres i "donor"-hunnen ved hjælp af administration af gonadotropiner modningen af flere follikler i stedet for den ene follikel, der spontant modnes.

- 20 I andet trin transplanteres de morfologisk normale fostre, som har samlet sig i kønskanalen hos det dyr, der forinden er blevet behandlet med gonadotropiner og senere blevet underkastet kunstig befrugtning, i andre hunner, som er blevet "synkroniseret", og som betegnes "modtagerne".

I flere tilfælde giver resultatet af superovulationen ikke noget godt økonomisk resultat som følge af, at

- 25 a) der dannes for få fostre og/eller der dannes unormale fostre, som er ude af stand til at overleve,
- b) der induceres beskadigelse af ægestokkene, som kan forhindre senere superovulationer hos de hunner, som er genetisk overlegne.

Der er almindelig enighed om, at den hormonale stimuleringsprocedure til dannelse af flere follikler kræver en særdeles omhyggelig tilpasning og indstilling.

- 5 Den multiple ovulation eller superovulation induceres normalt ved administration af enten PMSG (hoppeserumgonadotropin), som ekstraheres fra drægtige hoppers blod, eller FSH (follikelstimulerende hormon), der ekstraheres fra husdyrhypofyser såsom fra svin og heste.

- 10 PMSG har i mange år været dominerende ved superovulation hos alle husdyr som følge af, at det er let tilgængeligt og let kan administreres. Dette hormon, som kun består af ét molekyle, der udviser såvel FSH-type- som LH-typeaktivitet, har et meget højt indhold af n-acetylneuraminsyre og forbliver i cirkulation i mange dage efter blot én injektion. Det er derfor muligt at opnå en tilfredsstillende stimulering med PMSG ved hjælp af administration af
- 15 den sædvanlige dosis i blot én injektion.

Imidlertid er reaktionerne over for de superovuleringsbehandlinger, som foretages med PMSG, for variable, selv når anvendelsen af hormonet udføres i henhold til nøjagtige programmer og i nøjagtige tidsperioder.

- 20 Endvidere forårsager PMSG visse ændringer i ovariestrukturen, der efter administration giver sig udslag i lange forsinkelser i genkomsten af de spontane cykler. Disse forsinkelser er meget længere end dem, der opstår som følge af superovuleringsbehandlinger med andre typer gonadotropiner.
- 25 Tilsyneladende er selv den langvarige tilstedeværelse af PMSG i kredsløbet årsag til nogle uønskede virkninger såsom den variable reaktion og dannelsen af en høj procentdel af abnorme fostre.

- Af de nævnte årsager er der nu en tendens til at erstatte PMSG med FSH, som ekstraheres fra husdyrhypofyser. I henhold til hvad der
- 30 kendes fra litteraturen, er det hyppigst anvendte produkt FSH-P, som består af et follikelstimulerende hormon, der ekstraheres fra

svinehypofyser, og hvis dosering beregnes i ækvivalente mg af standard Armour-FSH. (Standard Armour FSH er et svine-FSH præparat, fremstillet af Armour Laboratories efter en metode af Steelmann et al., Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 82: 645, 1953)

- 5 I USA patentskrift nr. 2.799.621 (1957) i navnet Armour beskrives det, at det FSH, som udvindes i henhold til den deri beskrevne fremgangsmåde, er særlig nyttigt, fordi det i det væsentlige er fri for LH. Endvidere anføres det i dette patentskrift, at dette forhold i sig selv er en vigtig opdagelse, fordi FSH har nogle anvendelser, 10 hvor det omtrentlige fravær af LH er nyttig.

Af al litteratur, som er publiceret for nylig, fremgår det, at det faktisk foretrukne administrationsskema består af administration af 30-32 mg FSH-P, uden nogen tilsætning af LH, i en periode på 5 dage.

- Den foreliggende opfindelse angår hovedsageligt et præparat af FSH og 15 LH, som ekstraheres fra svinehypofyser, i et bestemt mængdeforhold, hvorved opnås resultater, som er overlegne i forhold til de resultater, der opnås med såvel FSH-P som med PMSG, til induktion af superovulation i husdyr.

- Den foreliggende opfindelse anvendes til induktion af superovulation 20 i husdyr, hvilket består i administration af det ovennævnte præparat af FSH og LH til dyrene. Fordelen ved denne anvendelse ligger i, at der anvendes en blanding af FSH og LH i et veldefineret forhold således, at der ikke sker en ændring af den naturlige proces, der fører til en hurtig LH-stigning, det vil sige den ovulatoriske peak- 25 værdi. Det er herved muligt at overvinde den ulempe, der er forbundet med den kendte teknik, således som beskrevet i Mickelsen et al., *Theriogenology*, 1978, 10(2-3), 167-174, der beskriver anvendelse af FSH efterfulgt af LH til induktion af superovulation hos ikke kønsmodne kvier, hvor FSH-behandlingen efterfølges af en engangs 30 injektion af eksogent LH for at sikre, at ovulation rent faktisk finder sted. Anvendelsen ifølge opfindelsen er tillige overraskende derved, at udbyttet af fertiliserede æg der kan blive til fostre, er mindst dobbelt så stort som udbyttet opnået ifølge den kendte teknik.

FSH/LH-forholdet i præparaterne ifølge opfindelsen holdes mellem 0,5 og 2,5, når doseringen af FSH og LH foretages ved henholdsvis Steelman og Pohley's metode (Steelman S.L. og Pohley F.M., *Endocrinology* 53, 1953, s. 604) og Parlow's metode (Parlow A.F. i A. Albert (red.), *Human Pituitary Gonadotropins*, s. 300-310, C.C. Thomas, Springfield, Illinois), idet der som sammenligningspræparat anvendes den første hMG internationale standard for biologiske doser af FSH og LH. Ved hMG menes humant menopause gonadotropin.

10 Fremgangsmåden til ekstraktion og oprensning af FSH/LH-præparatet, der fremstilles ud fra svinehypofyser i henhold til den foreliggende opfindelse, er beskrevet i detaljer nedenfor.

Det råmateriale, der anvendes i denne fremgangsmåde, består fortrinsvis af frosne hypofysektuler fra svin, som må indsamles og opbevares omhyggeligt.

15 Ved den sædvanlige fremgangsmåde i industrien adskilles ekstrakterne fra remanensen eller den uopløselige del ved centrifugering, selv om der naturligvis også kan anvendes andre separationsmetoder. På samme måde kan dialysen erstattes med ultrafiltreringsmetoder.

20 Alle trin i fremgangsmåden skal udføres ved en tilstrækkelig lav temperatur til at forhindre denaturering af gonadotropinerne. Der tilrådes sædvanligvis temperaturer under 10°C. De frosne svinehypofyser tøs op ved 4°C i acetone, som indeholder phenylmethansulfonfylfluorid, og homogeniseres derefter. Det homogeniserede materiale filtreres, vaskes flere gange med acetone, forafkøles og tørres i
25 vakuum, hvorved fås et acetoniseret pulver.

Det acetoniserede pulver sættes til en acetat/ethanolpuffer, pH-værdi 5, der forinden er afkølet ved 4°C, og som indeholder 40% ethanol og phenylmethansulfonfylfluorid. Blandingen omrøres i 20 timer ved 4°C. Ved centrifugering af det ekstraherede produkt med acetat/ethanol fås
30 en klar supernatant, som indstilles til et ethanolindhold på 80%. Det således vundne bundfald indsamles ved dekantering og centrifugering.

Derefter foretages en ekstraktion i en ammoniumhydrogencarbonatopløsning for at eliminere de uopløselige proteiner, hvorefter den uopløselige remanens fjernes ved centrifugering, supernatanten dialyseres mod vand og lyofiliseres derefter, hvorved fås rå porcine gonadotropiner.

Der fremstilles en opløsning af råmateriale i destilleret vand, som indstilles til en pH-værdi på 5,3 og 30%’s mætning med ammoniumsulfat. Det vundne bundfald fjernes ved centrifugering, og supernatanten indstilles til en pH-værdi på 7,3 og 50%’s mætning med ammoniumsulfat.

Bundfaldet, som indeholder hovedparten af LH, indsamles derefter ved centrifugering, dialyseres mod vand og lyofiliseres. Denne fraktion, som i det følgende betegnes som "LH-fraktionen", indeholder også små mængder af FSH.

Ammoniumsulfatkoncentrationen af supernatanten indstilles derefter til 90%’s mætning, og blandingen lades henstå i flere timer. Bundfaldet, som er rigt på FSH, indsamles, dialyseres og lyofiliseres. Denne fraktion, som i det følgende betegnes "FSH-fraktionen", indeholder også en ringe mængde LH.

"FSH-Fraktion" og "LH-fraktionen", der fås ved den ovenfor beskrevne fremgangsmåde, er forurenede med små mængder af henholdsvis LH og FSH. Omfanget af forurening varierer fra det ene præparat til det andet og må bestemmes nøjagtigt i begge fraktioner for at beregne de mængder, der kræves for at opnå en blanding med den ønskede sammensætning af FSH og LH.

Udgangsmaterialerne til fremstilling af en blanding af FSH og LH i et bestemt mængdeforhold er:

"FSH-Fraktion", der indeholder "a" internationale enheder FSH pr. mg og "b" internationale enheder LH pr. mg.

"LH-Fraktion", som indeholder "c" internationale enheder FSH pr. mg og "d" internationale enheder LH pr. mg.

"x" og "y" mængderne udtrykt i mg for henholdsvis "FSH-fraktionen" og "LH-fraktionen" til inkorporering i blandingen for at opnå et præparat, som indeholder "T" enheder FSH og et FSH/LH-forhold = "R", følger af nedenstående formler.

$$\begin{aligned}
 5 \quad x &= \frac{T}{R} \cdot \frac{c - R \cdot d}{b \cdot c - a \cdot d} \\
 y &= \frac{T}{R} \cdot \frac{R \cdot b - a}{b \cdot c - a \cdot d} \\
 10
 \end{aligned}$$

Fx skal "x" mg af en "FSH-fraktion", som indeholder 27,3 internationale enheder FSH pr. mg og 6,73 internationale enheder LH pr. mg, blandes med "y" mg af en "LH-fraktion", som indeholder 8,9 internationale enheder FSH pr. mg og 811,7 internationale enheder LH pr. mg, for at opnå "T" = 120.000 internationale enheder FSH med et forhold ("R") mellem FSH og LH på 1.

Ved at anvende ovenstående ligninger fås:

$$\begin{aligned}
 20 \quad x &= \frac{120.000}{1} \cdot \frac{8,9-1 \cdot 811,7}{6,73 \cdot 8,9-27,3 \cdot 811,7} = 4359,2 \\
 y &= \frac{120.000}{1} \cdot \frac{1 \cdot 6,73 - 27,3}{6,73 \cdot 8,9-27,3 \cdot 811,7} = 111,7
 \end{aligned}$$

Heraf følger, at 4359,2 mg af "FSH-fraktionen" skal blandes med 111,7 mg af "LH-fraktionen" for at få et præparat, som indeholder 120.000 internationale enheder FSH og 120.000 internationale enheder LH (FSH/LH-forhold = 1).

Induktion af superovulation hos alle husdyr for at opnå en maksimal mængde levende og transplanterbare fostre fra en donorhun ved hjælp

af hormoner og administrationsskemaer af forskellig art har været og er stadig målet. For nylig er der udover de ovennævnte dyrearter også blevet inkluderet dyr, der anvendes til farmakologisk forskning såsom aber, hunde og katte.

- 5 Imidlertid er statistisk bekræftede resultater kun tilgængelige for køers vedkommende, hvilket fremgår af den generelle oversigt over emnet, som er offentliggjort i 1977 af det canadiske landbrugsministerium (Betteridge K.J. (red.) 1977, Canada Department of Agriculture, Monograph 16).
- 10 Beregninger baseret på mere end 1700 donorkøer viser, at udbyttet af transplanterbare fostre, selv om det varierer meget, i gennemsnit er på under 5 pr. dyr. (Moor R.M. et al., bind i, s. 43, 9th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Madrid 1980).
- 15 Præparatet ifølge opfindelsen er blevet testet med køer med resultater, der langt overstiger det ovennævnte gennemsnit.

- En plan for behandling med blandinger af FSH og LH fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse og egnet for frisiske køer i den mælkeproducerende periode består af administration af i alt 1000
- 20 internationale enheder FSH og 1000 internationale enheder LH i faldende doser over en periode på 5 dage begyndende med den 9. til 11. dag af estroncyklen.

- Om aftenen på den 3. behandlingsdag administreres én ampul prostaglandin for at fremprovokere luteolyse. Der foretages to eller tre
- 25 kunstige befrugtninger begyndende 12 timer fra starten af estronperioden. På 7. dagen efter den anden insemination fjernes fostrene ad ikke-kirurgisk vej ved vask af uterushornene.

- I dette system opsamles alle fostre, som er et resultat af befrugtningen af de dannede æg, samt eventuelle ubefrugtede æg i en
- 30 beholder.

De indsamlede fostre undersøges omhyggeligt under mikroskop og underinddeles i henhold til deres morfologiske træk i transplanterbare og ikke-transplanterbare fostre.

I frisiske køer i den mælkegivende periode, som behandles i henhold
5 til ovenstående program, fås følgende gennemsnitstal:

Samlede antal fostre $\bar{x} = 14,571$
transplanterbare fostre $\bar{x} = 11,142$.

I kødkvæg såsom "marchigiane" eller "chianine" er en samlet dosis på
750 internationale enheder FSH og 750 internationale enheder LH
10 tilstrækkelig.

Administrationsprogrammet for denne dosis og enhver anden detalje af
behandlingen er identisk med den, som allerede er beskrevet for
frisiske køer i den mælkegivende periode.

I "marchigiane"- og "chianine"-køerne fås følgende gennemsnit:

15 Samlet antal fostre $\bar{x} = 14,142$
transplanterbare fostre $\bar{x} = 10,571$.

Det er vigtigt at understrege, at de ovenfor anførte gennemsnit fås
ved behandling af dyr "i marken".

Det er velkendt for eksperter, at resultaterne bliver betydeligt for-
20 bedret, når behandlingen udføres i en specialklinik i stedet for "i
marken", idet alle dyrene der kan behandles under hensyntagen til
alle tekniske betingelser.

PATENTKRAV

1. Blanding af FSH (et follikelstimulerende hormon) og LH (et
25 luteiniserende hormon) fra svinehypofyser,
k e n d e t e g n e t ved, at FSH/LH-forholdet er på mellem 0,5 og
2,5, og hvor FSH henholdsvis LH angives i internationale enheder.

2. Blanding ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at FSH/LH-forholdet i det væsentlige er
lig med 1.
3. Fremgangsmåde til fremstilling af en blanding af svine-FSH (et
5 follikelstimulerende hormon) og svine-LH (et luteiniserende hormon)
ifølge krav 1 eller 2,
k e n d e t e g n e t ved, at der fremstilles en fraktion, som er
rig på FSH, og en fraktion, som er rig på LH, og begge fraktioner
blandes i de nødvendige mængder for at få en blanding med det ønskede
10 FSH/LH-forhold.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 4,
k e n d e t e g n e t ved, at den fraktion, som er rig på FSH, i det
væsentlige består af FSH indeholdende en vis mængde forurening med
LH, og den fraktion, som er rig på LH, i det væsentlige består af LH
15 med en vis mængde forurening med FSH.
5. Anvendelse af blandingen ifølge krav 1 eller 2 til induktion af
superovulation i husdyr.